

ВІДГУК

**офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора
Волкова Романа Анатолійовича,
на дисертаційну роботу Чубик Інни Юхимівни
«Генетико-біохімічні характеристики *Mytilus galloprovincialis*
(Lamarck, 1819) в північно-західній частині Чорного моря»,
представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії
зі спеціальності 091 «Біологія»**

Актуальність обраної теми. Популяція чорноморських мідій із північно-західної частини Чорного моря (ПЗЧМ) вивчена недостатньо в порівнянні з аналогами мідій з інших морських вод. З'ясування сучасного стану популяції мідій Чорного моря потребує уточнення таксономічної ідентичності виду, вивчення генетичної структури окремих угруповань і популяцій, і в першу чергу – оцінки такого важливого показника, як рівень генетичного поліморфізму. Таким чином, актуальність дослідження не викликає сумніву.

Перша частина дисертаційної роботи Чубик Інни Юхимівни присвячена встановленню видової приналежності особин мідій і вивченню генетичного різноманіття та структури популяції мідій в ПЗЧМ за допомогою молекулярно-генетичному аналізу з використанням ДНК-маркерів. Друга частина роботи присвячена визначенню поліморфізму і тканинного розподілу ензимів, які захищають організми двостулкових молюсків від різних несприятливих впливів, за допомогою генетико-біохімічного аналізу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами

Дисертаційна робота виконувалася у період 2019-2023 рр. на кафедрі молекулярної біології, біохімії та генетики (до реорганізації 1.09.2022 р. кафедра генетики та молекулярної біології) біологічного факультету

Одеського національного університету імені І. І. Мечникова в рамках НДР «Еколого-генетичні аспекти адаптації та генетичного поліморфізму живих систем» (2021-2025 рр.) з державним реєстраційним номером 0121U109169.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації, та їх достовірність

Сформульовані у дисертації положення та висновки є достовірними та логічно випливають з наведених експериментальних даних, отриманих на вибірках мідій з північно-західної частини Чорного моря (ПЗЧМ), Балтійського, Північного та Ватового морів.

Основні положення дисертаційного дослідження є достатньо обґрунтованими, підтверджуються біоінформатичним та статистичним аналізом й співвідносяться із дослідженнями інших вчених, представленими у науковій літературі.

Наукова новизна положень, результатів та висновків дисертаційної роботи

На підставі молекулярно-генетичних даних виконаного експериментального дослідження доведено, що мідії, які розповсюджені в ПЗЧМ належать до виду *M. galloprovincialis*, тоді як види *M. edulis*, *M. trossulus* та їх гібриди з *M. galloprovincialis* відсутні. Досліджено алельне і генотипове різноманіття, визначено частоту алелів та оцінено показники генетичного поліморфізму за мікросателітними локусами на вибірках мідій ПЗЧМ та зразках мідій з Балтійського, Північного та Ватового морів. За результатами мікросателітного аналізу з'ясовано, що досліджувані угруповання молюсків ПЗЧМ мають певний рівень генетичної різноманітності та формують одну популяцію чорноморської мідії *M. galloprovincialis*. Визначено поліморфізм, тканинний розподіл та активність 13 ензимів, які забезпечують антиоксидантний захист та біотрансформацію ксенобіотиків у п'яти органах чорноморської мідії (гепатопанкреас, ктенідія, мантия, нога, мускул-аддуктор). Встановлено, що

всі досліджувані ензими є поліморфними, кожний орган відрізнявся рівнем активності ензимів та набором молекулярних форм. Однак, ці ензими виявилися неефективними для диференціації угруповань мідій з різних локацій Чорного моря.

Практичне значення отриманих результатів

Результати дисертаційної роботи впроваджено у навчальну програму підготовки докторів філософії за спеціальністю 091 «Біологія», а саме в лекційний курс «Молекулярні маркери». Отримані результати спектрів біохімічних маркерів рекомендовано залучати для вивчення різних представників роду *Mytilus*. Одержані експериментальні дані МС-аналізу можуть бути використані для ДНК-генотипування молюсків з метою створення певних відселектованих вибірок мідій *M. galloprovincialis*, що будуть мати покращені споживчі характеристики і високий адаптивний потенціал для розведення і вирощування в аквакультурі Чорного моря. Представлені в роботі дані свідчать на користь існування однієї популяції мідій *M. galloprovincialis* в ПЗЧМ, що важливо враховувати при промисловому вилові мідій.

Повнота викладу основних результатів у наукових фахових виданнях

Результати дисертаційного дослідження викладені у чотирьох статтях, три з яких у журналах, які індексуються в наукометричній базі Scopus та одна – в українському фаховому журналі категорії «Б», а також у восьми тезах та матеріалах міжнародних наукових конференцій.

Загальна характеристика роботи

Робота викладена на 159 сторінках друкованого тексту, містить об'ємний табличний матеріал та досить повно проілюстрована. Складається із вступу, шести розділів, узагальнення, висновків та додатків. Список використаних джерел літератури містить 257 найменувань, більшість з яких англomовні.

Відсутність порушень академічної доброчесності

Розгляд дисертації Чубик Інни Юхимівни показує, що робота є самостійно виконаною та завершеною науковою працею. Основні результати, нові наукові положення та висновки, сформульовані у дисертації, оприлюднені в наукових працях, зарахованих за темою дисертації; порушень академічної доброчесності в роботі не виявлено.

Під час ознайомлення з дисертаційною роботою виникли певні зауваження та запитання, а саме:

1. Виникає питання стосовно послідовності аналізу літературних джерел в розділі 1. На думку опонента «Огляд літератури» варто було розпочати з інформації про таксономічне положення, географічне розповсюдження (підрозд. 1.2) та морфологічні особливості (підрозд. 1.6) досліджуваних молюсків. Далі обговорити біохімічні маркери (підрозд. 1.4) і завершити огляд відомостями про особливості організації геному (підрозд. 1.5), молекулярно-генетичні маркери (підрозд. 1.3) та генетичний поліморфізм в популяціях двостулкових молюсків (підрозд. 1.1).

2. Назва підрозділів 1.1 та 1.4 в огляді літератури видається дещо невдалою, адже проаналізована інформація охоплює більш широке коло питань, ніж зазначено у назвах.

3. У підрозділі 1.4 зазначено, що «Зараз біохімічні маркери витіснені більш інформативними – ДНК-маркерами. Проте, як і раніше залишаються одними з найшвидших та найдешевших систем маркерів, що розробляються, і залишаються дієвим інструментом для проектів, які потребують лише виявлення низьких рівнів генетичних варіацій». Опонент не може погодитись з таким баченням. По-перше, використання ДНК маркерів в багатьох випадках є дешевшим, ніж застосування біохімічних маркерів, особливо при широкомасштабному використанні. По-друге, перевага ДНК-маркерів полягає у тому, що ДНК технології, на яких вони ґрунтуються, є більш універсальними,

простішими у виконанні та такими, що забезпечують високу відтворюваність та надійність результатів. Відповідно, опонент вважає, що дисертаційна робота виграла б, якщо б ДНК маркери були використані більш широко за рахунок скорочення досліджень ферментних маркерів.

4. На ст. 30 мова іде про геномне секвенування, але не зрозуміло, маються на увазі мітохондріальні чи ядерні геноми.

5. Декілька методик у розділі «Методи дослідження» наведено занадто детально. Наприклад, (i) описано виділення ДНК з використанням комерційних наборів. Опонент вважає, що такий опис є надлишковим і по суті являє скорочений переклад стандартних інструкцій до наборів; (ii) на ст. 51 детально описано приготування розчинів для електрофорезу, хоча загальноприйнято просто вказувати концентрації розчинів, які було використано.

6. На ст. 63 вказано: «Всі досліджувані особини мідій з локацій (A, B, C, D, E, F) Чорного моря характеризувалися алелями розміром 126 п.н.». Питання: чи було проведено секвенування отриманого ПЛР-продукту? Аналогічне зауваження стосується і ПЛР-продуктів, які згадуються наприкінці ст. 65.

7. На рис 4.2 представлена дендрограма, яка викликає ряд запитань. По-перше, чому на дендрограмі наведено лише послідовності з Генбанк і не проведено сиквенування відповідних ділянок геному для проаналізованих у дисертації зразків мідій? По-друге, для побудови дендрограми використано метод UPGMA, який зазвичай не прийнято застосовувати у філогенетичних дослідженнях. Загальновизнаним стандартом є використання методу Maximum Likelihood. Прохання пояснити, чому цей метод не був використаний у дисертації. По-третє, рівень статистичної підтримки (бутстреп індекс) для більшості груп не перевищує 50. Загальновідомо, що такі значення є низькими і вказують на недостовірність виділення відповідних груп на філогенетичному

дереві, і тому такі групи зазвичай не наводяться. Загальний висновок, який можна зробити з аналізу дендрограми, полягає в тому, що застосований підхід не дозволяє достовірно відтворити філогенію досліджуваної групи.

8. Прохання пояснити, для чого у дисертацію було включено розділ 4.2. «Аналіз структури адгезивного білка *Mytilus galloprovincialis*». На думку опонента, викладена в цьому розділі інформація не прямого має відношення до теми дисертації.

9. У розд. 6 (ст. 99-100) наведено текст, який по суті являє собою аналіз публікацій інших авторів. Ці фрагменти тексту варто було би перенести у розділ «Огляд літератури».

10. На ст. 109 зазначено, що «у гепатопанкреасі пероксиди нейтралізуються в першу чергу за допомогою глутатіонпероксидази і каталази, у ктенідіях – пероксиредоксинами». Прохання пояснити, які саме пероксиди маються на увазі. Чи мова йде виключно про пероксид водню?

11. Якість кількох фотографій, які наведено у розділі 6.1, є недостатньою, що не дозволяє розрізняти всі ізоформи. Зокрема, рецензент не може погодитися з інтерпретацією рис. 6.3, 6.4, 6.6, 6.7, 6.8. На мою думку, на гелі наявно набагато менше ізоформ, ніж вказано на схемах під позначкою «В». В кількох випадках якість розділення можна було би покращити, якщо збільшити час проведення електрофорезу. Чому умови проведення електрофорезу не було оптимізовано у попередніх експериментах? Чи не варто було провести сканування отриманих гелів для покращення ідентифікації ізоформ?

Дрібні зауваження.

- У таблиці 2.1 вказано «Біля бельгійського / німецького узбережжя». На думку опонента стилістично краще вказувати: «Біля узбережжя Бельгії / Німеччини».

- У розділі 2.2.3 зазначено «... із обраної на сервері UniProt амінокислотної послідовності (Q27409) була побудована модель тривимірної структури **гена** адгезивного білка ноги мідії». Вочевидь, слово «гена» необхідно видалити, адже мова йде про амінокислотну послідовність.
- При визначенні активності ензимів необхідно приймати до уваги вміст білка у пробі. На жаль, в розділі «Методи дослідження» відсутня інформація про застосований метод визначення вмісту білка.
- На ст. 65 ідентичний фрагмент тексту («За даним молекулярно-генетичного аналізу...» і далі) довжиною чотири рядки повторюється двічі - перед та після рис. 3.3.

Проте, наведені вище зауваження та запитання мають уточнюючий характер, не є критично важливими, не ставлять під сумнів зроблені висновки і не зменшують наукову цінність дисертаційної роботи.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Чубик Інни Юхимівни «Генетико-біохімічні характеристики *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) в північно-західній частині Чорного моря» є завершеною науковою працею, яка має теоретичну та практичну цінність.

Аналіз дисертаційної роботи показує, що за своєю актуальністю, науковою новизною, обсягом зібраного експериментального матеріалу, достовірністю отриманих результатів та обґрунтованістю висновків дисертація Чубик Інни Юхимівни «Генетико-біохімічні характеристики *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) в північно-західній частині Чорного моря» цілком відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора

філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 44 12 січня, 2022 року, а її авторка – Чубик Інни Юхимівни заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент

завідувач кафедри молекулярної генетики
та біотехнології Чернівецького національного
університету імені Юрія Федьковича,
доктор біологічних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки України



Роман ВОЛКОВ

