

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Войчука Сергія Івановича «Механізми дії стресових факторів на біосинтез компонентів клітинної стінки, позаклітинного матриксу та цитоплазматичної мембрани мікроорганізмів» на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія

**Актуальність** дисертаційної роботи Войчука Сергія Івановича обґрунтована тим, що стрімкий науково-технічний розвиток сприяє все більш вагомому впливу на біологічні об'єкти з боку фізичних і хімічних чинників стресу факторів антропогенного походження, особливо неіонізуюче електромагнітне випромінювання. Використання дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, як модельних еукаріотних організмів, дозволяє застосувати системний підхід до вирішення поставлених задач і наблизитися до розуміння процесів, які відбуваються між чинниками навколишнього середовища і живими організмами.

Дисертант поставив за **мету** визначити фізико-хімічні, структурні та функціональні особливості будови КС, ПКМ і ЦПМ, які відіграють роль у стійкості клітин мікроорганізмів до дії факторів стресу та розробити модель регуляції біосинтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ факторами фізико-хімічної природи.

**Об'єктом дослідження** автор визначив регуляцію синтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ на фоні дії чинників стресу фізико-хімічної природи, а **предметом дослідження**: склад КС, ПКМ і ЦПМ за дії чинників хімічного і фізичного стресів.

**Опублікування** результатів дисертації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 83 наукових праці, з них 34 статті, у тому числі 26 у фахових виданнях, 23 у виданнях, що включені до міжнародних баз даних, 1 патент України на корисну модель, 1 монографія у співавторстві, 47 тез доповідей.

Результати дисертаційної роботи пройшли апробацію на численних вітчизняних та міжнародних наукових форумах.

**Структура** та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 422 сторінках друкованого тексту і складається із «Вступу», розділів «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», 4 розділів результатів власних досліджень, а також «Узагальнення результатів дослідження», «Висновки» і «Додатки». Список використаних джерел містить 522 посилання, з яких 483 іноземних авторів. Дисертаційна робота містить 21 таблицю та 90 рисунків.

У **Розділі 1.** Огляд літератури "Стрес та його значення для клітини" наведено аналіз даних, представлених у наукових джерелах, що присвячені висвітленню сучасного стану знань щодо впливу хімічних і фізичних чинників стресу на життєві процеси, які протікають в живих організмах. Узагальнено результати досліджень стосовно будови і ролі компонентів КС і ЦПМ клітин мікроорганізмів за дії чинників стресу, передачі відповідних сигналів, ініціюванні транскриптомної відповіді на рівні геному і у формуванні стійкості клітин до стресу. Наведено дані щодо біологічної дії радіочастотного електромагнітного випромінювання (РЧ-ЕМВ), вказано на його можливі медичні, біологічні і екологічні ризики, а також перспективи застосування. Одночасно з тим наголошено на суттєвій нестачі знань щодо механізмів дії цього чинника стресу на живі організми, що може унеможливити його безпечне

використання у повсякденному житті і може вимагати застосування специфічних обмежуючих норм.

**Розділ 2.** Матеріали і методи дослідження. Для виконання поставлених завдань автор використав цілий комплекс мікробіологічних, фізіолого-біохімічних, фізико-хімічних (газова і рідинна хроматографія, горизонтальний і вертикальний гель-електрофорез, УФ-спектроскопія, мас-спектрометрія), біоінформатичних (аналіз транскриптомів, підбір праймерів), молекулярно-генетичних методів (РТ-ПЛР і мультиплексна-ПЛР), методів статистики (дисперсійний аналіз).

**Розділ 3.** "Морфолого-структурні і фізіолого-біохімічні особливості реакцій клітин мікроорганізмів на дію факторів стресу". У цьому розділі наведено результати дослідження морфолого-структурних змін клітин мікроорганізмів різних систематичних груп за дії факторів стресу хімічної і фізичної природи; вплив фізичних природних факторів на фізіолого-біохімічні особливості клітин дріжджів; порівняльний аналіз фізіолого-біохімічних і фенотипових характеристик штамів дріжджів дефектних за поліфосфатазами; Вплив стресових факторів на морфолого-структурні і оптичні характеристики клітин дріжджів; стійкість клітин дріжджів до однофакторного стресу; стійкість клітин дріжджів до дії комплексу факторів стресу; формування адаптивної відповіді клітинами дріжджів; шляхи генетичної взаємодії полі(Ф)аз PPN1 і PPX1 у забезпеченні стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу.

У розділі 4. "Вивчення компонентного складу клітинної стінки, позаклітинного матриксу і мембран клітин дріжджів за дії факторів стресу" наведено наномеханічні властивості клітин дріжджів за дії чинників фізичного стресу, склад цукрів клітинної стінки і позаклітинного матриксу клітин дріжджів за дії стресів, зміни в складі білків за дії факторів стресу, вплив факторів стресу на склад жирних кислот профілі жирних кислот клітин дріжджів, індивідуальна дія факторів стресу на склад жирних кислот, вплив комплексу факторів стресу на склад жирних кислот, вплив факторів стресу на вміст стеролів в клітинах дріжджів, профілі стеролів клітин дріжджів, вплив факторів стресу на склад стеролів клітин дріжджів, вплив електромагнітного випромінювання на експресію генів біосинтезу жирних кислот.

У розділі 5 «Стабільність геному і експресія генів-маркерів стресу в клітинах дріжджів» представлено результати дослідження цілісності структури ДНК за дії факторів стресу, індукції одно- і дволанцюгових розривів ДНК за дії електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону, ролі полі(Ф)аз у прояві явища «геномної мінливості», експресії генів, що індукують ся стресом, впливу електромагнітного випромінювання (40,68 МГц) на експресію *UBC6*.

У розділі 6 «Фенотипові ефекти дії факторів стресу на клітини дріжджів» описано вплив факторів стресу на чутливість клітин дріжджів до антибіотиків, вплив ЕМВ ДВЧ-діапазону на адгезивні властивості клітин дріжджів, вплив ЕМВ ДВЧ-діапазону на процес міжклітинної взаємодії, адгезія клітин дріжджів до клітин ссавців, вплив блокаторів адгезії на взаємодію клітин дріжджів з клітинами ссавців, синтез білків *de novo* клітинами дріжджів при їх взаємодії з клітинами фібробластів, структурні зміни в клітинах ссавців викликані взаємодією з клітинами дріжджів, експресія стрес-індукованих генів в клітинах дріжджів при їх взаємодії з клітинами ссавців.

У розділі 7 проведено обговорення і узагальнення отриманих результатів та запропоновану схему дії РЧ-ЕМВ на клітини дріжджів.

На підставі проведених досліджень С.І. Войчуком на прикладі мікроорганізмів показано, що ефекти дії хімічних і фізичних факторів залежать від природи діючого чинника і від виду мікроорганізму. Відмінності в ефективності дії радіочастотного електромагнітного випромінювання метрового, сантиметрового і міліметрового діапазонів на цито-морфологічні ознаки КС, ПКМ і ЦПМ в клітин бактерій і дріжджів, спонукали зосередити увагу на вивченні шляхів і механізмів біологічної дії фізичних чинників стресу на модельному еукаріотному організмі, яким є дріжджі *S. cerevisiae*.

Встановлено, що процеси синтезу білків і цукрів КС і ПКМ, вміст жирних кислот (ЖК) і стеролів в мембранах виявляють надвисокі кореляційні індекси один з одним (до 99%) і разом створюють систему захисту клітин від широкого спектру чинників стресу. Автор визначив окремі структурні компоненти КС, ПКМ і ЦПМ, які можуть вважатися чинниками загальної стійкості до стресів. До таких можна віднести вміст *N*-ацетилглюкозаміну (GlcNAc) в КС і рівень експресії *PHO84* (*P<sub>i</sub>*-транспортний канал ЦПМ). Обидва показники виявляли високу (понад 90%) кореляційну залежність із стійкістю клітин до факторів стресу в цілому. Вміст GlcNAc, в свою чергу, тісно пов'язаний із пулом С18:х ЖК, який має відношення до формування стійкості клітин дріжджів до кислотного стресу і гіпертонічності. Відсутність залежності між цими показниками і величиною нанотвердості клітин вказує на те, що стійкість клітин до оцтової кислоти і антибіотиків визначається не фізичними властивостями поверхневих структур, а їх хімічною будовою і транспортними процесами в мембранах.

Серед внутрішньоклітинних елементів, чинниками загальної стійкості до стресів можна вважати окремі стероли, які були визначені як сілан. Біологічна роль цих сполук невідома, проте за результатами досліджень їх вміст в клітинах корелює із стійкістю до всіх вивчених факторів стресу. На противагу цим двом сполукам, пул ергостеролу виявляв лише близьку до достовірної залежність із стійкістю клітин до кислотного стресу.

Наномеханічні властивості (жорсткість) КС впливає не лише на стійкість клітин до осмотичних пертурбацій і механічних деформацій, але й до дії пероксидного стресу. Виявлено, що ключовим чинником нанотвердості є комплекс, який складається з *N*-ацетилгалактозаміну КС і ПКМ, *N*-ацетилнейрамінової кислоти ПКМ, а також GPI-білків КС. Аналіз експресії стрес-індукованих генів показав існування високих кореляційних залежностей (понад 96% при  $p < 0,04$ ) між показником нанотвердості і рівнем експресії генів *PPN1*, *GPD1* і *GRE2*. І хоча останні два гени є маркерами гіперосмотичного стресу, продукти їх експресії розташовані в цитоплазмі і пероксисомах та регулюють біохімічні процеси перетворення гліцеролу і глікольальдегіду в умовах стресу, тобто не можуть мати безпосереднього впливу на показник жорсткості КС. А тому виявлені кореляційні залежності очевидно є непрямыми.

Такі чинники стресу як пероксид гідрогену, оцтова кислота і сорбітол суттєво впливали на вміст мінорних цукрів КС і ПКМ, таких як *N*-ацетилглюкозамін і *N*-

ацетилгалактозамін, проте ефекти суттєво змінювалися внаслідок дії на клітини РЧ ЕМВ ДВЧ-діапазону і вміст глюкозаміну зменшувався в клітин дефектних за PPN1 і зростав в клітин дефектних за PPX1. В клітинах із подвійною делецією ефект залежав від типу стресу. При цьому, було відмічено, що за умови одночасної дії комплексу стресових факторів біологічна відповідь формується на чинник з найбільшим цито- і генотоксичним потенціалом.

Вміст мажорних складових (маноза, глюкоза) в КС під дією чинників стресу зменшується, проте відбувається пропорційне збільшення їх вмісту в ПКМ, що може вказувати на перерозподіл цукрів між КС і ПКМ.

Склад ЖК, один з небагатьох показників, який не мав залежності із дефектністю клітин за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1 проте достовірно змінювався за дії ДВЧ-ЕМВ і антибіотика ністатину. Обидва чинники стресу знижували вміст пальмітинової (С16:0) ЖК. У випадку ністатину ефект пов'язаний із загальним зниженням рівню життєздатності клітин дріжджів, в той час як за дії ДВЧ-ЕМВ відбувається послаблення певних етапів біосинтезу ЖК, про що свідчить майже дворазове зниження рівнів експресії гену десатурази ЖК *OLE1* на фоні стабільної активності інших генів елонгази ЖК і синтетази ЖК.

Дія чинників стресу призводила до морфологічних змін в будові ядерного апарату (утворення гетерохроматину) і викликала геномну мінливість. Зокрема такі ефекти були відмічені при дії ЕМВ. РЧ-ЕМВ УВЧ-діапазону викликало необернену геномну мінливість. Проте НзВЧ-випромінювання з частотою 57-62,5 ГГц було індуктором мітотичної рекомендації і прямих мутацій. НзВЧ-випромінювання сприяло утворенню дволанцюгових розривів молекули ДНК і посилювало подібну ж дію для УФ-випромінювання, яке в нормі викликало лише одноланцюгові розриви. В той же час ДВЧ-випромінювання (40,68 МГц) не мало мутагенної дії.

Механізм дії РЧ-ЕМВ може базуватися на його здатності збільшувати вміст внутрішньоклітинних активних форм кисню (АФК). Опосередковано на це вказує майже триразове збільшення активності ферментів каталаз вже за 15 хв дії РЧ-ЕМВ (40,68 МГц). В свою чергу, неконтрольоване збільшення рівню внутрішньоклітинних АФК може викликати порушення білків, про що свідчить активація експресії *UBC6*, гену який кодує один з білків убіквітинового комплексу знешкодження дефектних білків. Рівні експресії *UBC6* збільшувалися в 1,5-2,1 раза ( $p \leq 0,05$ ) під дією на клітини дріжджів ДВЧ-ЕМВ (40,68 МГц, 15 Вт, 5-30 хв). Очевидно це призводить до зміни внутрішньоклітинної осмолярності і рН, що слугує сигналом для активації відповідних сигнальних шляхів і запуску репараційних процесів, викликає зміни в структурі КС, ПКМ і ЦПМ, що й відображається на змінених адгезивних властивостях клітин до біотичних і абіотичних поверхонь, а також у стійкості клітин дріжджів до антибіотиків.

Під дією чинників стресу в клітинах дріжджів відбувається посилення експресії низки генів-маркерів стресу *GSY2*, *RNR3*, *GRE2*, *GPD1* і *HSP12*, що в цілому вказує на реплікативний стрес. Однак стрес-індуковані транскриптомні відмінності в клітин дефектних за полі(Ф)азами вказують на існування різних шляхів формування стресових реакцій в дефектних клітинах, які очевидно опосередковані активністю ферментів PPN1 і PPX1.

Ефективність дії факторів стресу, так само як і склад КС, ПКМ і ЦПМ суттєво залежали від дефектності клітин за поліфосфатазами PPN1 і PPX1. Ці ферменти перебувають на різних метаболічних шляхах і відіграють вагомую роль не лише для формування повноцінної фенотипової відповіді клітин на дію стресів але й залучені до процесів біосинтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ, процесів адгезії і міжклітинної взаємодії, до стійкості клітин до антибіотиків й інших процесів. Фермент PPX1 бере участь у формуванні стійкості до кислотного стресу викликаного дією оцтової кислоти, а фермент PPN1 долучений до формування відповіді на дію з боку пероксидного стресу і гіперосмотичного шоку.

Дефектність клітин за полі(Ф)азами викликає посилення експресії гену *STII*, який кодує білок кошаперону *hsp90* і рН-специфічного індикатора *PDR12*. Водночас, клітини, дефектні за PPN1 (включаючи клітини подвійного мутанта) виявляли посилення експресії гену *GPD1*, який кодує гліцерол-3-Ф-дегідрогеназу. Беручи до уваги, що дефектність за полі(Ф)азами не впливала на ростові показники клітин дріжджів і ефективність споживання глюкози і фосфору, отриманий результат може вказувати на посилення синтезу *альфа*-амілоїдних білків і зміну внутрішньоклітинного рН, які мають місце в клітинах дріжджів дефектних за цими полі(Ф)азами. Дефектність за PPN1 додатково викликає ще й зміну внутрішньоклітинної тоничності.

За дії чинників стресу відбуваються структурні зміни в КС, ПКМ і ЦПМ, які можуть бути безпосередньою причиною більш високої стійкості клітин дріжджів до антибіотиків, або ж впливати на адгезивні властивості клітин. Так дія пероксидного стресу і випромінювання ДВЧ (40,68 МГц) і УВЧ (1871 МГц) діапазонів сприяли збільшенню стійкості клітин дріжджів до антибіотиків полієнового і азолового ряду, в той час як кислотний стрес навпаки знижував цей показник. Гіперосмотичний стрес ефективно збільшував стійкість до антибіотиків лише у клітин дефектних за PPN1. Ключовими елементами для формування мікробної стійкості до антибіотиків виявилися рівень глюкозаміну в КС і ергостеролу в ЦПМ, а також рівень експресії *RHO84*, гену, який кодує білок трансмембранного каналу транспорту фосфату.

При вивченні адгезивних властивостей клітин дріжджів на моделі кобальт-хромових (Wironit, Wirobond 280, Gialloy PA) і нікель-хромових (Viron 99, Virocer plus, Gialloy CB/N) стоматологічних сплавів металів, а також на моделі взаємодії клітин дріжджів із клітинами ссавців (епітеліоподібні і фібробластні клітини) було визначено, що ДВЧ-ЕМВ, в обох моделях, збільшує величину адгезії. Проте у випадку адгезії до сплавів металів можливою причин такого ефекту може бути збільшення стійкості клітин дріжджів до токсичних іонів металів ( $Ni^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ), які можуть утворюватися на поверхні сплавів в результаті хемокорозії.

Таким чином, в результаті проведених досліджень були встановлені основні структурні елементи КС, ПКМ і ЦПМ, які відіграють роль у формуванні стійкості клітин дріжджів до дії чинників стресу хімічної природи (пероксидний і кислотний стреси, гіпертонічність), антибіотиків і генотоксичних агентів. Запропоновано механізм біологічної дії неіонізуючого випромінювання радіочастотного діапазону і встановлено внутрішньоклітинні шляхи, через які відбувається модуляція синтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ за дії факторів фізичної і хімічної природи. Запропонована модель впливу РЧ-ЕМВ може слугувати основою для розробки методів

керованого синтезу компонентів структур КС, ПКМ і ЦПМ, а радіочастотне ЕМВ метрового-міліметрового діапазонів може бути використано для надання стійкості мікроорганізмам до цито- і генотоксичних чинників, які широко використовуються в агро- і біотехнологічній галузях, і слугуватиме охороні довкілля.

Автореферат за своїм змістом відповідає основним науковим положенням дисертаційної роботи, однак необхідно відзначити, що він має дещо змінену структуру ніж дисертація, що значно ускладнило роботу опонента.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, сформульованих у дисертації підтверджені результатами досліджень з використанням значної кількості сучасних методів досліджень та не викликають сумнівів. Викладені результати досліджень та сформульовані висновки в цілому не викликають принципових заперечень, але разом з тим є деякі запитання та зауваження:

1. Дуже важлива як з теоретичної так і з практичної точки зору, але занадто різнопланова наукова робота (велика кількість обраних автором досліджуваних стресових факторів, мікроорганізмів та їх біологічних показників), що ймовірно ускладнило автору чітко сформулювати та узгодити між собою мету, об'єкти, зміст та висновки. Робота виглядала б більш цільною, як би автор зосередив увагу на вивченні впливу саме електромагнітного випромінювання, що власно і є стрижнем дисертаційного дослідження.

2. Аналіз результатів роботи ускладнюється тим, що різні стресові чинники мають різні механізми дії та мішені, а зміна рівнів обраних біологічних показників частіше є результатом непрямой дії стресового фактору, тому автору необхідно враховувати це при формулюванні висновків.

3. Виглядає зайвим включення до дисертаційної роботи даних, що наведені у підрозділах 3.1 та 3.2.. За обсягом вони складають незначну частку від загального експериментального матеріалу, а по суті мало пов'язані з основною лінією досліджень – визначенню впливу РЧ-ЕМВ на клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Ймовірно, сам автор підспудно розуміє це, оскільки ніяк не обговорює їх у сьомому розділі.

4. У дисертації відсутня інформація про джерело отримання автором даних щодо сонячного потоку, швидкості сонячного вітру, геомагнітного поля Землі, сонячної активності.

5. Автор обґрунтовує вибір поліфосфатаз як молекул, що сприймають дію абіогенних факторів наступним: "Поліфосфати і активність ферментів поліфосфатаз винайдена в усіх органелах і компартментах клітин дріжджів, а тому ці структури можуть виконувати регуляторну роль на всіх ланках організації живого і виступати сенсорними молекулами у сприйнятті зовнішніх сигналів на рівні КС" (стор. 139). Це обґрунтування викликає запитання: чому лише факт "виявлення в усіх органелах і компартментах клітин дріжджів" є підставою для ствердження, що вони можуть слугувати сенсорними молекулами? Чи може відомо і інші підстави?

6. Із системи енергетичного метаболізму на роль рецепторів зовнішніх абіотичних сигналів чи не краще було обрати експресію генів, структурні чи функціональні компоненти або реакції механізму утворення АТФ?

7. Чим обґрунтовується визначення ролі компонентів КС та ПКМ як чинників стійкості мікроорганізмів до стресів, крім високого рівня кореляції з виживанням

клітин за дії чинників стресу, і що тоді у цих випадках відіграє роль мішеней для дії факторів стресу? (н.п. стор. 210).

8. Чим обґрунтовано вивчення впливу ЕМВ ДВЧ-діапазону на адгезивні властивості клітин дріжджів до не традиційної моделі поверхні сплавів металів Ni-Cr, Co-Cr? Чому не обрано традиційні моделі пластикових гідрофобних та гідрофільних поверхонь? Яке відношення у цьому підрозділі має спосіб литва сплавів до обраної теми?

9. Чим пояснити вибір культур клітин савців фібробластів мишей (L-929), клітин нирки хом'яка (ВНК), клітин тестикул свиней (ПТП), клітин нирки бика (MDBK), клітин легеневої карциноми людини (A549), для вивчення впливу ЕМВ ДВЧ-діапазону на процес міжклітинних взаємодій, а не культуру клітин епітелію?

10. Робота перевантажена аббревіатурами що ускладнює сприйняття матеріалу. Некоректні терміни: текучість (плинність) мембрани, клітинна оболонка (стінка), фарбування (забарвлення) бактерій, пригнічення КУО, стрес-індукуємі гени, пошкодження конформації білків, або не за визначенням вжиті терміни; регуляція, біосинтез, механізми дії.

11. Зважаючи на актуальність обраної теми, яка обґрунтована все більш вагомим впливом на біологічні об'єкти з боку фізичних чинників стресу антропогенного походження, і в першу чергу на людину з боку неіонізуючого електромагнітного випромінювання, бажано було сформулювати практичні висновки, а саме які із досліджених факторів можуть мати негативний вплив на здоров'я людини та рекомендації автора для визначення допустимих норм та заходів для обмеження негативного впливу РЧ-ЕМВ.

Наведені зауваження, більшість із яких носять дискусійний характер, не є такими, що знижують загальну позитивну оцінку дисертації, яка є завершеною самостійною науковою працею. Дисертація виконана на високому рівні і є завершеним науковим дослідженням.

Оцінюючи наукову новизну отриманих результатів Войчука Сергія Івановича в цілому, слід зазначити, що ним теоретично обґрунтовано і експериментально підтверджено здатність неіонізуючого ЕМВ радіочастотного діапазону змінювати процеси синтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ дріжджів і впливати на чутливість мікроорганізмів до дії фізико-хімічних чинників стресу. Показано, що стресовий характер дії РЧ-ЕМВ реалізується через формування активних форм кисню, зміну внутрішньоклітинного рН, тонічності, зміну активності ферментних систем, синтез основних сполук КС, ПКМ і ЦПМ, тощо. Сукупність отриманих у дисертації результатів являє практичний інтерес для використання клітин дріжджів як сенсорних елементів для детектування біологічної дії неіонізуючого ЕМВ, а використання радіочастотного ЕМВ метрового-міліметрового діапазонів як засіб для надання стійкості мікроорганізмам до цито- і генотоксичних чинників, що використовуються в агро- і біотехнологічній галузях, в галузі охорони довкілля.

Отже, дисертаційна робота Войчука Сергія Івановича «Механізми дії стресових

факторів на біосинтез компонентів клітинної стінки, позаклітинного матриксу та цитоплазматичної мембрани мікроорганізмів», представлена на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія за актуальністю, обсягом і змістом проведених досліджень, за науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів відповідає вимогам п. 10 та 12 «Положення про порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України,  
проректор Одеського національного  
університету імені І.І. Мечникова



В.О. Іваниця