

## ВІДЗИВ

офіційного опонента

на дисертацію *Кушкевич Мар'яни Василівни*

«**Онтогенетичні зміни локалізації і вмісту клітинного пріона та його зв'язок з активністю АТФаз**»,

представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

**Актуальність теми.** У 1997 р. Нобелівську премію в галузі медицини було вручено американцю Стенлі Прузінеру (Stanley B. Prusiner) за відкриття (на початку 80-х років минулого століття) пріонів – нового біологічного джерела інфекції і за пояснення основних принципів його дії. С. Прузінер додав пріони до списку добре відомих інфекційних агентів, таких як бактерії, віруси, гриби й паразити. Молекули пріонів існують у двох формах, одна з яких «нормально» згорнута, а друга агрегована в амілоїд-подібні відкладення. Терміном «амілоїд» позначають групу білків, які взаємодіють між собою, утворюють відкладення, що не вимиваються сольовими розчинами, стійкі до гниття й до протеаз, УФ і радіоопромінення. Такий аномальний пріон (друга форма) контактує з нормальним і переводить його в аномальну форму.

Пріони були виявлені при вивченні спонгіоформних (губчатих) енцефалопатій. С. Прузінеру вдалося виділити збудника й довести, що він є чистим білком-мутантом, здатним викликати спонгіоформну енцефалопатію, і назвав новий тип інфекційного агента пріон (prion, від англ. Proteinaceous infectious particle – білкова інформаційна частинка), або пріон-протеїн (PrP). Термін «пріон» підкреслює специфіку інфекційного агента, відмінного від вірусу, який крім білка має і нуклеїнову кислоту.

Протеїн-пріон є сіалоглікопротеїном з молекулярною масою 33-35 кДа, складається у людини приблизно із 254 амінокислот, включаючи 22-членний N-термінальний сигнальний пептид і кодується єдиним геном, розташованим у людини у 20 хромосомі. На сьогодні встановлено біля 20 різних мутацій гена PrP людини, які викликають різні пріонові захворювання.

Пріон PrP<sup>C</sup> знайдений у всіх ссавців, входить до складу плазматичних мембран, зв'язаний із зовнішнім її моношаром гліколіпідним якорем і бере участь в ендоцитозі та катаболізмі клітин. Найвищий рівень концентрації PrP виявлено в нейронах.

Пріон-протеїни необхідні для нормальної синаптичної функції, беруть участь у міжклітинному впізнаванні та клітинній активації, здійснюють контроль за процесами старіння та ін. Клітинний пріон, ймовірно, необхідний для тривалого виживання нейронів, у тому числі й клітин Пуркін'є, для процесів катаболізму, підтримання іонного гомеостазу, в т.ч. підтримання Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, і Ca<sup>2+</sup>-градієнтів на мембранних системах. Виходячи з цього, актуальність теми дисертації М.В. Кушкевич не викликає сумнівів.

**Ступінь обґрунтованості і достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх новизна.**

Свідченням достатньої обґрунтованості та достовірності отриманих у дисертації результатів та зроблених висновків є високий методичний рівень роботи і вдале поєднання сучасних методичних підходів широкого діапазону. У розділі «Матеріали і методи» описано використані методи диференційного центрифугування, Дот-блот- та Вестерн-блот аналізи, імуногістохімічні методи, визначення вмісту іонів калію, натрію і кальцію, методи біохімічної кінетики, методи визначення активності ферментів та статистичні.

Серед результатів слід відзначити найважливіші та ті, що мають пріоритетне значення. Досліджено локалізацію, загальний вміст і рівень молекулярних ізоформ PrP<sup>C</sup> у довгастому мозку, мозочку, периферичних пріон-реплікувальних (селезінка, порожня кишка) та інших (печінка, нирки, м'язи) органах лабораторних щурів різного віку. Визначено активність та кінетичні показники Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- та Ca<sup>2+</sup>-АТФаз, а також вміст Na, K і Ca у тканинах цих органів. Встановлено кореляційну залежність між віковими змінами вмісту PrP<sup>C</sup> й активності іонних транспортерів, вміст PrP<sup>C</sup> та Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- та Ca<sup>2+</sup>-АТФаз, а також побудовано моделі, які відображають вікові зміни досліджуваних параметрів у пріон-реплікувальних тканинах.

Автор показала, що найвищі рівні експресії клітинного пріону встановлено у довгастому мозку (97 – 100 %), селезінці (92 – 98 %), порожній кишці (64 – 100 %) та мозочку (53 – 84 %). Імуногістохімічні дослідження клітинного пріону свідчать, що у довгастому мозку PrP<sup>C</sup> розміщується у значній кількості в ядрі оливи та висхідному тракті, у корі мозочка – у нейронах молекулярного, зернистого шарів та у клітинах Пуркін'є. Саме тому, експресуючи значні кількості PrP<sup>C</sup>, нейрони та клітини глії є основними мішенями під час розвитку патологічних змін. У них виникає вакуолізація, внаслідок чого рееструються дегенеративні, губчастоподібні зміни структури мозку. Водночас, проникаючи у мозочок, патологічний пріон уражає клітини Пуркін'є, у результаті чого порушується координація рухів.

Досліджуючи локалізацію клітинного пріона у печінці та нирках, автор показала, що у печінці клітинний пріон виявлено у гепатоцитах, а також синусоїдах, зокрема у клітинах Купфера. Залежно від віку тварин змінюється співвідношення молекулярних глікоформ клітинного пріона, тобто гліколізування впливає на здатність клітинного пріона трансформуватися у патогенну форму. За відсутності клітинного пріона або його дисфункції виникають електрофізіологічні та синаптичні патології нейронів, які супроводжуються порушеннями Ca-гомеостазу. Встановлено значне зростання вмісту кальцію у пріон-реплікувальних тканинах старих тварин, що робить нейрони вразливішими до несприятливих факторів, спричиняє передчасну загибель нервових клітин, зменшує їх пластичність.

Атором встановлено зниження активності АТФаз на 43 – 89 % у пріон-реплікувальних органах зі зростанням віку тварин, що, ймовірно, призводить до порушення електрохімічних градієнтів на плазматичній мембрані. На основі цього автор стверджує, що активність іонних транспортерів і вміст іонів натрію, калію та кальцію можна вважати маркерами спонтанного пріонного перетворення. Отримані результати розкривають особливості фізіологічних функцій пріон-протеїну і можуть

бути використані для вивчення етіології та патогенетичних механізмів пріонних захворювань.

Висновки роботи чітко сформульовані і логічно випливають з аналізу отриманих експериментальних даних. Наукові положення і результати дисертаційної роботи повністю викладені у 8 статтях у провідних вітчизняних та зарубіжних наукових часописах, апробовані на всеукраїнських та міжнародних наукових конференціях. Зміст автореферату повністю відповідає змісту дисертації.

#### **Зауваження щодо змісту дисертації та загальний висновок.**

Проведені Кушкевич М.В. експериментальні дослідження повністю відповідають меті дисертаційної роботи, а отримані дані дозволяють вирішити поставлені у роботі завдання. Разом з тим виникають деякі запитання, відповіді на які сприятимуть глибшому розумінню отриманих автором даних.

1. Називати роботу «Онтогенетичні зміни ...» є перебільшенням, оскільки автор досліджувала тварин лише 1-, 6- і 30-місячного віку, що належить лише до одного із щонайменше чотирьох етапів онтогенезу. Достатньо було б назвати «Вікові зміни ...».

2. Зауваження методичного характеру:

а) важко зрозуміти, чи можна виділити пріони, М.м. яких ~ 35 кДа, якщо гомогенат центрифугували 2 хв за 12000 об./хв.. Як правило, вказують тисячі g;

б) як зрозуміти «вміст пріону» в умовних одиницях? Доцільно було б дати тлумачення таким одиницям, тим більше, що вміст пріонів «визначали ... відносно вмісту тубуліну» (стор. 40), який повинен бути автору відомим в одиницях SI;

в) автор занадто скупо описує отримання мікросом: «зразки тканин гомогенізували ... , у результаті повторного центрифугування отримали мембранну фракцію тканин» (стор.41). У зв'язку з цим виникають

запитання: які тканини; які швидкості центрифугування в одиницях g; чи відрізняються умови виділення мікросом із різних тканин; які розміри мембранних везикул і орієнтація мембранних поверхонь?

3. Описуючи методи і результати кінетичних досліджень, автор, на думку опонента, занадто вільно відноситься до кінетичних параметрів. Це стосується, наприклад, «кількості реакції (стор. 43), «вміст іонів у порожній кишці» (стор. 88), при застосуванні одиниць  $\frac{\text{мкмоль Фн}}{(\text{мг протеїну} \times \text{хв.})^{-1}}$  буде невідповідність графіків тим, які зображені на рис. 3.35, г і ін., а одиниця «мг<sup>-1</sup> протеїну» (стор. 92, 97) втрачає інформаційне навантаження.

4. Дискусійним є і висновок автора про те, що зниження  $K_M$  з віком приводить і до зниження  $v_0$  АТФазної реакції, якщо автор користується рівняння Міхаеліса-Ментен:  $v_0 = \frac{v_{\text{max}} \cdot [S]}{[S] + K_M}$ .

5. Що ж до вірогідності даних, то чи доцільно звертати увагу на зміни (активності, вмісту), значення яких коливається в межах 0,8 – 2 %?

Вказані доброзичливі запитання не знижують високої оцінки дисертаційної роботи. Загальний її аналіз свідчить, що це самостійне і завершене наукове дослідження, у якому представлені переважно нові науково обґрунтовані дані, що в сукупності є суттєвим внеском в біохімію пріонів. Робота «Онтогенетичні зміни локалізації і вмісту клітинного пріона та його зв'язок з активністю АТФаз» відповідає чинним вимогам до кандидатських дисертацій, а її автор Кушкевич М.В. заслуговує наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

### Офіційний опонент

Завідувач науково-дослідним сектором "Мембранології і цитології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка

д. б. н., професор  
В.К. Рибальченко,  
Заслужений діяч науки і техніки України



ПІДПИС ЗА  
ВЧЕННИЙ СЕКТОР  
КАРАУЛЬНА Н  
17.01.2017

5