

## Відзив офіційного опонента

на дисертаційну роботу **Кушкевич Мар'яни Василівни «Онтогенетичні зміни локалізації і вмісту клітинного пріона та його зв'язок з активністю АТФ-аз»**, поданої до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Дисертаційна робота М.В. Кушкевич присвячена цікавій проблемі, пов'язаній із роллю клітинного пріона, інтерес до якого в останні роки дещо зменшився і біологічне значення його залишається до кінця нез'ясованим. Автор роботи звернула увагу на цей цікавий біологічний феномен з нових позицій, а саме через аналіз вікових особливостей вмісту пріона і його локалізації, а також його зв'язку з транспортними системами клітини. Розрахунок був на те, що за допомогою таких підходів вдасться краще зрозуміти біологічну роль пріона в нормі і за патологічних станів. Оскільки людство ще тривалий час споживатиме традиційні продукти тваринництва, що можуть нести потенційну загрозу як джерело пріонів, підняті в дисертаційній роботі проблеми є **актуальними**.

Робота відповідає **науковій спеціальності** біохімія, хоча в ній значне місце займають гістохімічні дослідження, які виконані на високому професійному рівні.

Дисертаційну роботу **виконано** в лабораторії молекулярної біології і клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН України в рамках 2-х тем, що були безпосередньо направлені на вирішення завдань, поставлених у роботі Кушкевич М.В.

Необхідно відзначити, що в усіх статтях у списку робіт за темою дисертації дисертант є 1-м автором, що свідчить визначальний **особистий внесок** Кушкевич М.В. у виконання досліджень. Іншим позитивом рецензованої дисертації є те, що усі наукові дослідження за темою роботи виконано саме в установі, де працює здобувач. Це вказує на високий науково-методичний рівень лабораторії, в якій проводилися дослідження.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Дисертаційна робота Кушкевич М.В. була націлена на вирішення 3-х головних завдань: 1) за допомогою методу імуногістохімічного аналізу охарактеризувати у віковому аспекті локалізацію пріона в тканинах довгастого мозку і мозочка, а також у периферичних пріон-реплікувальних тканинах (порожня кишка і селезінка) і деяких інших органах (печінка, нирка, стегновий м'яз) лабораторних щурів; 2) визначити загальний вміст і спектр молекулярних форм пріона в цих тканинах щурів різного віку; 3) дослідити активність  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФаз і  $\text{Ca}^{2+}$  АТФаз та їх каталітичні характеристики з метою виявлення кореляційної залежності між віковими змінами вмісту пріона та активністю цих транспортних систем.

**Зауваження до цього підрозділу** полягає в тому, що дисертант лише назвала завдання, вирішення яких призвело до одержання принципово нових результатів, але не висвітлила конкретно суть змін досліджуваних показників.

Підрозділ «**Практичне значення одержаних результатів**» викладений у дуже загальній формі. Між тим, у дисертантка одержала Патент України на корисну модель «Спосіб виявлення тканинної локалізації клітинного пріона», про який доцільно було згадати у цьому підрозділі. Тут також сказано про «результати кореляційного аналізу між вмістом пріона й активністю іонних транспортерів та вмістом іонів», але не продемонстровано, про що можуть свідчити виявлені кореляції. Не конкретно звучить тут останнє речення «Отримані результати впроваджені у навчальний процес ЛНУ імені Івана Франка». Питання до автора - на якому факультеті, які конкретно курси чи спецкурси?

У роботі поставлено чітку **мету дослідження**, яка, однак, повторює іншими словами назву дисертаційної роботи. Для досягнення мети роботи автор запропонував вирішення **8-ти головних завдань**, які є достатньо конкретними і забезпечують краще сприйняття результатів роботи.

Під час виконання дисертаційної роботи автором використано великий арсенал **методів дослідження**, що, в цілому, адекватні спеціальності «біохімія». Крім цих методів, у роботі значне місце займають гістохімічні методи дослідження.

За одержаними результатами **опубліковано** 8 наукових статей, з них 6 статей містяться у фахових журналах у галузі біологічних наук, серед яких 1 стаття опублікована в Українському біохімічному журналі. Автор отримала Патент України на корисну модель.

**На думку опонента**, якість результатів дослідження та їх методичний рівень дозволяв дисертанту спробувати надрукувати хоча б 1 статтю у рейтинговому міжнародному журналі.

Слід відзначити якісне **оформлення та ілюстрування** автореферату дисертаційної роботи Кушкевич М.В.

Під час обробки одержаних результатів дисертанткою є використано складний 2-факторний дисперсійний аналіз, що дозволив встановити силу кореляційного зв'язку між окремим досліджуваними показниками. Завдяки цьому аналізу автор кількісно оцінила вірогідність взаємозалежності між досліджуваними показниками.

**Структура роботи** є традиційною. **Зміст роботи** розписаний досить детально. Розділ 1 «**Огляд літератури**» добре ілюстрований, що полегшує читання наведеного там матеріалу.

У Розділі 2 «**Матеріали і методи дослідження**» детально описані методи, використані в роботі, що може вказувати на добре володіння дисертанткою цими методами.

Розділ 3 «**Результати експериментальних досліджень**» викладений на стор. 46-153 і, займаючи 108 сторінок машинопису, становить основну частину тексту дисертаційної роботи. Усі наведені тут результати дослідження були піддані статистичній обробці.

Розділ 4 «**Аналіз і узагальнення результатів досліджень**» викладений на стор. 154 – 163, тобто на 10 сторінках. Тут зроблений досить ґрунтовний аналіз одержаних у роботі результатів, що також свідчить про добре знання

автором літератури з проблематики дисертації. Разом з тим, у кінці цього розділу доцільно було навести узагальнювальну схему з баченням автором роботи ймовірних і доведених експериментально біохімічних механізмів фізіологічної і патологічної дії пріона у віковому аспекті.

За результатами проведених досліджень автором зроблено **10 висновків**, які є достатньо конкретними і свідчать про великий об'єм виконаної експериментальної роботи. Разом з тим, автор надмірно вживає у Висновках до роботи відносні (відсоткові) величини. Доцільно було хоча б частину описаних змін представити не у відсотках, а в абсолютних величинах (наприклад, кількість .... на мкг білка, чи кількість перетвореного субстрату на мкг білка за одиницю часу).

**Список використаних джерел** налічує 224 найменування, із них 201 латиницею. Це свідчить про те, що проблеми, підняті в дисертаційній роботі Кушкевич М.В., в основному, досліджуються за кордоном, а не в Україні.

**Редакційні зауваження і запитання** до дисертаційної роботи:

- 1) На підставі результатів, представлених на Рис. 2 автореферату, можна зробити припущення, що автор роботи вивчала вікову динаміку вмісту пріона в різних дослідках, оскільки характер спектрів ізоформ пріона у довгастому мозку і мозочку на 6-й місяць розвитку щурів суттєво відрізняється від такого характеру, виявленого автором у цих органах тварин на 1-й і 30-й місяці життя (Рис. 3.8, 3.9 в тексті дисертації). Питання – чому так сильно відрізняються згадані вище спектри ізоформ?
- 2) Виходячи з результатів нормалізації за тубуліном вмісту окремих молекулярних форм пріона (див. Рис. 2 автореферату, Рис. 3.5 – 3.9 у дисертації), у порожній кишці, а особливо у довгастому мозку на 6-ий місяць розвитку щурів значно зростає вміст ди- і моноглікозильованої форми пріона, порівняно із 1-місячними і 30-місячними тваринами. Чим це можна пояснити?
- 3) За твердженням автора роботи, висловленим на стор. 7 автореферату, «локалізацію клітинного пріона як попередника патологічного пріона у кишечнику тварин» ніхто не вивчав до часу виконання дисертаційної роботи. Чи це дійсно так?
- 4) На рис. 3.33 дисертації наведені результати оцифрування зображень на фотографіях гістохімічних препаратів із напів-кількісним визначенням вмісту пріона у мозочку щурів різного віку. Яким був принцип цього оцифрування – слабше/сильніше забарвлення, чи наявне/відсутнє забарвлення? Якщо використовували 1-й принцип оцифрування, то чи брали до уваги загальний фон гістохімічного препарату, який може відрізнятися від одного препарату до іншого? Що тоді означають «умовні одиниці вмісту пріона»?
- 5) Як автор пояснює «встановлене зниження активності досліджуваних ензимів (АТФаз) зі зростанням віку»? Якщо порівняти залежну від віку динаміку вмісту окремих молекулярних форм пріона (див. Рис. 2 автореферату, Рис. 3.5 – 3.9 дисертації) із залежною від віку

динамікою активності АТФаз (див. рис. 7 автореферату, Рис. 3.34 а в, 3.37 а в, 3.40 а, 3.42 а в, 3.45 а, 3.48 а, 3.51 а в, 3.56 а, 3.59 а в), то така кореляційна залежність зовсім не очевидна.

- 6) У таблиці 1 автореферату (табл. 3.1 – 3.11 дисертації) «Кінетичні параметри гідролізу АТФ у тканині довгастого мозку» значення активності відповідних ензимів наведені до 3-го знаку після коми, що суттєво перевищує точність методу визначення цієї активності.

Необхідно відзначити, що багато зауважень були враховані автором дисертаційної роботи під час попереднього з нею спілкування й обговорення одержаних результатів.

**Висновок.** Дисертаційна робота **Кушкевич Мар'яни Василівни «Онтогенетичні зміни локалізації і вмісту клітинного пріона та його зв'язок з активністю АТФ-аз»** за своїм об'ємом та актуальністю, науково-практичною цінністю, методичним рівнем, проведеним аналізом і зробленими висновками відповідає вимогам ДАК МОН України до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент,  
Завідувач відділу регуляції проліферації клітин та апоптозу  
Інституту біології клітини НАН України,  
доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України



Стойка Р.С.

Львів, 20 січня 2017 р.

Підпис член-кореспондента НАН України Стойки Р.С. засвідчую:  
Учений секретар Інституту біології клітини НАН України,  
к.б.н.



Барська М.Л.