

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу *Пиршева Кирила Олександровича «Особливості структурної організації ліпідів плазматичної мембрани за апоптозу та ериптозу»*, поданої до захисту в спеціалізовану вчену раду Д 26.240.01 Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Актуальність теми. Тривалий час ліпіди клітинних мембран розглядалися виключно як середовище для заякорення протеїнів, створення бар'єрів для розділення біохімічних процесів у клітинах, а також у якості сигнальних молекул. Роботи Кая Сімонса (Kai Simons, and Elina Ikonen. "Functional rafts in cell membranes." *Nature* 387.6633 (1997): 569) та Михайла Богданова (Mikhail Bogdanov and William Dowhan. "Phosphatidylethanolamine is required for in vivo function of the membrane-associated lactose permease of *Escherichia coli*." *Journal of Biological Chemistry* 270.2 (1995): 732-739.) продемонстрували наявність латеральної гетерогенності (мікродоменів) в плазматичній мембрані живих клітин, а також значну роль ліпідів у забезпеченні правильної топології протеїнів та поклали основу сучасної біології мембран. Незважаючи на роки детальних досліджень, все ще не сформована цілісна картина структурних особливостей організації мембран за основних процесів життєвого циклу клітин.

Апоптоз є складним фундаментальним феноменом, важливим для функціонування організму вцілому. В свою чергу процес клітинної загибелі еритроцитів, або ериптоз, сприяє появі низці ознак, які роблять його подібним до апоптозу, обмеженого плазматичною мембраною. Однак, з моменту публікації статті Валері Фадок (Fadok, V. A., et al. "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." *The Journal of Immunology* 148.7 (1992): 2207-2216.) уявлення про структурну організацію ліпідів мембран за клітинної загибелі не змінилося суттєвою мірою

У дисертаційній роботі Пиршева К.О. показано порушення асиметрії ліпідів плазматичної мембрани, що має місце як за апоптозу так і за ериптозу. Водночас, спостерігається і суттєва різниця між цими процесами, що відображається у впливі ліпідів мембран органел ядерних клітин (HeLa та Jurkat) на формування властивостей їх плазматичної

мембрани за апоптозу, а також у високій щільності пакування ліпідів плазматичної мембрани еритроцитів внаслідок їх повільної динаміки за ериптозу.

Сучасні дослідження процесів в живих клітинах вимагають нових чутливих малоінвазивних підходів, якими і є різні методи флуоресцентного мічення, залучені до даної роботи. Дисертант повною мірою використав цю інструментарію як для селективної так і неселективної характеристики моношарів ліпідних мембран.

Відповідність роботи спеціальності 03.00.04 – біохімія. Дисертаційна робота Пиршева К.О. містить велику кількість міждисциплінарних підходів та даних «біохімічного», «біофізичного», «клітинного біологічного» чи «біоорганічного» характеру, що відповідає сучасним науковим тенденціям. Водночас, у роботі достатньо і експериментального матеріалу, який науково-методично відповідає спеціальності «біохімія».

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами лабораторії. Дисертаційна робота виконувалася в межах наукових тем лабораторії нанобіотехнологій відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ: “Розробка оптичних біосенсорів на основі сучасних нанотехнологій” (№ держреєстрації 0110U002699, 2010-2012 рр.) та “Дослідження флуоресцентних нанокompозитів і їх взаємодія з клітинними мембранами” (№ держреєстрації 0113U003202, 2013-2015 рр.). Окрім цього, під час стажувань у Страсбурзькому Університеті експерименти виконувалися за підтримки проектів CNRS та ANR JCJC (ANR-11-JS07-014-01). Експерименти в Швейцарії були проведені за рахунок гранту для наукової співпраці SCOPES 2012-2014 рр. (SNF grant 2-77280-11), а також персональної стипендії стипендії EMBO (ATSF 461-2015). Дослідження в США були підтримані престижним грантом Fulbright Research and Development Program (IIE Grantee ID E0579608).

Мета та задачі дослідження. Мета роботи сформульована дещо загально, хоча і повністю відображає зміст представленої роботи. В свою чергу, 6 поставлених завдань сформульовані більш чітко та цілком відповідають меті дослідження.

Методи дослідження представлені сучасними підходами до роботи з клітинними мембранами із застосуванням новітнього обладнання та відповідають спеціальності 03.00.04 – біохімія.

Наукова новизна одержаних результатів. В дисертаційній роботі Пиршева Кирила вперше встановлено наслідковий зв'язок між сигнальним шляхом, пов'язаним з активністю каспази-3 та зниженням вмісту рідинно-впорядкованої фази ліпідів у зовнішньому моношарі плазматичних мембран на ранніх етапах запрограмованої загибелі клітин. Встановлено порушення асиметрії розподілу фосфатидилетаноламіну та фосфатидилсерину в плазматичній мембрані клітин за апоптозу та ериптозу. Показано, що на організацію ліпідів плазматичної мембрани ядерних клітин впливають мембрани їх органел, змінюючи тим самим структуру мембран досліджених клітин за апоптозу. Вперше продемонстровано особливості щільність-залежної організації ліпідів плазматичної мембрани еритроцитів за ериптозу, яка призводить до їх стійкості до гемолізу. Таким чином, в роботі доведено суттєву різницю між процесами, що визначають структурно-функціональні властивості плазматичної мембрани клітин за апоптозу та ериптозу.

Практичне значення. Представлена робота є фундаментальним дослідженням, в процесі виконання завдань якої, дисертант розробив новітні підходи для моніторингу асиметрії фосфатидилсерину/фосфатидилетаноламіну та реєстрації структурних властивостей ліпідних фаз зовнішнього моношару мембран. Ці підходи можуть використовуватися в прикладних біомедичних дослідженнях; зокрема вони можуть стати основою для новітньої клінічної діагностики клітин крові при захворюваннях, що пов'язані з порушеннями в процесах апоптозу та ериптозу.

Апробація одержаних результатів. Результати дисертаційної роботи Пиршева К.О. були представлені на 15-ти міжнародних конференціях та на семінарах провідних лабораторій України, Франції, Сполучених Штатів Америки, Швейцарії, тощо. За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових праць. Серед них 5 статей у іноземних фахових рецензованих рейтингових наукових журналах, які включені до 1 квартилю згідно Scientific journal ranking та мають високий імпакт фактор. Варто відзначити, що одна зі статей дисертанта була включена до спеціальної колекції серії журналів *Biochimica et Biophysica Acta* за тематикою запрограмованої загибелі клітин, а графічна анотація до статті обрана у якості обкладинки колекції.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота представлена у класичному вигляді та складається з анотацій, переліку публікацій, вступу,

огляду літератури, опису матеріалів і методів, розділів результатів та обговорення власних досліджень, узагальнення отриманих даних, висновків. Перелік посилань налічує 260 найменувань, серед яких близько 30% представлено роботами, що були опубліковані за останні 10 років; більше 75% статей опубліковані після 2000 року. Робота добре проілюстрована та налічує 54 рисунки.

Особистий внесок здобувача добре викладений у «Вступі» дисертації та додатково детально описаний для кожної з опублікованих статей у додатку 1.

У **вступі** чітко сформульовано наукову проблему дослідження та викладено актуальність теми.

В **огляді літератури** наводиться детальна актуальна інформація щодо будови та функцій біологічних мембран. Представлені відомості про роль ліпідів у нормальному функціонуванні клітин та їх залученні до патологічних станів. Окремо представлені відомості про запрограмовану загибель ядерних клітин та еритроцитів, а також про сучасні методи дослідження мембран.

Матеріали і методи дослідження детально описують постановку експериментів та надають додаткові відомості про експериментальні підходи залучені для моніторингу властивостей мембран. Варто відзначити, що всі клітинні експерименти із застосуванням мікроскопії проводилися у фізіологічних розчинах за температури 37°C, що дозволило спостерігати процеси клітинної загибелі в умовах, наближених до природніх.

Результати експериментальних досліджень викладені детально та описують отримані дані щодо змін організації різних клітинних мембран за апоптозу та ериптозу, модельних експериментів із залученням ліпосом та контрольних експериментів з залученням хімічних чинників, які впливають на структуру мембран.

Узагальнення результатів досліджень та їх аналіз дозволяють оцінити експериментальний внесок здобувача та місце отриманих результатів в контексті сучасних знань про зміни організації клітинних мембран за апоптозу та ериптозу.

Висновки складаються з 6 пунктів, що загалом відповідають завданням дисертаційної роботи та описують розроблені методи та одержані результати.

Варто відмітити, що сильною стороною дисертаційної роботи є значний обсяг проведених експериментів та застосування новітніх експериментальних підходів, що доповнюють один одного. Загалом, дисертація демонструє високий рівень кваліфікації автора, його володіння сучасними методами, та його здатність аналізувати власні результати та узагальнювати їх.

Позитивно оцінюючи дисертаційну роботу в цілому, слід висловити наступні зауваження та запитання, що виникають до змісту і оформлення дисертації.

1. В ході досліджень структури плазматичної мембрани еритроцитів та ядерних клітин (HeLa та Jurkat), автором було показано, що мембрана перших мала початково менший вміст рідинно-впорядкованої фази та повільнішу динаміку ліпідів за клітинної загибелі. Ці цікаві результати описуються, але не коментуються. Які механізми можуть бути задіяні в підтриманні меншого вмісту рідинно-впорядкованої фази в еритроцитах? Про що може свідчити непропорційність змін ліпідних фаз в ядерних та без'ядерних клітинах за клітинної загибелі? До яких функціональних відмінностей між ядерними та без'ядерними клітинами може призводити різна організація їх мембран?
2. Із роботи залишається незрозумілим чим в біологічному сенсі відрізняються екстерналізація фосфатидилетаноламіну та фосфатидилсерину? Тому частина роботи, що досліджує екстерналізацію фосфатидилетаноламіну виглядає не зовсім мотивованою. Чи є ґрунтовне пояснення для причини дослідження асиметрії фосфатидилетаноламіну?
3. Метод визначення асиметрії фосфоліпідів мембран із використанням молекули TNBS виглядає доволі перспективним, однак, на мою думку, в роботі представлена недостатня кількість відповідних контрольних досліджень для валідації методу. Чи досліджувався вплив анексину 5 на взаємодію молекули TNBS із фосфатидилсерином? Чи може анексин 5 зв'язуватися із фосфатидилетаноламіном?
4. Дисертант розробив FRET-систему для визначення «структурно-механічних» властивостей мембран клітин. Водночас, незрозуміло які саме «структурно-механічні» властивості було досліджено в наведених дослідках?

5. В роботі показано апоптотичні тільця із вмістом менших везикул, що потенційно можуть мати інший склад та організацію ліпідів. Чи не можуть вони бути близько до поверхні більшої везикули та призводити до артефактів при вимірах складу мембран апоптотичних тілець?
6. Частина «Висновків» є коротким повторенням методів та результатів. На моє переконання «Висновки» повинні формалізувати основні положення, що доведені автором на основі його результатів. Окрім цього в тексті присутня ціла низка граматичних та стилістичних помилок та русизмів. Наприклад: «гангліозід» (стор. 17); «фосфатидилінозітолу» (стор. 46); «розсіяння» (стор. 50, 66); «при збудженні» (стор. 57, 83), «Будучі» (стор. 127) тощо.

Загальний висновок

Аналіз матеріалів дисертації *Пиршева Кирила Олександровича «Особливості структурної організації ліпідів плазматичної мембрани за апоптозу та ериптозу»* за спеціальністю 03.00.04 — біохімія, свідчить про те, що дисертаційна робота є завершеною, самостійно виконаною системною науковою працею. В представленій до захисту дисертаційній роботі одержано нові, важливі як у теоретичному, так і в практичному аспекті результати, які можуть бути основою для подальших досліджень. Наукові положення, висновки і рекомендації, які сформульовані у дисертації й авторефераті дисертаційної роботи, достатньо повно викладені в опублікованих працях. Дисертаційна робота в достатній мірі апробована на наукових семінарах і конференціях державного і міжнародного рівнів. Зміст автореферату ідентичний до основних положень дисертації.

Враховуючи все вищесказане, вважаю, що дисертаційна робота *Пиршева Кирила Олександровича*, присвячена дослідженню структурної організації ліпідів плазматичної мембрани за клітинної загибелі є цілісною, закінченою науковою працею. Вона відповідає вимогам п.п. 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами затвердженими згідно з постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 року та № 567 від 27.07.2016 р.), що висуваються до кандидатських дисертацій, а *Пиршев*

Кирило Олександрович заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент

доктор біологічних наук, професор
завідувач відділу молекулярної біофізики
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця
НАН України



Білан П.В.

ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О.О. Богомольця
НАН України

Підпис

Засвідчую.

Вчений секретар

П.В. Білан

В.І. Партусевич