

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Стрільбицької Ольги Михайлівни «Регуляція фізіолого-біохімічних процесів *Drosophila melanogaster* шляхом модуляції сигнальної системи Tor/IS/MYC у стовбурових клітинах кишківника», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.04 – біохімія

Актуальність теми

Дисертаційна робота Стрільбицької О.М. присвячена вивченню особливостей функціонування сигнальних шляхів TOR/IS та Myc у стовбурових клітинах кишечника *Drosophila*, які впливають на тривалість її життя через регуляцію метаболізму, стійкості до стресів, плодючості та споживання їжі.

Відомо, що сигнальні каскади, які пов'язані зі старінням, одночасно залучені до регулювання метаболічних шляхів та реакцій організму на стресові чинники. Одним із таких шляхів є TOR, який бере участь у регуляції метаболізму та життєздатності в усіх еукаріотичних організмів, а також необхідний для росту на ранніх стадіях розвитку. Інгібування сигналів TOR, як за допомогою генетичних маніпуляцій, так і за допомогою фармакологічних препаратів збільшує тривалість життя у мишей та інших модельних організмів і зменшує патології, асоційовані з віком.

Дослідження ряду авторів показали, що сигнальний шлях TOR пов'язаний з діабетом, артритом, остеопорозом, кардіоваскулярними захворюваннями, а також часто активується в пухлинах, де не лише регулює транскрипцію генів та синтез протеїну для росту та проліферації клітин, сприяє диференціації імунних клітин для участі в імунній регуляції, але й відіграє важливу роль у метаболізмі пухлини. Саме тому сигнальний шлях TOR є мішенню у дослідженнях протиопухлинної терапії. На сьогодні показано наявність ряду нових інгібіторів TOR, які проявили високу протиопухлинну активність у клінічних дослідженнях. Більше того, останні дослідження свідчать про можливість використання інгібітора сигнальної системи TOR — рапаміцину другого покоління (Еверолімусу) для подолання цитокінового шторму та зниження гіперактивності імунної системи при захворюванні на Ковід-19.

Функціонування іншого сигнального шляху – інсулінового також тісно пов'язане з контролем росту, розвитку, метаболізму, стійкості до стресів, розмноження та тривалість життя організму.

Отже, з огляду на центральну роль сигнальних шляхів на ріст та швидкість старіння організму критично важливо зрозуміти, як зміни функціонування сигнальних систем Tor/IS та їх спільної мішені – транскрипційного фактора MYC впливають на ці процеси. З іншого боку старіння організму тісно пов'язане із зниженням регенеративної здатності тканин, а механізми контролю тривалості життя реалізуються через регуляцію активності стовбурових клітин. Тому кишківник *Drosophila* можна вважати перспективною модельною системою для встановлення механізмів функціонування стовбурових клітин, імунних реакцій та взаємозв'язку між регенеративною здатністю та старінням.

Враховуючи той факт, що генетичні шляхи регуляції тривалості життя є консервативними від одноклітинних організмів до організму людини, то розуміння молекулярних механізмів цих процесів сприятиме терапевтичних підходів для сповільнення процесів старіння та захворювань, пов'язаних із віком.

Виходячи із сказаного вище, вважаю, що тема дисертаційної роботи Стрільбицької Ольги Михайлівни «Регуляція фізіолого-біохімічних процесів *Drosophila melanogaster* шляхом модуляції сигнальної системи TOR/IS/MYC у стовбурових клітинах кишківника» є актуальною, має як теоретичне, так і практичне значення.

Зв'язок теми дисертації з державними або галузевими програмами

Дослідження, представлені у дисертаційній роботі виконані впродовж 2013-2019 рр., і є фрагментом наукової тематики кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника «Вивчення механізмів пристосування організмів до несприятливих умов середовища з метою розробки методів підвищення їх адаптаційного потенціалу» (№ держресетрації – 0107U001367). Частина експериментів проведена на кафедрі молекулярної біології Гайдельберзького університету (м. Гайдельберг, Німеччина).

Наукова новизна отриманих результатів. Дисертантка отримала такі наукові результати:

- вперше встановлена роль сигнальних шляхів TOR, IS і транскрипційного фактору Мус у регуляції тривалості життя, стійкості до стресів, плодючості, споживання їжі, метаболізму та гомеостазу кишківника у *Drosophila melanogaster*;
- вперше виявлено, що зміни в активності сигнальних шляхів TOR та IS призводять до скорочення тривалості життя експериментальних особин, що свідчить про важливість підтримання гомеостазу стовбурових клітин кишківника;
- вперше встановлено склад низькокалорійних дієт, за використання яких збільшується тривалість життя у експериментальних мух при модуляції TOR та IS;
- вперше з'ясовані можливі механізми впливу сигнальних систем TOR/IS/Мус у стовбурових клітинах кишечника на фізіолого-біохімічні процеси на рівні організму;
- досліджено зміни вмісту основних метаболітів у тілі експериментальних та контрольних мух, та зміни рівнів мРНК метаболічних генів.

Практичне значення отриманих результатів

Отримані дисертанткою результати розширюють сучасні уявлення про регуляторну роль сигнальних шляхів TOR, IS і транскрипційного фактору Мус у стовбурових клітинах на фізіологічний стан цілого організму, з'ясовано їх вплив на інтенсивність росту, процеси проліферації клітин, а також стійкість до стресових умов. Результати дисертаційної роботи можуть стати підґрунтям для розроблення нових підходів до лікування метаболічних порушень, а також захворювань, пов'язаних з віком.

Методичні підходи, використані у дисертаційному дослідженні, можуть бути використані для виконання курсових та кваліфікаційних робіт студентів кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника.

Особистий внесок здобувача

Дисертаційна робота є завершеною науковою працею дисертантки, яка самостійно провела аналіз літературних джерел, виконала основну частину експериментів та статистичну обробку отриманих результатів, які наведені у роботі. Дисертантка разом з науковим керівником Луцаком О.В. розробила дизайн досліджень, проаналізувала отримані результати та підготувала рукописи статей. Окремі експерименти проведені за участі аспірантки кафедри Семанок У.В.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень та висновків, сформульованих у дисертації.

Усі узагальнення та висновки, наведені у дисертаційній роботі, ґрунтуються на матеріалах власних досліджень і відображають ті закономірності, які були виявлені шляхом аналізу отриманих дисертанткою результатів. Робота виконана на високому методичному рівні із застосуванням сучасних методів досліджень, які є адекватними до поставленої мети та визначених завдань.

Усі отримані результати опрацьовані статистично за допомогою відповідних методів математичної статистики. Ґрунтовний аналіз отриманих результатів дав змогу дисертантці узагальнити результати та зробити висновки як до окремих розділів, так і до дисертаційної роботи загалом. Усі висновки повністю відповідають змісту роботи.

Повнота викладу та апробація основних результатів дисертації в наукових фахових виданнях і наукових конференціях

Аналіз показав, що результати дисертаційного дослідження Стрільбицької О. М. представлені у 10 наукових працях, 7 з яких опубліковані у фахових виданнях, які належать до науково-метричної бази Scopus, та 3 - у матеріалах наукових конференцій.

Наукові публікації за темою дисертації відповідають вимогам Міністерства освіти і науки України. Отже, основні положення дисертаційної роботи науково обґрунтовані та достатньо висвітлені у наукових публікаціях.

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота викладена на 164 сторінках друкованого тексту (основна частина – 125 сторінок) і складається із анотації, переліку умовних позначень, вступу, 5 розділів, загальних висновків, списку використаних літературних джерел та додатків. Робота проілюстрована 48 рисунками, 6 таблицями, 2 схемами та 3 додатками. Список літератури містить 232 посилання.

Актуальність досліджуваної проблеми, зв'язок дисертаційної роботи з плановими темами, мета та завдання досліджень, наукова новизна та їх практичне значення, особистий внесок дисертантки, апробація результатів

роботи, а також наявні публікації за темою дисертаційного дослідження, викладені у Вступі.

Розділ I «Сигнальні шляхи у регуляції клітинних процесів, кишковошлункового гомеостазу та старіння» містить 3 підрозділи, в яких дисертантка аналізує стан досліджуваної проблеми. Зокрема, наведено аргументи щодо можливості використання кишковошлункової дрозофіли, як моделі для вивчення механізмів функціонування стовбурових клітин, їх регенераційної здатності та її зв'язку зі старінням організму. Ґрунтовно проаналізовані літературні джерела, які характеризують особливості функціонування основних сигнальних шляхів, задіяних у регуляції клітинних процесів та старіння. Особливу увагу дисертантка приділила механізмам, які лежать в основі проліферації та диференціації стовбурових клітин кишковошлункової дрозофіли. У кінці розділу наведено коротке узагальнення, в якому наведена аргументація вибору напрямку досліджень. Розділ містить достатню кількість посилань на літературні джерела.

У Розділі II «Об'єкти і методи досліджень» описані умови утримання лабораторних ліній та схеми одержання експериментальних ліній мух, методи оцінювання фізіологічних та біохімічних параметрів їх організму. Для дослідження використані фізіологічні, біохімічні, генетичні методи, а також методи молекулярної біології та математичної статистики. Дизайн експериментів дозволяє реалізувати поставлені завдання досліджень.

Результати власних досліджень представлені у трьох розділах, що викладені на 70 сторінках. У Розділі 3 «Вплив TOR/IS/Myc у стовбурових клітинах кишковошлункової дрозофіли на фізіологічні показники *Drosophila*» наведені результати, які показали, що модуляція сигнальних шляхів TOR/IS у популяції стовбурових клітин кишковошлункової дрозофіли впливає на фізіологічний стан цілого організму. Так, активація/інгібування сигнальної системи TOR/IS у стовбурових клітинах кишковошлункової дрозофіли та ентеробластах плодових мух впливає на стійкість до стресів, споживання їжі, репродуктивну здатність та тривалість їх життя.

У Розділі 4 «Регуляція метаболічних процесів *Drosophila* шляхом зміни активності TOR/IS/Myc у стовбурових клітинах кишковошлункової дрозофіли» показано, що при інгібуванні сигнального шляху TOR/IS у невеликій популяції стовбурових клітин кишковошлункової дрозофіли та ентеробластах знижується вміст глюкози в тілі та гемолімфі мух, а при активації, навпаки, зростає. Інгібування інсулінового і TOR шляхів у стовбурових клітинах кишковошлункової дрозофіли призводить до зниження рівня триацилгліцеролів та глікогену, тоді як інгібування цих шляхів у ентеробластах призводить до підвищення вмісту вказаних метаболітів у всьому тілі плодової мушки.

У Розділі 5 «Роль TOR/IS/Myc у стовбурових клітинах у регуляції гомеостазу кишковошлункової дрозофіли» з'ясовано, що модуляція сигнальних шляхів TOR/IS та Myc не впливає на цілісність кишковошлункової дрозофіли, однак впливає на рівень мРНК генів клітин кишковошлункової дрозофіли, які кодують основні компоненти сигнальних шляхів JAK/STAT, EGFR, JNK, що свідчить про їх тісну взаємодію у контролі гомеостазу стовбурових клітин кишковошлункової дрозофіли.

У Розділі «Аналіз і обговорення» автор узагальнила отримані експериментальні дані та обґрунтувала основні положення дисертаційного дослідження, на основі яких сформульовано висновки. Наведена узагальнююча

схема дає чітке розуміння ролі сигнальної системи TOR/IS/Myc у регуляції фізіолого-біохімічних процесів у стовбурових клітинах кишківника плодової мухи.

За результатами дисертаційного дослідження зроблено 6 висновків, які ґрунтуються на основі статистичних критеріїв та повністю відповідають отриманим результатам.

Список використаних джерел містить лише іншомовні джерела, переважно опубліковані впродовж останніх 10 років, що вказує на знання дисертанткою сучасної літератури за темою дисертації.

Отже, за обсягом отриманих результатів, їх новизною як у науковому, так і практичному значенні, представлена до захисту робота відповідає вимогам кандидатських дисертацій.

Зміст автореферату є ідентичний до основного змісту дисертації.

Недоліки щодо змісту та оформлення дисертаційної роботи, окремі дискусійні питання.

Оцінюючи в загальному позитивно рецензовану роботу, все ж виникають певні зауваження щодо її оформлення та питання дискусійного характеру:

- враховуючи те, що робота подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності «біохімія», то варто керуватися рекомендаціями Українського біохімічного журналу щодо використання термінології, наприклад, писати «протеїн», а не «білок»;
- тексті дисертації йдеться про 46 рисунків, а в авторефераті про 48;
- на рисунках 4.2, 4.8, 4.14 тексту дисертації та рис. 9, 12 (Б) слід коректно вказати одиниці вимірювання концентрації глюкози в гемолімфі, а відносний рівень мРНК генів бажано представляти в ум.од;
- варто після кожного розділу не наводити список публікацій, а лише дати на них посилання;
- у тексті роботи зустрічаються невдалі вирази, орфографічні та стилістичні помилки;
- за якими критеріями обирали вміст компонентів дісти *Drosophila* при моделюванні недоїдання та голодування;
- На с. 20 йдеться про те, що «кишківник є ключовим регулятором фізіологічних процесів у дрозофіли». Чи вважає автор, що нервова система менш задіяна у регуляції фізіологічних процесів у дрозофіли;
- у плані дискусії хотілося б почути думку автора дисертаційної роботи, чи є статеві відмінності у реакціях дрозофіли на модуляцію сигнальної системи TOR/IS/Myc у стовбурових клітинах кишківника; і якщо є, то як вони будуть проявлятися.
- як можна пояснити той факт, що як активація, так і інгібування сигнального шляху TOR у стовбурових клітинах кишківника призводила до зменшення тривалості життя мух.

Вказані вище зауваження і запитання носять здебільшого рекомендаційний характер і не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи та автореферату Стрільбицької О.М.

Висновок

Підсумовуючи проведений аналіз та оцінку дисертаційної роботи й автореферату Стрільбицької Ольги Михайлівни «Регуляція фізіолого-біохімічних процесів *Drosophila melanogaster* шляхом модуляції сигнальної системи Tor/IS/Myc у стовбурових клітинах кишківника», необхідно відзначити, що дисертація є самостійною завершеною працею, в якій викладені нові експериментальні дані щодо особливостей регуляції метаболізму, стійкості до стресів, плідності, споживання їжі та тривалості життя у дрозофіли за умов активації/інгібування сигнальних шляхів Tor/IS/Myc. Отримані дисертанткою результати можуть бути використані при розробленні нових підходів у лікуванні метаболічних та асоційованих з віком захворювань.

Враховуючи все сказане вище, вважаю, що дисертаційна робота «Регуляція фізіолого-біохімічних процесів *Drosophila melanogaster* шляхом модуляції сигнальної системи TOR/IS/Myc у стовбурових клітинах кишківника» є завершеною науковою працею, яка за актуальністю проблеми, обсягом і науково-методичним рівнем виконання, новизною, практичним значенням і науковою обґрунтованістю одержаних результатів та викладених положень відповідає вимогам п. п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 (зі змінами, внесеними згідно з Постановою КМУ №656 від 19.08.2015 р.), а її автор Стрільбицька Ольга Михайлівна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент,
професор кафедри технології
біологічно активних сполук, фармації
та біотехнології Національного
університету «Львівська політехніка»,
доктор біологічних наук, старший
науковий співробітник


В. В. Гавриляк

Підпис Гавриляк В. В. засвідчує

Вчений секретар Національного
університету «Львівська політехніка»




Р. Б. Брилинський