

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Коломієць Лесі Анатоліївни «Створення та характеристика нанокмпозитного комплексу протипухлинного цитокіна ЕМАР II з декстраном 70», представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20-біотехнологія

Актуальність теми

Перспективним напрямком біотехнології є створення нових стабільних високоактивних білкових комплексів для застосування в медицині. Зацікавленість такими комплексами в першу чергу обумовлена їх мультифункціональністю, можливістю застосування для лікування хронічних та онкологічних захворювань. Одним з таких комплексів є ендотеліальний та моноцитаактивуючий поліпептид II (ЕМАР II). Цей поліпептид відіграє важливу роль в індивідуальному розвитку, ембріогенезі та деяких патологічних процесах і апаптозі клітин. ЕМАР II має антипухлинну та протизапальну активність. Експресія ЕМАР II спостерігається в епітелії, нейронах, кровоносних судинах та інших тканинах, а також в пухлинах. Описана наявність ЕМАР II в лімфоїдній тканині селезінки, лімфатичних вузлах та перерових бляшках кишечника, в периваскулярній мікроглії головного мозку, в моноцитах та макрофагах. На основі дослідження пухлин було висловлене припущення, що клінічне значення ЕМАР II полягає в інгібуванні ангиогенезу і пригніченні росту первинних та вторинних пухлин.

Слід зазначити, що не зважаючи на перспективність застосування даного препарату до цього часу він не використовується в медичній практиці, оскільки не проведені його доклінічні та клінічні випробування. Однією з причин є відсутність ефективної методики отримання цього цитокіну в препаративних кількостях, що в певній мірі пов'язано зі здатністю білка до агрегації. Це явище є досить поширеним в біотехнологічних та фармацевтичних розробках, оскільки воно супроводжується суттєвими змінами властивостей макромолекул

білків. Для подолання цієї проблеми в фармакології застосовують допоміжні агенти, в тому числі декстрини та циклодекстрини, які здатні знизити рівень агрегації білкових компонентів. Одним з високоактивних агентів, що може використовуватись в подібних технологіях є декстран 70.

Зважаючи на викладене, дисертаційна робота Коломієць Лесі Анатоліївни, метою якої є оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР II, отримання гомогенного препарату рекомбінантного білка ЕМАР II високого ступеня чистоти в препаративних кількостях, біотехнологічна розробка нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 для стабілізації білка та дослідження його характеристик, є актуальною.

Дисертаційна робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділу білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка.

Для виконання поставлених завдань Леся Анатоліївна Коломієць використала сучасні біотехнологічні, молекулярно-біологічні та біохімічні методи досліджень, такі як бактеріальна експресія рекомбінантних білків, трансформація бактеріальних клітин, афінна хроматографія на Ni-NTA агарозі, електрофоретичні дослідження, спектрофотометрію, флуоресцентну спектроскопію, лазерну кореляційну спектрометрію. Проводилась робота з культурами клітин, з тваринами, по визначенню ендотоксинів методом гель-тромб тесту, отриманню ксенографтів пухлин, застосовувались методи комп'ютерного моделювання, докінгу та молекулярної динаміки, методи статистичного аналізу.

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота викладена на 153 сторінках за класичною схемою і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, розділу експериментальних досліджень, розділу аналізу та обговорення отриманих результатів, висновків, списку літературних джерел, який включає 213

посилань та додатків, в яких приведено список наукових праць дисертантки та отримані патенти на корисні моделі.

В літературному огляді Леся Анатоліївна аналізує літературні дані, присвячені властивостям ЕМАР II, приділяє увагу проблемі агрегації білків та способам її запобігання.

В розділі «Матеріали і методи» дисертантка наводить використані нею методи досліджень та матеріали, що використовувались при їх проведенні.

В розділі «Результати експериментальних досліджень» наводяться отримані результати щодо оптимізації бактеріальної експресії цитокіну ЕМАР II в бактеріальній системі *E.coli*. Показано взаємодію поліпептиду ЕМАР II з декстраном 70 методами флуоресцентної спектроскопії, обрахована константа дисоціації цього комплексу. Методом динамічного світлорозсіювання показано як агрегує вільний цитокін ЕМАР II в розчині і приведені характеристики комплексу ЕМАР II з декстраном 70. Проведено біоінформаційний аналіз даного комплексу і показано, що при його утворенні декстран 70 зв'язується з ЕМАР II, блокуючи його «триптофанові кишені», стабілізуючи таким чином білок в розчині. Варто зазначити, що біоінформативні методи досліджень добре підтверджують експериментальні методи досліджень.

Слід відмітити, що дисертанткою проведені ґрунтовні дослідження властивостей створеного нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70. За допомогою гель-тромб тесту встановлено вміст ендотоксинів у комплексі ЕМАР II з декстраном 70, показана здатність цього комплексу впливати на продукцію фактора некрозу пухлин та інтерферону в культурі клітин, показано вплив комплексу на проліферацію культури клітин, проведені дослідження протипухлинної активності нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на моделі по підсадці ксенографів аденокарциноми простати людини під капсулу нирки мишей, проведено токсикологічні випробування на тканинах.

В розділі «Аналіз та узагальнення результатів» наводиться детальний аналіз результатів, порівнюючи їх з відомими літературними даними. Аналізуються особливості взаємодії ЕМАР II з декстраном 70, участь в цьому

процесі ряду амінокислот в оточенні Trp125, внаслідок чого відбувається стабілізація ЕМАР II.

Наукова новизна досліджень, їх значення для науки і практики.

Дисертанткою запропоновано та створено термостабільний комплекс ЕМАР II з декстраном 70. Визначено оптимальні умови експресії рекомбінантного білка ЕМАР II в бактеріальній системі експресії на основі *Escherichia coli*. Проведений аналіз можливих механізмів агрегації цитокіну ЕМАР II та підходів щодо запобігання цьому процесу. Запропоновано спосіб стабілізації ЕМАР II шляхом застосування декстрану 70. Встановлені біологічні властивості нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70. Показано, що цей комплекс не має вираженого токсичного впливу на організм досліджених тварин. В концентраціях 1,6-25 мкг/мл він стимулює продукцію фактора некрозу пухлин. Запропонований нанокмпозитний комплекс інгібує ріст злоякісних пухлин на понад 70%.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих в дисертації.

Дисертаційна робота Коломієць Лесі Анатоліївни є завершеною науковою працею, що містить всі необхідні структурні елементи. Використання сучасних мікробіологічних, молекулярно-біологічних, біохімічних, біоінформативних та інших методів досліджень дозволило автору отримати значний обсяг наукових результатів, які є перспективними для подальшого застосування в медицині. Результати роботи Л.А. Коломієць пройшли попереднє обговорення на наукових конференціях та представлені в 8 статтях, що опубліковані в фахових наукових виданнях. Л.А.Коломієць отримано 2 патенти України на корисну модель. Висновки дисертаційної роботи є аргументованими і логічно витікають з отриманих автором результатів. Автореферат дисертації відповідає її змісту. Все це свідчить про те, що робота заслуговує схвалення і підтримки.

До дисертантки є деякі питання та зауваження.

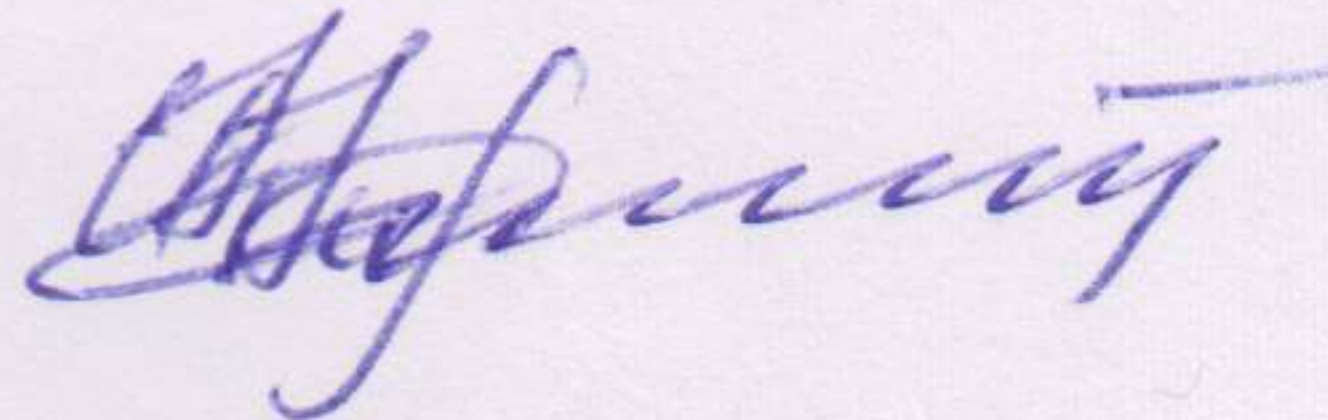
1. В тексті зустрічаються деякі невдалі вислови, орфографічні помилки. На стор. 53-55 вказано «нічна культура». Зважаючи на те, що тривалість ночі різна, необхідно вказувати години культивування.
2. Важливим фактором при культивуванні бактерій є початковий їх вміст в суспензії. Яка початкова кількість бактерій була у Ваших експериментах? Чи не отримували б Ви більш високого виходу цитокіну ЕМАР II при підвищенні кількості бактерій в суспензії на початку експерименту?
3. При дослідженні токсичного впливу нанокмпозитного комплексу ЕМАР II на організм мишей Ви лише реєстрували вагу внутрішніх органів. Чи не визначали Ви накопичення в окремих органах тварин вміст цього комплексу?
4. Деякі таблиці потребують уточнення, зокрема в табл.3.3 та табл. 3.4 не вказано в яких одиницях вимірювалась маса внутрішніх органів тварин.

Відмічені зауваження не впливають на загальне позитивне враження від дисертаційної роботи, яка є вагомим здобутком пошукача вченого ступеня.

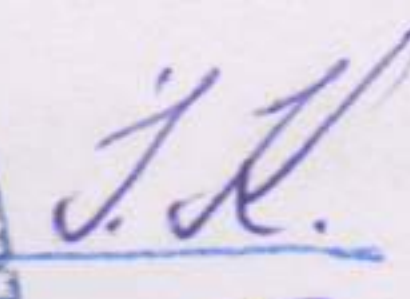
Висновок по дисертації

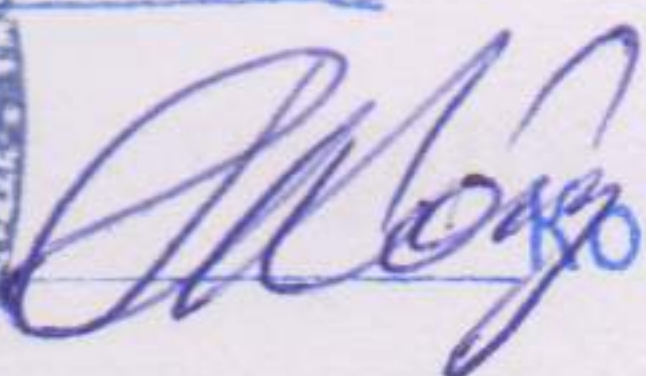
Дисертаційна робота «Створення та характеристика нанокмпозитного комплексу протипухлинного цитокіна ЕМАР II з декстраном 70», що представлена Коломієць Лесею Анатоліївною на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20- біотехнологія, є завершеним науковим дослідженням. Дисертанткою на основі сучасних методичних підходів створено нанокмпозитний комплекс ендотеліального та моноцитаактивуєчого поліпептида II (ЕМАР II) з декстраном 70. Отримані результати є перспективними для подальшого застосування в лікуванні онкологічних хвороб. Робота виконана на високому науково-методичному рівні. За актуальністю, новизною, науково-практичною значимістю результатів дисертаційна робота відповідає вимогам «Порядку присудження наукових степенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07. 2013 р., (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів

України № 656 від 19.08.2015 р., №1159 від 30.12.2015 р., №567 від 27.07 2016 р.), які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор, Коломієць Леся Анатоліївна, заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00. 20-біотехнологія.

Офіційний опонент, завідувач відділу мікробіологічних процесів на твердих поверхнях Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, доктор біологічних наук, професор  І.К. Курдиш
10 грудня 2020 р.







Коваль Р.В.