

## ВІДГУК

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**

Дисертаційна робота Тетяни Олександрівни Кочубей присвячена вивченню механізмів дії ізолектинів фітогемаглютиніну на апоптоз фібробластів китайського хом'ячка, а також пухлинних та непухлинних клітин людини. Актуальність цієї дисертаційної роботи визначається тим, що злоякісні пухлини тяжко піддаються лікуванню і тому пошук нових шляхів впливу на проліферацію і виживання пухлинних клітин є надзвичайно важливим для боротьби з онкологічними захворюваннями. Тривалий час увагу дослідників привертають природні сполуки, зокрема лектини, які широко розповсюджені у природі, характеризуються відносно низькою токсичністю і про-апоптичною дією на клітини злоякісних пухлин. Тетяною Олександрівною вперше проведено детальне дослідження лектину квасолі звичайної (фітогемаглютиніну), який є гетеротетрамером і складається з двох типів субодиниць (ізолектинів), а також має специфічність до певних гліканів, підвищення експресії яких на поверхні пухлинних клітин свідчить про метастазування та прогресію злоякісних пухлин. Але роль окремих субодиниць фітогемаглютиніну в його здатності індукувати апоптоз, а також молекулярні механізми їх дії залишалися недостатньо вивченими. У зв'язку з цим, тема дисертаційної роботи безсумнівно є актуальною як з фундаментальної, так і з прикладної точки зору.

Дисертаційна робота Тетяни Олександрівни Кочубей викладена на 124 сторінках друкованого тексту та складається із “Вступу”, “Огляду літератури” (4 підрозділи), „Матеріали та методи досліджень” (8 підрозділів)



та трьох розділів, присвячених результатам проведених досліджень. Окремий розділ присвячений аналізу та узагальненню результатів досліджень. Закінчується робота 5 висновками та “Списком використаних літературних джерел” (149 посилань). Робота містить 27 рисунків та 3 таблиці, а також додатки.

У “Вступі” чітко обґрунтована тема дисертаційної роботи та її зв'язок з науковими програмами і темами, сформульована мета і конкретні задачі досліджень, а також наукова новизна одержаних результатів та їх практичне значення. Розділ “Огляд літератури” охоплює велику кількість літературних даних по темі дисертаційної роботи, причому Тетяна Олександрівна провела не лише аналіз наявних у літературі даних по обраному напрямку наукових досліджень, а і їх узагальнення. Вона проаналізувала основні лектини різних рослин, але особлива увага була приділена лектину квасолі, його можливої ролі у регуляції апоптозу клітин. Нею сформульовані питання, що ще не знайшли вирішення на даний момент і обґрунтувала необхідність виконання цієї дисертаційної роботи.

Другий розділ дисертаційної роботи присвячений методам досліджень, що були використані для виконання даної роботи. Варто відмітити, що вони відповідають поставленим задачам. Описані методи культивування клітин, оцінки проліферації клітин та визначення життєздатності клітин і обрахування індексу апоптозу, виділення РНК із клітин, спектрофотометричні методи визначення кількості РНК, електрофоретичний аналіз протеїнів, метод синтезу комплементарних ДНК, методи полімеразної ланцюгової реакції, вестерн-блот аналізу та інші.

У першому із трьох розділів результатів власних досліджень Тетяна Олександрівна приводить отримані нею дані стосовно впливу різних концентрацій фітогемаглютиніну і його ізолектинів на проліферацію клітин китайського хом'ячка та пухлинних і непухлинних клітин людини. Нею вперше було встановлено, що сумарний препарат фітогемаглютиніну та його окремі субодиниці мають залежний від дози характер впливу на



проліферацію та виживання клітин, причому виявлено здатність лектинів індукувати загибель як клітин злоякісних пухлин, так і умовно нормальних клітинних ліній.

Тетяною Олександрівною було також встановлено, що ізолектини фітогемаглютиніну індукують апоптоз через стимуляцію сигнальних шляхів, залежних від каспаз, причому виявлені певні відмінності про-апоптичної дії сумарного препарату фітогемаглютиніну та його ізолектинів у культурі умовно нормальних клітин та клітин злоякісних пухлин. Нею розраховано, що лейкоаглютинін здатен утворювати стабільні комплекси з про-апоптичними рецепторами FasR та TNFR1 і анти-апоптичними рецепторами IGF1R (рецептор подібного до інсуліну фактора росту) та EGFR (рецептор епідермального фактора росту).

Важливим результатом цієї роботи є дослідження експресії генів *Bax* та *Bcl2* і Вестерн-блот аналіз протеїнів активованих каспаз та *Bax*, які продемонстрували можливу участь цих протеїнів в індукції апоптозу за дії фітогемаглютиніну та його окремих субодиниць.

Отримані автором результати мають і практичне значення, оскільки детальне вивчення механізмів дії лектинів на проліферацію та виживання умовно нормальних клітин і клітин злоякісних пухлин необхідно для з'ясування молекулярних механізмів пригнічення росту злоякісних пухлин, що буде сприяти розробці нових стратегій цільової терапії злоякісних новоутворень. Експериментальний матеріал викладений послідовно, статистично опрацьований та проаналізований.

Наукові положення дисертаційної роботи Тетяни Олександрівни і зроблені нею висновки чітко сформульовані у дисертації, досить повно відображені в опублікованих нею 16 наукових працях, із них 6 статей, які опубліковані у фахових вітчизняних наукових виданнях, та 10 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових форумів.



Дисертація оформлена відповідно прийнятим вимогам до кандидатських дисертацій, а зміст автореферату є ідентичним основним її положенням.

Разом з тим, є ряд зауважень щодо дисертаційної роботи Кочубей Тетяни Олександрівни:

1) у роботі є низка орфографічних помилок та не вдалих висловів;  
2) не вказані особливості культивування принципово різних ліній клітинних ліній;

3) немає посилання на метод оцінки проліферативної здатності клітин. Якщо це авторська розробка, то необхідно про це сказати. Не вказано які сполуки клітин зв'язують бромфеноловий синій і яким чином це забарвлення може віддзеркалювати процес проліферації?

4) наведено дані про теоретично очікувану дію двох ізолектинів фітогемаглютиніну, але немає обґрунтування для таких розрахунків. Більше того, очікувану дію двох ізолектинів значно перевищує дію фітогемаглютиніну. Чи може так бути і для чого ці дані, які тільки ускладнюють розуміння представлених на рисунках результатів?

5) із підписів до рисунків 3.7 та 3.8, а також 3.10 та 3.11, не відомо чим саме відрізняються ці пари рисунків між собою;

6) на рисунках 2-4 представлені лінії контролю та ММС, але не вказано у роботі їх коливання та залежність від концентрації лектинів;

7) немає пояснень чому лектини знижують проліферацію значно сильніше мітоміцину С і чому ФГА-Л у концентрації 1 мг/мл втрачає свою пригнічуючу дію на проліферацію, яка істотно не змінювалася при концентрації ФГА-Л від 10 нг до 100 мкг/мл (рис. 3).

У процесі роботи над дисертацією виникло декілька дискусійних питань, на які хотілося б почути думку Тетяни Олександрівни:

1) Який механізм дії ізолектинів фітогемаглютиніну? Чи можуть вони діяти на клітини як мономери, чи як димери або тетрамери? Чи можуть утворюватися гомотетрамери фітогемаглютиніну?



2) Вами проведені дослідження на пухлинних клітинах Нер-2, а чи будуть впливати досліджені вами лектини на клітини інших видів злоякісних пухлин? Якщо так, то яким чином?

3) Який на вашу думку молекулярний механізм впливу фітогемаглютиніну на проліферацію пухлинних клітин?

Поставлені вище запитання не впливають на загальну високу оцінку роботи Тетяни Олександрівни, яка успішно виконала всі наукові завдання для досягнення поставленої мети. Важливо відмітити, що результати роботи розширюють сучасні уявлення про механізми дії фітогемаглютиніну на процеси апоптозу клітин, що може сприяти розробці сучасних підходів для пригнічення злоякісного росту.

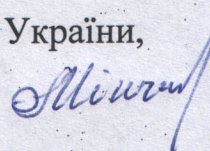
Вважаю, що дисертаційна робота Кочубей Тетяни Олександрівни „Вплив фітогемаглютиніну і його ізолектинів на життєздатність та апоптоз соматичних клітин ссавців *in vitro*” за актуальністю проблеми, науковою новизною отриманих результатів і можливістю їх практичного використання, а також достовірністю зроблених висновків відповідає вимогам пп. 11, 12 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567, а її автор Кочубей Тетяна Олександрівна заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

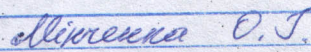
Офіційний опонент,

завідувач відділу молекулярної біології

Інституту біології ім. О.В. Палладіна НАН України,

доктор біологічних наук, професор

 - Мінченко О. Г.

Підпис:   
 ЗАСВІДЧУЮ  
 Зав. канцелярією  
 Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна  
 національної академії наук України  
 "13" 03 2017 р.

