

ВІДЗИВ

на роботу Кукліна А.В. «Експресія генів вродженого імунітету в інтактних гепатоцитах та печінці щура під час її регенерації», поданої на захист кандидатської дисертації за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Печінка є унікальним органом ссавців, відповідальним за інтегральні реакції запалення і антистресової відповіді, а також єдиним, здатним до повної регенерації після видалення більшої частини органу. Саме тому вона є ідеальним об'єктом для досліджень, що вивчають регенеративні процеси. Розроблені експериментальні моделі часткової гепатектомії (ЧГЕ) та лапаротомії (ЛАП) дозволяють диференціювати регенерацію та стресові реакції гострої фази. Обидві процеси підлягають регуляції з боку системи вродженого імунітету, в тому числі, дії альфа-інтерферону. Робота А.В.Кукліна присвячена вивченню характеру експресії генів, так чи інакше пов'язаних з альфа-інтерфероном (ІФНа), в печінці щурів за ЧГЕ або ЛАП. Робота є продовженням і розвитком досліджень, які проводяться в лабораторії системної біології ІМБіГ НАН України, піднімаючи їх на новий методичний рівень і даючи матеріал для нового рівня генералізації та осмислення отриманих раніше результатів. Актуальність і важливість роботи не викликають сумніву, оскільки стосуються фундаментальних проблем клітинної регенерації та її регуляції.

Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, висновків та списку використаних джерел. Її викладено на 154 сторінках машинописного тексту, ілюстровано 19-ма рисунками і 10-тю таблицями та трьома додатками. Список використаної літератури містить 176 найменувань.

Огляд літератури складається із двох підрозділів. Перший підрозділ логічно включає в себе все, що стосується ІФНа: історію відкриття, будову молекули ІФНа, механізми сигналізу в клітинах, гени-мішені та механізми їх активації/блокування. Другий підрозділ характеризує регенеративні процеси в печінці та їх регуляцію, в тому числі, з боку імунної системи. Таким чином, огляд літератури надає теоретичне підґрунтя для експериментальної частини, яка логічно витікає із нього.

Роботу виконано на достойному методичному рівні з використанням молекулярно-біологічних підходів (виділення ДНК, РНК, ЗТ-кПЛР, зворотна транскрипція, молекулярне клонування, *in vitro* транскрипція, гібридизація з мікромасивами ДНК); методів клітинної біології (виділення та культивування первинних гепатоцитів, отримання фракцій паренхімних і непаренхімних клітин печінки); біоінформатичних методів (стандартний набір програм з аналізу результатів мікромасив-експериментів, визначення диференційно експресованих генів методом збагачення функціональних категорій за тестом Фішера, визначення сайтів зв'язування транскрипційних факторів в промоторах диференційно експресованих генів за використання позиційно-вагових матриць). Особливого схвалення заслуговує дослідження профілю експресії генів культивованих гепатоцитів за дії ІФНа, проведеного методом аналізу мікромасивів (microarray).

Отримані результати можна розділити на 3 частини. Перша – це дослідження експресії гену ІФНа в гепатоцитах та непаренхімних клітинах печінки на різні строки після ЧГЕ та ЛАП; друга – дослідження профілю експресії генів культивованих гепатоцитів за дії ІФНа; і третя – детальне дослідження генів, виявлених у другій частині, за умов ЧГЕ та ЛАП в гепатоцитах та непаренхімних клітинах печінки. Такий порядок викладення експериментального матеріалу є, безумовно, логічним і дозволяє автору детально

Із численних експериментів, поставлених і оприлюднених в останні роки, стає зрозумілим, що вплив лише одного чинника (в даному випадку ІФНа) активує в клітині сотні різних генів і розібратися у мережі їх взаємодій є досить складним завданням. Безумовним досягненням дисертанта є те, що спектр диференційно експресованих генів, визначений аналізом мікромасивів та біоінформатичними підходами, був пізніше підтверджений реакцією зворотної транскрипції. Важливим з загально біологічної точки зору є знайдений дисертантом факт, що відповідь гепатоцитів на ІФНа характеризується одночасним збалансованим підвищенням експресії генів, задіяних як в активації, так і в інгібуванні запальних процесів. Ми зустрічаємось з цим принципом всюди в живій природі: активація якогось процесу одночасно включає механізми його негативної регуляції. Дуже цікавим є визначення двох піків підйому рівня мРНК *Ifna* після ЧГЕ, перший – на самому початку регенераційного процесу, за який відповідають клітини Купфера, і другий – більш тривалий і запізнений, який забезпечується гепатоцитами. В купі з даними мікромасивів, це означає, що на початку регенераційного процесу гепатоцити тільки відповідають на ІФНа, продукований клітинами Купфера, а пізніше починають продукувати його самі, автокринно підтримуючи процеси, які в них почалися. Дещо неочікуваним виявився той факт, що зміни рівня мРНК ІФНа не корелюють із змінами в експресії його мішеней - генів *Ube11*, *Ube2l6*, *Usp18*, *Isg15*, *Irf7* після ЧГЕ і генів *Isg15*, *Ube11*, *Ube2l6*, *Trim25*, *Usp18* та *Irf7* після ЛАП. Це означає, що механізми впливу ІФНа на клітини печінки є більш складними, ніж уявлялось раніше. Натомість, виявлена участь генів (протеїнів) системи ІСГілювання у відповідь на ІФНа і запропоновано механізми їх дії. Таким чином, автором отримано значний масив нових і цікавих даних, які дозволяють поновити наші уявлення про механізми дії ІФНа в клітинах печінки.

В обговоренні значну увагу приділено аналізу можливих взаємозв'язків тих сигнальних систем, участь яких була визначена в експерименті. Аналіз результатів демонструє ґрунтовну обізнаність автора із визначеною проблемою. З огляду на складність проблеми, що обговорюється, можна дискутувати із пропозиціями автора, однак, безумовно, його точка зору має право на існування.

Запитання і зауваження.

1. Як Ви вважаєте, чому реакція на ЧГЕ так принципово відрізняється від реакції на ЛАП, хоча хірургічне втручання в ході ЧГЕ повністю включає ЛАП?
2. Чи можна екстраполювати отримані Вами дані щодо механізму дії ІФНа в печінці на випадки вірусної інфекції, наприклад гепатиту?
3. ЧГЕ вочевидь включає в печінці не тільки експресію ІФНа, а і багато інших процесів. Розбіжності у даних, отриманих на культурі гепатоцитів за дії ІФНа і в суцільній печінці після гепатектомії можуть бути пов'язані саме із впливом сторонніх чинників.

Загалом, вважаю, що отримані дисертантом дані мають суттєву **наукову новизну, фундаментальне і практичне значення**. **Висновки** відповідають отриманим результатам.

Робота А.В.Кукліна є завершеною працею, в якій отримані нові науково обґрунтовані результати, що в сукупності вирішують конкретну наукову задачу суттєвого значення для молекулярної і клітинної біології. За актуальністю проблеми, методичним рівнем, якістю досліджень та публікацій і новизною отриманих результатів робота відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 (пп. 11,12) «Порядок

присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 молекулярна біологія.

М.В.Скок, професор,
член-кор. НАН України,
завідувач лабораторії імунології клітинних рецепторів
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України

23.09.2016

