

13 БЕР 2019

Вх. № 84/03-07

Відзив офіційного опонента

на дисертаційну роботу Пиршева Кирила Олександровича «ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ ЛІПІДІВ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ЗА АПОПТОЗУ ТА ЕРИПТОЗУ»,

поданої до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія.

З часу публікації основоположної статті, в якій було показано участь ліпідів плазматичної мембрани в апоптозі (Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol. 1992. Vol. 148, N7. P. 2207-2216), протягом останніх 2-х десятиліть нічого принципово нового у з'ясуванні ролі ліпідів в апоптозі не відбулося. У значній мірі це пов'язане із відсутністю зручних біохімічних тестів та інструментальних методів, оскільки ліпіди не є імуногенними, на відміну від білків, і практично ідентичні у переважній більшості евкаріотичних клітин.

У дисертаційній роботі Пиршева К.О. вперше показано, що ліпіди плазматичної мембрани відіграють роль не лише маркерів для розпізнавання апоптичних клітин макрофагами внаслідок втрати трансмембральної асиметрії, але й підкреслюється вплив ліпідів мембран органел на формування загальної структури поверхні мембрани таких клітин. Це відбувається через зниження вмісту Lo-подібної фази ліпідів, виявлене дисертантом у зовнішньому моношарі клітинних плазматичних мембранах на ранніх етапах запрограмованої загибелі клітин лінії HeLa. Варто відзначити, що такі зміни спостерігали при залученні механізмів апоптозу за участю сигнального шляху, пов'язаного з каспазою-3. В моделі клітинної загибелі без'ядерних клітин (еритроцитів) така динаміка ліпідів не виявлена, що свідчить про важливу роль обміну мембраними компонентами між структурами ядерних клітин навіть наприкінці їх життєвого шляху. Оскільки апоптоз відіграє суттєву роль під час різноманітних процесів нормального розвитку і в більшості патологічних процесів, дисертаційна робота Пиршева К.О., присвячена специфічним механізмам апоптозу, є **актуальним дослідженням**.

Відповідність роботи спеціальності. Дисертаційна робота Пиршева К.О. містить достатньо експериментального матеріалу, який науково-методично відповідає спеціальності «03.00.04 – біохімія», хоча в роботі також достатньо даних «біофізичного» та «біоорганічного» характеру. Необхідно підкреслити, що в наш час саме такі міждисциплінарні роботи найкраще сприймаються науковою громадськістю.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у Лабораторії нанобіотехнологій Відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України

протягом навчання аспірантурі (2011–2015 р.р.) згідно планів досліджень лабораторії за бюджетними темами «Розробка оптичних біосенсорів на основі сучасних нанотехнологій» (№ держреєстрації 0110U002699, 2010-2012 рр.) і «Дослідження флуоресцентних нанокомпозитів і їх взаємодія з клітинними мембранами» (№ держреєстрації 0113U003202, 2013-2015 рр.). Частину роботи виконано під час стажування дисертанта в університеті Страсбурга, CNRS та ANR JCJC (ANR-11-JS07-014-01), за програмою SCOPES (2012-2014 р.р.), за грантом SNF (2-77280-11), а також за підтримки короткотривалих стипендій EMBO (ATSF 461-2015) і Fulbright Research and Development Program (IE Grantee ID E0579608). Ці візити дисертанта до наукових лабораторій західних країн свідчать про набуття ним значного досвіду роботи за кордоном. Вони дозволили йому налагодити широкі наукові контакти, які без сумніву, стануть в пригоді у його майбутній кар'єрі.

Наукова новизна одержаних результатів є добре зrozумілою. Дисертант вперше встановив взаємозв'язок між вмістом Lo-подібної фази ліпідів у зовнішньому моноліті плазматичної мембрани клітин на ранніх етапах їх запрограмованої загибелі та активністю ініціаторної каспази-3, що вважається одним із пускових елементів апоптозу. Крім того, вперше проведено системне порівняння особливостей апоптозу ядерних клітин та еритроцитів безядерних червоних клітин крові у розрізі змін в складі ліпідів їхніх мембрани. На відміну від ядерних клітин, де за апоптозу зменшується щільність компактизації ліпідів (зокрема, в ділянках утворення апоптичних тілець), в еритроцитах відбувається ущільнення супрамолекулярної структури ліпідів мембрани. Внаслідок збільшення щільноті пакування ліпідів в еритроцитах в них зменшується проникність плазматичної мембрани для наночасточок, а також зменшується швидкість кислотного гемолізу, порівняно з цими показниками в ядерних клітинах ліній HeLa та Jurkat. Вперше показано, що порушення асиметрії фосфоліпідів в плазматичній мембрани клітин як за апоптозу (клітини лінії Jurkat) так і еритроциту (еритроцити людини) зачіпає не лише фосфатидилсерин, але й фосфатидилетаноламін. Ці результати дозволяють краще зrozуміти біологічну роль ліпідної компоненти плазматичної мембрани під час апоптозу.

Науково-практична цінність роботи. Станом на сьогоднішній день, рецензована робота не має прямого виходу в практику, проте окремі висновки, що витікають з її результатів, все ж можуть знайти застосування у біотехнології та медичній діагностиці. Це стосується використання нових флуоресцентних зондів для дослідження властивостей ліпідних фаз мембрани, а також застосування нових підходів з використанням тонкошарової хроматографії і протокової цитометрії для реєстрації асиметрії локалізації окремих фосфоліпідів в біологічних мембранах. Такі підходи повинні бути корисними для оцінювання життєздатності клітин при нейродегенеративних та автоімунних захворюваннях, а також інших патологічних станах із підвищеним рівнем апоптозу.

Апробація результатів дисертації. Дисертаційна робота Пиршева К.О. пройшла достатню апробацію на чисельних міжнародних конференціях, на більшості з яких її автор був присутній і мав усні чи стендові доповіді.

Мета роботи, на думку опонента, сформульована занадто загально, дуже лаконічно і не відображає усіх нюансів дисертаційної роботи. Автор стверджує «*Метою дослідження було вивчення структурної організації ліпідів мембрани еритроцитів та ядерних клітин за умов їх запрограмованої загибелі*». Замість старого штампу «структурно-функціональних властивостей» тут краще було конкретизувати завдання, наприклад, вказавши у меті «*Провести пошук взаємозв'язку між станом ліпідів у зовнішньому моноліті плазматичної мембрани клітин та активністю ініціаторної каспази-3 та іншими змінами в клітинах, індукованих до запрограмованої загибелі, а також порівняти особливості цих змін в еритроцитах та ядерних клітинах*».

У дисертаційній роботі вирішували **6 основних завдань**, які чітко сформульовані й були необхідними для досягнення поставленої мети.

Методи дослідження, використані під час виконання дисертаційної роботи, є достатньо різноманітними, але в цілому адекватні спеціальності 03.00.04 – біохімія. Необхідно відзначити застосування в роботі високоточних інструментальних фізичних методів дослідження, які стали доступними завдяки широкій міжнародній співпраці, налагодженій лабораторією нанобіотехнологій, а також особистій ініціативі і таланту дисертанта, який підготував успішні проекти для підтримки молодих вчених міжнародними фундаціями.

За результатами досліджень автором зроблено **7 висновків**, які відповідають отриманим результатами дисертаційної роботи.

У списку робіт, опублікованих за результатами дисертаційної роботи, налічується 20 наукових праць, з яких 5 статей, усі з яких опубліковані у міжнародних періодичних фахових наукових виданнях з високим імпакт-фактором, причому у 2-х із цих статей дисертант є 1-м співавтором. Разом з тим, не слід було відкидати можливість друку 1-2 статей у вітчизняних наукових журналах для підвищення їх престижу та ознайомлення ширшого загалу вчених України з результатами проведеного дослідження.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 156 сторінках машинописного тексту і містить «Вступ», «Огляд літератури», опис «Матеріалів і методів дослідження», розділ «Результати та обговорення власних досліджень», «Підсумок та узагальнення результатів дослідження», «Висновки», «Список використаних джерел» (260 посилань). Робота містить 54 рисунки.

Особистий внесок здобувача добре зрозумілий з коментарів до результатів його співпраці за темою дисертаційної роботи.

Вступ написаний чітко і тут охарактеризовано наукову проблему виконаної роботи, зокрема обґрунтовано актуальність теми.

Огляд літератури містить детально систематизовану інформацію, що інколи відволікає читача від основного предмета дослідження. В кінці Огляду літератури на 2/3 сторінки наведене описове узагальнення результатів

досліджень за темою роботи та існуючих проблем. Це узагальнення доцільно було б доповнити схемою структурно-функціональних взаємовідносин ліпідів в складі клітинних мембран і плазматичної мембрани, зокрема.

Матеріали і методи дослідження описані детально. Разом із тим, назви зондів та барвників: FITC-DEVD-FMK, Fluo-4, PA, NR12S, bNR10S, NR12S+bQ10S, F2N12S, F2N12SM, FC12SM необхідно було розкрити шляхом внесення інформації, що стоїть за наведеними скороченнями.

Результати експериментальних досліджень. Виклад результатів є занадто деталізованим, наприклад: 3.2.2.1. Вивчення біохімічних та біофізичних змін в клітинах 3.2.2.2. Візуалізація змін порядку ліпідів зовнішнього моношару плазматичної мембрани за апоптозу та еріптоzu Від такої деталізації губиться відчуття головного.

Узагальнення результатів досліджень та їх аналіз написані дуже скоро (всього 3,5 сторінки). Дано міждисциплінарна робота вимагає більш детального аналізу й обговорення великого об'єму наведених результатів дослідження.

Висновки (7 пунктів) написані грамотно і, в цілому, відповідають одержаним у дисертаційній роботі результатам дослідження.

У списку використаних джерел - 260 посилань, усі з яких, за винятком 1-го, англомовні. Більшість посилань стосується свіжих джерел літератури.

Крім уже висловлених вище зауважень до окремих частин дисертаційної роботи, в опонента є деякі інші **зауваження**, у т.ч. редакційні, а також ряд **запитань і побажань**, які викладені нижче.

1. Рецензована дисертаційна робота могла суттєво виграти, якщо б її автор не обмежився клітинами лінії HeLa для обґрунтування свого найбільш принципового висновку про взаємозв'язок зміни патерну ліпідів зовнішнього шару плазматичної мембрани клітин, індукованих до апоптозу, із підвищеною активністю ініціаторної каспази-3. Щоб таке принципове положення було сприйняте широкою науковою громадськістю, автору необхідно було, по-перше, використати кілька ліній евкаріотичних клітин і, по-друге, показати, як буде себе вести зовнішній ліпідний шар у клітинах із дефіцитом каспази-3. Такі клітини не є рідкістю, наприклад, це клітини лінії MCF-7 аденокарциноми молочної залози людини. До речі, подібна підказка була зроблена дисертанту і його науковому керівнику, коли їм було надано відбиток нашої статті (Bilyy, R. O., Shkandina, T., Tomin, A., Muñoz, L. E., Franz, S., Antonyuk, V., Kit, Y. Y., Zirngibl, M., Fürnrohr, B. G., Janko, C. et al. (2012). Macrophages discriminate glycosylation Patterns of apoptotic cell-derived microparticles. Journal of Biological Chemistry 287, 496-503), де описаний подібний експеримент, в якому після індукції апоптозу, що супроводжувалася активацією каспази-3, відбувалася активація мембрано-асоційованої нейрамінідази. У цій роботі в клітини лінії MCF-7, дефіцитні по гену

каспази-3, було введено цей ген (трансфекція) і, таким чином, доведено, що саме каспаза-3 задіяна в активації нейрамінідази.

2. На стор. 117 тексту дисертації стверджується «Ці спостереження дозволяють припустити, що крім обміну ліпідами між моношарами плазматичної мембрани за допомогою скрамблази, може мати місце обмін ліпідними компонентами між плазматичною та внутрішніми мембранами за апоптозу». У чому полягає новизна такого твердження, враховуючи зокрема дані статті Bilyuy, R. O. et al., Journal of Biological Chemistry, 2012, 287, 496-503 та інших наукових статей на цю тему.
3. У Висновку 1 сказано «На зміну властивостей мембрани також може впливати інгібітор каспази-3 Z-DEVD-FMK, залишаючи їх на рівні, подібному до інтактних клітин». У тесті дисертації говориться «Дані протокової цитометрії вказують на те, що порядок ліпідів плазматичної мембрани за індукції апоптозу камптометричною корелює із активністю каспази-3 та динамікою PS протягом всього часового діапазону (0-24 год)». На нашу думку, доцільно було не обмежуватися використанням інгібітора каспази-3, а для більш повної картини доповнити ці результати даними про те, як ведуть себе інші біохімічні показники апоптозу, наприклад, каспаза-9 чи репараційний ензим PARP-1.

Редакційні зауваження:

1. Дещо дивно звучать назви деяких підрозділів, наприклад, «Зонди не специфічні до моношару» (стор. 80), що є явним лабораторним сленгом.
2. У Висновку 4 автор вказує «спостерігається *незначне збільшення* упорядкування плазматичної мембрани за ериптозу». Хочеться побажати дисертанту уникати в майбутньому використання такого невизначеного терміну, як «*незначне збільшення*», бо зміни бувають або статистично достовірними, або це взагалі не зміни.
3. На стор. 22 тексту дисертації написано «Ці знання можуть бути застосовані для визначення *нових незалежних маркерів апоптозу та ериптозу*». Що мав на увазі автор під словами «*нових незалежних маркерів апоптозу*»?

Звичайно, ці редакційні зауваження нескладно виправити і тому вони не мають вирішального значення під час оцінки дисертаційної роботи Пиршева К.О.

Висновок. За актуальністю теми, методичним рівнем проведених досліджень, їх об'ємом, науковим і науково-практичним значенням одержаних результатів, а також адекватністю проведеного в роботі аналізу і відповідністю зроблених висновків, дисертаційна робота Пиршева К.О. на тему «**ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ ЛІПІДІВ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ЗА АПОПТОЗУ ТА ЕРИПТОЗУ**» відповідає вимогам ДАК МОН України до кандидатських дисертацій, а

висловлені опонентом зауваження не є підставою для заперечення високої оцінки цієї роботи. Вважаю, що автор дисертаційної роботи заслуговує присудження йому 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, 12 березня 2019 р.

Підпис члена-кореспондента НАН України Стойки Р.С. засвідчує:
Вчений секретар Інституту біології клітини НАН України,
к.б.н. Барська М.Л.

