

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Семчишин Галини Миколаївни «Молекулярні механізми адаптації дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* до стресових чинників», подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія

Актуальність роботи.

Будь-які організми постійно перебувають під впливом несприятливих факторів оточуючого середовища та зазнають впливу стресових чинників абіотичної та біотичної природи, що призводить до порушення рівноваги між різними метаболічними реакціями, які протікають у клітині. У реалізації адаптаційних реакцій організму, спрямованих на протидію шкідливому агенту, беруть участь різноманітні механізми, об'єднані терміном «стрес». Природа структурних, біохімічних і генетичних змін, які спостерігаються при дії різних факторів є подібною для всіх організмів. Універсальність біологічної відповіді полягає в тому, що при дії різноманітних факторів спостерігається певна послідовність реакцій та індукується подібний спектр захисних реакцій і систем. Дія стресового фактора на організм може провокувати надпродукцію активних форм кисню і порушувати рівновагу між їх рівнем і активністю антиоксидантної захисної системи. Повернення до рівноваги у змінених умовах є інтегральним процесом, що включає різноманітні метаболічні шляхи, регуляція яких може здійснюватись на транскрипційному, посттранскрипційному, трансляційному і посттрансляційному рівнях. Крім того, нагромаджуються дані про те, що активні форми кисню є інтермедіатами у єдиній внутрішньоклітинній сигнальній сітці. Основними групами захисних білків є антиоксидантні ферменти та білки-шаперони. Вивченню синтезу та шляхів регуляції цих білків присвячено численні дослідження. Однак, стрес-індуковані зміни у метаболізмі, зокрема неферментативні реакції, які посилюються за стресових умов, роль окремих генів та кодованих ними білків, механізми взаєморегуляції між окремими компонентами системи антиоксидантного захисту на сьогодні практично невідомі і потребують глибоких досліджень на молекулярному рівні. Ці фундаментальні знання необхідні для розробки стратегії та методів підвищення стійкості організму до стресових чинників, що є важливим для сповільнення старіння, запобігання та лікування низки захворювань. Саме тому дисертаційна робота Семчишин Г.М., присвячена з'ясуванню молекулярних механізмів адаптації дріжджів до стресових умов, є актуальною.

Наукова новизна роботи. Проведені дисертантом дослідження розширюють та поглиблюють уявлення про механізми адаптації дріжджів до стресових умов, викликаних різними чинниками (пероксидом водню, вуглеводами, пестицидами, оцтовою та пропіоновою кислотами), координацію різних систем антиоксидантного захисту. Виявлено тісний взаємозв'язок між ферментами антиоксидантного захисту – супероксидисмутазою і каталазою, за умов

оксидативного стресу, викликаного різними чинниками, що дозволило сформулювати гіпотезу, що саме ця взаємодія є основним механізмом передадаптації та перехресної адаптації дріжджів. Встановлено, що СОД може виявляти прооксидантну, а фруктоза – захисну дію *in vivo*. Доведено, що токсичність оцтової та пропіонової кислот зумовлена різними механізмами: ацетат, на відміну від пропіонату, виявляє прооксидантний ефект. Виявлено, що важливу роль у захисті дріжджів від вуглеводного стресу відіграють ферменти антиоксидантного та антиглікаційного захисту. За допомогою штамів дріжджів з пошкодженням різних ланок системи антиоксидантного захисту встановлено важливу роль цієї системи в адаптації дріжджів до карбонільного стресу, індукованого гліоксалем. Виявлено, що пероксид водню і етанол в низьких концентраціях викликають горметичну відповідь, в регуляцію якої залучений транскрипційний фактор YAP1. Механізми адаптації дріжджів до стресових умов розглядаються дисертантом не як окремі функціональні одиниці, а як елементи єдиного комплексу, який забезпечує виживання організму за дії стресових чинників різної природи, концентрацій та умов впливу.

Практичне значення одержаних результатів. З'ясування тонко регульованих механізмів, які дозволяють організму адаптуватись до стресу, викликаного несприятливими умовами, голодуванням, надлишком вуглеводів, дією консервантів, пестицидів та інших природних та штучних чинників, є важливим для попередження розвитку фізіологічних порушень, виникнення низки захворювань, сповільнення старіння. Виявлені дисертантом закономірності адаптації до дії стресових чинників повинні бути враховані при розробці дієтичного харчування для пацієнтів з порушеннями метаболізму, зокрема при цукровому діабеті. Отримані дисертантом дані про репродуктивну здатність, виживання та особливості росту за дії стресових чинників можуть бути використані в біотехнології при підборі середовищ та умов культивування дріжджів.

Особистий внесок здобувача. Висвітлені в роботі результати отримані за безпосередньої участі здобувача. Співучасть співробітників кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника та закордонних партнерів (Ягеллонський університет, м. Краків, Польща та Лундський університет, Швеція) відображена у спільних публікаціях.

Публікації та апробація результатів досліджень. Результати досліджень достатньо повно висвітлені в публікаціях. За темою дисертаційної роботи опубліковано 24 наукові праці. Особливо слід відзначити наявність 17 експериментальних та оглядових публікацій в міжнародних наукових журналах та монографіях. Про широке ознайомлення наукової спільноти з результатами досліджень свідчать численні виступи на наукових конференціях, з'їздах, конгресах.

За змістом, обсягом та структурою робота Семчишин Г.М. відповідає вимогам, які ставляться до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора наук. Структура дисертаційної роботи має традиційний характер. Огляд літератури за змістом відповідає напрямку проведених досліджень, написаний чітко і послідовно. У ньому подано інформацію про відповідь дріжджів на дію стресових чинників, які були використані в роботі, взаємозв'язки карбонільного і кислотного стресу з оксидативним стресом та обґрунтовано вибір дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* як модельного об'єкту та доцільність проведення запланованих напрямків досліджень. Оскільки загальні біохімічні механізми є консервативними в еукаріот, більшість клітинних процесів, зокрема реплікація, транскрипція, трансляція, розподіл білків, були досліджені саме на моделі дріжджів.

Автором проведена велика за об'ємом, чітко спланована експериментальна робота, яка складається з декількох частин: 1- характеристика оксидативного стресу, індукованого пероксидом водню; 2 – дослідження антиоксидантної та прооксидантної ролі супероксидисмутази *in vivo*; 3 – особливості карбонільного стресу та його потенційного зв'язку з оксидативним; 4 – взаємозв'язок кислотного та оксидативного стресів.

Грунтуючись на отриманих результатах, автором запропоновано гіпотетичні схеми взаємодії антиоксидантних ферментів - супероксидисмутази і каталази, участі глюкози і фруктози у виникненні карбонільного/оксидативного стресу та токсичних і захисних ефектів фруктози *in vivo*. Численні експериментальні дані свідчать про те, що дріжджі володіють складними механізмами відчуття різноманітних стресових ситуацій та відповіді на дію стресових факторів, що узагальнено дисертантом у схемі, яка відображає молекулярні механізми адаптації до стресових чинників.

Робота виконана на належному науково-методичному рівні із застосуванням широкого спектру біохімічних, мікробіологічних, фізико-хімічних методів, а також конфокальної мікроскопії та математичної статистики. Використані методичні підходи адекватні поставленим завданням.

Наведені результати є достовірними, основні наукові положення і висновки обґрунтовані. Робота добре ілюстрована (18 таблиць, 103 рисунки).

Зауваження, питання для обговорення та побажання.

1. Розділ 1.1, у якому викладено історію дослідження дріжджів на шести сторінках, є цікавим екскурсом в історію, але, на наш погляд, міг би бути значно коротшим, оскільки він не має безпосереднього відношення до досліджень, проведених дисертантом. Це дало б змогу детальніше висвітлити відомі механізми захисту від стресових чинників.
2. На наш погляд, у роботі незаслужено мало уваги приділено ролі низькомолекулярних факторів, зокрема глутатіону, в адаптації до стресу та їх взаємодії з іншими компонентами системи захисту.
3. Про який з ізоферментів супероксидисмутази йде мова у висновках 3 і 5?

4. На яких експериментальних даних ґрунтується твердження про утворення неактивних форм супероксидсмутази і каталази?
5. У розділі 1.1.1. наведено дані про те, що різні лабораторні штами дріжджів *S. cerevisiae* відрізняються за чутливістю до пероксиду водню, однак відсутня інформація чим може бути зумовлена така різниця, чому у подальших дослідженнях використовувався той чи інший штам.
6. Не викликає сумніву, що пекарські дріжджі є зручною моделлю еукаріотичного організму для досліджень молекулярних механізмів адаптації до стресових чинників. Якою є думка дисертанта стосовно використання для згаданих досліджень аеробних видів дріжджів, які мають, так само як вищі еукаріоти, першу точку спряження у дихальному ланцюзі?
7. Що автор розуміє під термінами «сублетальна доза» і низька сублетальна доза»?
8. Чи розвиток толерантності до летального стресу після дії низьких концентрацій пероксиду водню не міг бути викликаний виникненням мутацій? Чи проводилась перевірка чутливості культури до пероксиду після обробки низькими концентраціями?
9. При дослідженні антиоксидантного захисту за умов голодування дріжджові клітини інкубували протягом чотирьох діб не в середовищі вирощування чи буфері, а у воді, що могло викликати їх автоліз і вплинути на отримані в експериментах результати.
10. Експерименти по дослідженню впливу глюкози і фруктози на життєдіяльність дріжджів (стр.165) проводили протягом 21 дня. З чим пов'язаний вибір такої тривалості культивування? Чи визначали, за який час цукри в середовищі були використані повністю?
11. Для дослідження відповіді на стрес, викликаний гліоксалем, використано штам з делецією гена *GSH1*. Чи проводився контроль рівня глутатіону в цих експериментах, адже вирощування проводили в багатому середовищі, що містило дріжджовий екстракт.
12. У розділі «Матеріали та методи досліджень» досить детально описано використані методичні підходи, однак при описі методів визначення активності ферментів вказано, що в інкубаційну суміш вносили не фіксовану кількість білка, а певний об'єм безклітинного екстракту або «супернатанту»? Оскільки безклітинні екстракти дріжджів зазвичай містять різну кількість білка, то визначення могли проводитись в нестандартизованих умовах.
13. У роботі запропоновано використовувати як маркер помірного оксидативного/карбонільного стресу активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Якщо дисертантом вперше встановлено, що саме цей фермент є найчутливішим до дії невисоких концентрацій стресових чинників, то чи не варто було це запатентувати?

Більшість з перелічених запитань та зауважень мають дискусійний характер і не зменшують наукової та практичної цінності дисертаційної роботи.

Висновок.

1. Дисертаційна робота Семчишин Г.М. є завершеною науковою працею, в якій наведено теоретичне узагальнення порівняльного дослідження впливу різноманітних стресових чинників на дріжджі, охарактеризовано системи ферментативного і не ферментативного захисту від стресу та розвиток перехресних адаптацій. Отримані результати поглиблюють уявлення про молекулярні механізми адаптації дріжджів до стресу, викликаного різними чинниками. Автореферат повністю відображає зміст дисертації.
2. За своєю актуальністю, науковою новизною отриманих результатів, обґрунтованістю сформульованих наукових положень, достовірністю отриманих результатів та практичною цінністю дисертаційна робота Семчишин Галини Миколаївни. відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 07.03.2007 №423, щодо присудження наукового ступеня доктора наук.

Пров. наук. співробітник відділу
молекулярної генетики і біотехнології
Інституту біології клітини НАН України,
доктор біологічних наук, професор

Федорович Д.В.

Підпис Федорович Д.В. засвідчую
Вчений секретар, к.б.н.



Барська М.Л.