

ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертаційну роботу Кочубей Тетяни Олександрівни «Вплив фітогемаглютиніну і його ізолектинів на життєздатність та апоптоз соматичних клітин ссавців *in vitro*», що представлена до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Актуальність теми дисертаційної роботи Тетяни Олександрівни очевидна, бо пошук нових методів лікування пухлинних захворювань, що надзвичайно розповсюджені в усьому світі, є пріоритетним для медицини, онкології. Вибір лектинів для досягнення цієї мети є досить сміливим та несподіваним. Як відомо, лектини широко застосовуються у клінічній діагностиці, використовуються як інструмент при проведенні досліджень у галузі біології клітини та цитогенетики у зв'язку з їхньою вуглеводзв'язувальною та токсичною дією. Лише керівникові дослідження вдалося показати здатність лектинів впливати на апоптоз клітин через рецептор-залежний та мітохондріальний сигнальний шлях. Саме детальному дослідженню цих попередніх даних і присвячена робота Тетяни Олександрівни із вивчення впливу фітогемаглютиніну та його ізолектинів на проліферацію та виживаність злоякісних та умовно нормальних клітин ссавців, проапоптичні властивості лектинів квасолі звичайної, пов'язані із активацією певних рецепторів. Місточок між проведеним фундаментальним дослідженням та практичною онкологією може бути прокладений дуже легко, і найближчим часом ми дізнаємося, чи використовуються лектини при протипухлинній терапії. Звісно, до цього необхідно буде провести експерименти на тваринах із експериментальними, трансплантованими пухлинами.

Наукова новизна отриманих результатів. Встановлено дозозалежний ефект ізолектинів на проліферацію клітин та встановлено здатність лектинів індукувати загибель клітин, як злоякісних, так і умовно нормальних ліній за інших концентрацій. Доведено здатність фітогемаглютиніну індукувати програмовану загибель клітини стимуляцію каспазозалежних сигнальних шляхів. Розрахунковими методами показано, що лейкоаглютинін здатен утворювати стабільні білок-білкові комплекси з проапоптотичними та антиапоптотичними рецепторами.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Отримані наукові положення і висновки обґрунтовані достатнім обсягом молекулярно-генетичних та цитологічних досліджень. Висновки роботи є логічними, аргументованими та базуються на отриманих результатах.

Якість використаних для дослідження методів, репрезентативність отриманих результатів. Робота виконана на сучасному методичному рівні: дослідження проводили в умовах *in vitro* із використанням культур клітин ссавців (спонтанно трансформовані фібробласти китайського хом'ячка B11d-ii-FAF28C1237-8Glu-tsIII, лінія клітин раку гортані людини Нер-2, а також лінію клітин людини непухлинного походження 4BL). При проведенні досліджень використовували лектини рослинного походження, а саме комерційні препарати лектинів квасолі звичайної *Phaseolus vulgaris* – фітогемаглютинін ФГА: сумарний препарат, ФГА-Л: лейкоаглютинін, ФГА-Е: еритроаглютинін. Дослідження впливу лектинів на зміни вмісту розщеплених форм ефекторної каспази-3 та ініціаторної каспази-8, а також проапоптотичного білка Вах проводили із застосуванням Вестерн-блот аналізу

із використанням специфічних антитіл. Були використані такі антитіла: anti-Cleaved caspase-3 (p11 (h 176)-R: sc-22171, Santa Cruz Biotechnology), anti-Bax (HPA027878, Sigma), anti-Cleaved caspase-8 p18 (H134): Sc-7890(Santa Cruz Biotechnology, США), anti-glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibodies (G8795, Sigma, USA). Достатній об'єм проаналізованого матеріалу дозволили вирішити поставлені задачі, зробити логічні висновки, що витікають із проведеного дослідження.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що індукція апоптозу є одним із найбільш бажаних ефектів протипухлинної терапії, а ізолектини фітогемаглютиніну є не дуже дорогими, виробляються в Україні і, цілком можливо, що їх можна буде використати для терапії онкологічних захворювань. Також, не виключено, що встановлені ефекти лектинів можна використовувати в якості біозондів апоптотичних чи антиапоптотичних рецепторів для цитологічних чи імуногістохімічних робіт.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано в рамках наукових проектів відділу генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України «Особливості експресії гена репаративного ензиму Об-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферази в умовно нормальних та пухлинних клітинах» (шифр теми 2.2.4.17, № держреєстрації 0108U008526, 2009-2013 рр.) та «Регуляція експресії гена репаративного ензиму MGMT під впливом деяких біологічно активних речовин (гормонів, цитокінів, лектинів та ін.) у клітинах ссавців» (шифр теми 2.2.4.17, № держреєстрації 0115U000355, 2014-2018 рр.), а також проекту отриманого на конкурсних засадах відповідно до Постанови Президії НАН України № 50 від 24.02.10 р: "Вплив вуглеводзв'язувальних

білків на сигнальні шляхи апоптозу клітин в умовах *in vitro*" (№ держреєстрації 0109U006250, 2009-2010 рр.)

Загальна характеристика роботи. Дисертаційна робота викладена на 124 сторінках друкованого тексту та складається із "Вступу", "Огляду літератури" (4 підрозділи), експериментальної частини, до якої входять розділи „Матеріали та методи досліджень” (8 підрозділів), „Результати досліджень” (3 розділи), „Обговорення результатів”, “Заключення” та “Висновки”. Робота ілюстрована 27 рисунками та містить 3 таблиці. Закінчується списком використаних літературних джерел, що включає 149 посилань.

Розділ “Огляд літератури” охоплює велику кількість літературних даних по темі дисертаційної роботи із детальний інформацією про різні види лектинів та їхні ефекти.

У розділі «Матеріали та методи» описано методи роботи із клітинами, виділення РНК із цих клітин, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, метод синтезу комплементарних ДНК, методи зворотної транскрипції і полімеразної ланцюгової реакції, Вестерн-блот протеїнів, молекулярного докінг-аналізу та статистичний аналіз результатів.

У розділі „Результати досліджень” наведено результати дослідженнями впливу лектинів та ізолектинів на різні види клітин, що узагальнено в обговоренні в таблицях. Дуже сучасно виглядає розділ «Молекулярне моделювання білок-білкової взаємодії лейкоаглютініну з про- та антиапоптозними рецепторами клітинної мембрани»

Розділ «Аналіз та узагальнення результатів» дозволяє автору зібрати разом велику кількість фактичного матеріалу, наведеного у попередніх

розділах та зробити логічні висновки, що безпосередньо впливають із результатів роботи.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та у авторефераті. Наукові положення дисертаційної роботи зроблені ним висновки та рекомендації, що чітко сформульовані в дисертації, досить повно відображені в опублікованих 10 наукових працях, із яких 6 статей, що опубліковані у фахових вітчизняних та міжнародних наукових виданнях, та 4 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових з'їздів та конференцій. Основні положення дисертації знайшли ґрунтовне і логічне відображення в авторефераті, який повністю відповідає змісту дисертації.

ЗАУВАЖЕННЯ.

1. Проліферативна активність клітин досліджується із застосуванням досить незвичного методу (застосування бромфенолового синього із наступним вимірюванням оптичної густини при довжині хвилі 620 нм). Невідомо, чи порівнювалась ефективність цього методу із загальноприйнятими методиками визначення активності поділу клітин.

2. Залишається відкритим питанням, чому лектини, що мають здатність зв'язуватися як із про-апоптотичними, та із про-проліферативними рецепторами дають різний ефект у різних концентраціях? На перший погляд, в результаті мав би бути нуль, але результати дисертаційного дослідження вказують на інше. Чим можна пояснити розбіжність у результатах молекулярного докінгу та цитологічних даних?

ЗАКЛЮЧЕННЯ.

Дисертаційна робота Кочубей Тетяни Олександрівни «Вплив фітогемаглютиніну і його ізолектинів на життєздатність та апоптоз соматичних клітин ссавців *in vitro*», подана до спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, за своєю актуальністю, науковим і практичним значенням, глибиною і обсягом досліджень, змістом та оформленням повністю відповідає вимогам ДАК України про присудження наукових ступенів стосовно дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а її виконавець – Кочубей Тетяна Олександрівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Завідувач відділу загальної та молекулярної
патофізіології Інституту фізіології
ім. О.О.Богомольця НАН України,
доктор медичних наук, професор



В.Є.Досенко

ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О.О.Богомольця	
НАН України	
Підпис	Досенко В.Є
Свідчую.	
Секретар	Корніженко В.І.