

## Відзив офіційного опонента

на дисертаційну роботу Успенської Катерини Романівни «**МЕХАНІЗМИ СИГНАЛЮВАННЯ ТА БІОЛОГІЧНА РОЛЬ НІКОТИНОВИХ АЦЕТИЛХОЛІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ У МІТОХОНДРІЯХ**», поданої до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія.

Дисертаційна робота Успенської К.Р. присвячена **актуальній проблемі** – поглибленій біохімічній характеристиці нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChR), які локалізовані на поверхні збудливих клітин, беручи участь у передачі сигналів у нервово-м'язових або нервових синапсах і, разом з тим, виявлені також у різних незбудливих клітинах, де їхня біологічна роль є менше дослідженою. У лабораторії імунології клітинних рецепторів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, де виконувалася ця робота, раніше було показано, що окремі типи nAChR містяться на зовнішній мембрані мітохондрій, де вони можуть регулювати вивільнення цитохрому С, що ініціює апоптоз. Виявлення такої дещо несподіваної функції мітохондріальних nAChR відкриває нові шляхи медикаментозної регуляції процесів регенерації тканин, запалення, імуномодуляції та ін.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу виконано у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України протягом 2014–2018 рр. у рамках планових досліджень за бюджетною темою: «Вивчення структури і функцій протеїнів і пептидів та їх використання для біомедицини» (ДР№ 0114U003216, 2014-2018 р.р.). Необхідно підкреслити, що частину роботи було виконано за підтримки Федерації Європейських біохімічних товариств (ФЕБС), що надала короткотермінову стипендію для проведення дослідження в лабораторії Інтегративної нейробиології холінергічних систем відділу нейронаук Інституту Пастера (Париж, Франція).

**Наукова новизна одержаних результатів** добре зрозуміла. Дисертанткою вперше встановлено, що сигналювання мітохондрійних nAChR, на відміну від сигналювання nAChR на поверхні клітини, відбувається за іон-незалежним механізмом за допомогою конформаційних змін молекули рецептора. Авторка дослідила унікальний біохімічний механізм, коли різні субодиниці nAChR виявляють здатність активувати різні сигнальні шляхи в клітині. Також вперше було висловлено гіпотезу, що саме особливості вуглеводного складу глікоєпітопу nAChR плазматичної мембрани та мітохондрій можуть бути відповідальними за внутрішньоклітинну локалізацію nAChR в складі плазматичної мембрани чи мітохондрій. Оскільки вживання нікотину посилювало глікозилювання nAChR, то воно також сприяло направленню nAChR до мітохондрій, при цьому перешкоджаючи зв'язуванню специфічних лігандів цих рецепторів. Очевидно, в останній рік виконання дисертаційної роботи, на

що вказує рік публікації відповідних статей, було проведене дуже цікаве дослідження щодо участі nAHP у підтриманні виживання клітин печінки після часткової гепатектомії, а також дослідження щодо патогенного впливу нейрозапалення на функціонування мітохондрійних nAHP мозку. Ці результати є основоположними для пояснення біологічної ролі nAHP у мітохондріях.

**Наукова і науково-практична цінність роботи.** Станом на сьогоднішній день, рецензована робота має в більшій мірі фундаментальне, ніж прикладне значення, проте окремі висновки, що з неї витікають, повинні знайти практичне значення в медицині. У першу чергу, це стосується результатів про те, що вміст і склад мітохондрійних nAHP визначає стійкість мітохондрій до дії апоптогенних чинників. Наслідком цього може бути встановлений факт, що нейрозапалення призводить до зниження кількості мітохондрійних nAHP, через що мітохондрії мозку стають більш уразливими до апоптогенного впливу. У той же час, часткова гепатектомія, навпаки, супроводжується зростанням вмісту мітохондрійних nAHP, а отже й підвищенням стійкості мітохондрій печінки до дії апоптогенних чинників. Як видно з обговорення дисертанткою одержаних нею результатів, працівниками лабораторії, де вона працює, розпочато пошук нових терапевтичних підходів для підтримки життєздатності клітин під час нейродегенеративних захворювань та інших патологій з підвищеним рівнем апоптозу.

**Мета роботи** сформульована занадто лаконічно і тому не відображає усіх її нюансів, наприклад, «... встановити сигнали направлення nAHP до мітохондрій...» сказано дещо прямолінійно, бо для висновку про такі сигнали необхідні досліди з використанням мічених вуглеводів та їхніх конкурентів. Друга частина мети роботи говорить про «... біологічну роль nAHP у мітохондріях...», що також передчасно. Можливо, доцільно було написати в меті конкретніше про роль nAHP в модуляції мітохондріального шляху апоптозу.

У роботі вирішували **7 завдань**, що свідчить про масштабність проведених досліджень. На думку опонента, дисертаційна робота є дещо перевантаженою різноманітністю завдань і деякі з них доцільно було залишити на майбутні дослідження.

Під час виконання дисертаційної роботи дисертантка використала великий арсенал **методів дослідження**, що повністю адекватні спеціальності 03.00.04 – біохімія. Крім того, у роботі використані деякі фізико-хімічні методи і поведінковий тест розпізнавання нового об'єкту.

За результатами досліджень авторкою зроблено **6 висновків**. Насправді, об'єм одержаних результатів дозволяв зробити більше висновків, навіть виходячи з того, що в дисертаційній роботі запропоновано до виконання 7 головних завдань.

У списку робіт, опублікованих за результатами дисертаційної роботи, налічується 17 наукових праць, з яких 8 статей, з них 7 у міжнародних періодичних фахових наукових виданнях, і 9 тез доповідей у збірках

вітчизняних та міжнародних конференцій. У 3-х з 7-ми міжнародних статей дисертантка є 1-м співавтором і цей факт необхідно особливо відзначити на фоні масової «сірості» в публікаціях українських вчених.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 163 сторінках машинописного тексту: «Вступ» - 17-23 с., «Огляд літератури» - 24-53 с., «Матеріали і методи досліджень» - 54-62 с., «Результати та їх обговорення» - 63-124 с., «Аналіз та узагальнення результатів» - 125-129 с., «Висновки», «Список використаних джерел» (271 посилань). Робота містить 43 рисунки і 5 таблиць.

**Особистий внесок здобувача** чітко прописаний у коментарях до цитованих публікацій за темою дисертаційної роботи. У 4-х з 8-ми публікацій за темою дисертацій дисертантка є 1-м співавтором.

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

**Огляд літератури** містить інформацію про основний предмет дослідження: 1.1. Нікотинові ацетилхолінові рецептори; 1.2. Мітохондрії. Тут коротко описані структура, ліганди і патологічні стани, пов'язані з порушенням функцій nAChR. В кінці огляду літератури на Рис. 1.8 наведена підсумкова Схема механізмів сигналювання nAChR, локалізованих у мітохондріях і відомих на час виконання дисертаційної роботи.

**Матеріали і методи дослідження** описані детально. Разом з тим Біоетичні аспекти досліджень охарактеризовані у дуже загальній формі (Всі процедури з експериментальними тваринами проводились згідно рекомендацій Комісії по утриманню та використанню лабораторних тварин Інститутів, де проходили відповідні дослідження), без вказання номеру протоколу і його дати. Не сказано також скільки всього лабораторних щурів і мишей було використано в дослідженні.

**Результати експериментальних досліджень** описані у 3-х підрозділах: 1) Структурно-функціональна характеристика мітохондрійних nAChR; 2) Механізми сигналювання субодиниць nAChR у мітохондріях; 3) Біологічна роль nAChR мітохондрій. Кожен з цих підрозділів ще додатково структурований.

**Узагальнення результатів досліджень та їх аналіз** написані дуже скупо (всього 4 сторінки). В цьому аналізі вказано лише 5 посилань, що явно недостатньо для обговорення такого великого об'єму експериментальних результатів.

**Висновки** (6 пунктів) могли б бути ширшими, враховуючи великий об'єм роботи. Висновки написані в описово-узагальнювальній формі без вказівки ступеня тих чи інших виявлених змін. В цілому, висновки відповідають суті результатів дослідження в рамках рецензованої дисертаційної роботи.

У списку використаних джерел - 271 посилання, серед яких зустрічаються посилання без вказання тома, номера чи сторінок цитованих статей, наприклад, №2, 31, 32, 44, 94, 113. Не всі цитування оформлені однотипно, як вказано у вимогах.

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

1. На стор. 41 вказано «в крові хворих на шизофренію знайдені антитіла проти nAHP, що може бути фактором зниження рівня nAHP на клітинах [93]». Взагалі, поява таких антитіл буває наслідком автоімунного стану через зростання рівня nAHP. Чи в авторки є інше пояснення?
2. Дисертантка широко використовує у своїй роботі тест із вивільнення цитохрому C з мітохондрій (сендвіч-ІФА). Чи може така штучна система з використанням ізольованих органел (мітохондрії) вважатися адекватною моделлю індукції апоптозу?
3. У рис. 3.1. на стор.64 наведені результати порівняння складу вуглеводів  $\alpha$ 7-субодиниці nAHP у мітохондріях (1) і плазматичній мембрані (2). Чи може різниця в 7% по фукозі і 10% по маннозі (навіть при  $p < 0,005$ ) бути тим критичним механізмом, який рухає молекули nAHP в бік мітохондрій, замість рухати їх у бік клітинної поверхні. Очевидно, при такій малій кількісній різниці необхідно використати додаткові методи дослідження, щоб підтвердити висновки, зроблені у даній дисертаційній роботі.
4. В обговоренні результатів рис. 3.3 (стор. 67) сказано, що смуга 50-60 кДа білків печінки тварин, що вживали нікотин, є значно меншою за що смугу в контрольних тварин. Однієї цієї електрофореграми недостатньо для такого висновку, оскільки якість електрофореграми не є ідеальною, а її денситометрії авторка не проводила. Відповідь на таке питання міг би дати дослід із фарбування електрофореграми сріблом, що дає вищу чутливість детекції білків.
5. У своїй роботі авторка стверджує, що вживання тваринами нікотину сприяє збільшенню глікозилювання  $\alpha$ 7nAHP. Яким може бути механізм, що пояснював би цей ефект?
6. Висновки до дисертаційної роботи повинні бути самодостатніми, тобто зрозумілими без прочитання основного тексту роботи. Тому деякі зі зроблених висновків вимагають уточнення. Наприклад, Висновок 1 «Мітохондрійні  $\alpha$ 7 nAHP, порівняно з  $\alpha$ 7 nAHP плазматичної мембрани, містять більше сіалових кислот та фукози» - треба вказати, на скільки більше; Висновок 1 «робить nAHP мітохондрій менш чутливими до дії специфічних лігандів» - вказати, наскільки менш чутливими і до дії яких конкретно лігандів; Висновок 2 «може бути стимульоване зв'язуванням позаклітинного ортостеричного або трансмембранного алостеричного сайту» - вказати, зв'язуванням чого; Висновок 4 «підвищує стійкість мітохондрій до дії апоптогенних чинників» - конкретизувати, яку саме стійкість і до дії яких саме апоптогенних чинників; Висновок 5 «робить мітохондрії менш стійкими до апоптогенного впливу» - як оцінювали цей вплив і що саме для цього використовували; Висновок 6 «слабкий

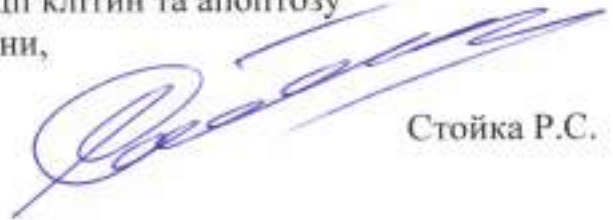
проти-апоптичний ефект» - що означає термін слабкий – він був, чи його не було.

**Редакційні зауваження:**

1. Дещо дивно звучить назва підрозділу 3.3.1 (стор. 96) «...не критично впливає...» - адже вплив або є, або його немає.
2. Стор. 109: що означає термін – драматичне збільшення? Такого терміну для кількісної оцінки змін в українській мові не існує.

**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 Успенської К.Р. на тему «**МЕХАНІЗМИ СИГНАЛЮВАННЯ ТА БІОЛОГІЧНА РОЛЬ НІКОТИНОВИХ АЦЕТИЛХОЛІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ У МІТОХОНДРІЯХ**» відповідає вимогам ДАК МОН України до кандидатських дисертацій, а висловлені опонентом зауваження не є підставою для заперечення високої оцінки цієї роботи. Вважаю, що авторка дисертаційної роботи заслуговує присудження їй 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, 22 січня 2019 р.

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



Барська М.Л.