

Відзив

на дисертаційну роботу **Короткевич Наталії Валеріївни**

**«МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ БІОЛОГІЧНОЇ
АКТИВНОСТІ ГЕПАРИН-ЗВ'ЯЗУВАЛЬНОГО EGF-ПОДІБНОГО
ФАКТОРУ РОСТУ ЛЮДИНИ»,** представленої

до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Дисертаційна робота Короткевич Н.В. присвячена молекулярно-біологічному аналізу впливу гепарин-зв'язувального EGF-подібного фактору росту на внутрішньоклітинний транспорт рецептора епідермального росту людини. Відомо, що ядерна локалізація EGFR стимулюється EGF і спостерігається при злоякісній трансформації. Наразі відсутні дані щодо ролі розчинної форми EGFR- подібного фактору росту людини, sHB-EGF, який також здатний утворювати комплекс з EGFR, індукувати ядерну локалізацію останнього в пухлинних клітинах з надекспресією рецептора. **Актуальність теми дисертації, пов'язаної з вивченням молекулярних механізмів проліферації та прогресії пухлин не викликає сумніву**

Дисертаційна робота тісно пов'язана з програмами, планами, темами наукових досліджень відділу молекулярної імунології Інститут Біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. Дисертант був співвиконавцем трьох науково-дослідних тем відділу

Головним аспектом **наукової новизни** дисертаційної роботи є виявлення здатності розчинної форми HB-EGF людини стимулювати транспорт EGFR до ядра. Вперше продемонстровано, що транспорт відбувається в складі sHB-EGF/ EGFR ліганд-рецепторного комплексу при наявності прямої взаємодії його компонентів протягом транспорту до ядра клітин через цис-мембрани апарату Гольджі та ендоплазматичного ретикулуму. Цікавим є те, що до ядра залучаються лише ті ліганд-рецепторні комплекси, до складу яких входить активна форма рецептору, хоча до цис-мембран транспортуються як активні, так і не активні його форми. Використання інгібітора ендоцитозу РАО

(феніл ареноксида) та антитіл проти ліганду підтвердили екзогенне походження ліганд-рецепторного комплексу. Дія транспортованого до ядра за допомогою sHB-EGF EGFR пов'язана з асоціацією з промоторною ділянкою гену цикліну D1, що може впливати на рівень експресії останнього і вказує на можливість його виступу в ролі транскрипційного фактору, що регулює активність генів, які асоційовані з канцерогенезом та трансформацією клітин. На основі отриманих даних, дисертантом запропоновано новий молекулярний механізм sHB-EGF-стимульованого ядерного транспорту EGFR та його асоціації з промоторною ділянкою гена цикліну D1. На жаль, поки що це продемонстровано в експериментах *in vitro*, однак існують дані, що передбачають такий висновок в спостереженнях *in vivo*, тому питання щодо біологічної ролі зазначеної ядерної локалізації в живих клітинах залишається відкритим для подальших досліджень. Крім того, відомо, що транспорт лігандів EGFR до ядра асоційований з виживаністю клітин. Це важливо для розуміння молекулярних механізмів резистентності до протиракових лікарських засобів, таких як хіміотерапія, радіація. Подальша розробка даного напрямку, спрямована на зменшення рівня ядерного EGFR для подолання зазначеної резистентності, виглядає перспективною.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані свідчать про можливість їх використання при створенні протипухлинних препаратів, спрямованих на інгібування ядерного транспорту EGFR в пухлинах. Крім того, використовуючи, розроблений в ході виконання дисертації рекомбінантний аналог sHB-EGF і здатність HB-EGF зв'язувати диференційний токсин, були створені зразки тест-систем для виявлення активних форм токсину та детекції рівня протективних антитіл, які вже адаптовані до умов виробництва та широкомасштабного застосування науково-виробничою компанією «Діапроф-Мед». Слід зауважити, що ретельно розроблені в ході виконання дисертаційної роботи рекомбінантні конструкції та методичні підходи можуть бути використані для подальшого вивчення молекулярних механізмів ядерного транспорту та біологічної ролі ядерної локалізації рецептор-асоційованого ліганду.

Структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, експериментальної частини, що вміщує 5 розділів, аналізу і узагальнення результатів, висновків і списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації - 166 сторінок машинописного тексту. Ілюстративний матеріал дисертації подано у вигляді 57 рисунків та 4 таблиць.

У роботі чітко сформульовано **мету та 8 головних завдань дослідження**, виконання яких знайшло адекватне відображення у **Висновках**.

Особистий внесок здобувача у виконання дисертаційної роботи не викликає сумніву, оскільки у всіх роботах, опублікованих за темою спільно з іншими дослідниками, прізвище здобувача стоїть першим номером у списку співавторів.

За темою дисертації **опубліковано 5 статей** у фахових журналах, серед яких 1 стаття опублікована в міжнародному журналі «PLOS ONE». Результати роботи також були представлені на 7 наукових конференціях, в тому числі 4 міжнародних.

Матеріали і методи дослідження - сучасні, різноманітні та адекватні поставленим у роботі завданням дослідження. В розділі «Методологія досліджень» детально представлені методичні підходи, які були використані автором роботи та доведена доцільність саме їх використання, що забезпечило достовірність отриманих результатів. Всі генетичні конструкції, що використовувалися для одержання рекомбінантного аналогу sHB-EGF, його секреторної форми та її очищення і перевірки наявності біологічної активності, були ретельно виконані та проаналізовані. Велику увагу було також приділено одержанню та характеристиці генетичних конструкцій, що кодують флуорисцентні підходи секреторної та трансмембранної форми HB-EGF людини для вивчення здатності HB-EGF стимулювати ядерну локалізацію EGFR в пухлинних клітинах з його надекспресією. Крім використання рекомбінантного аналога секреторної форми HB-EGF людини, для вивчення молекулярних механізмів індукції ядерної локалізації EGFR та її наслідків в контексті проліферації та прогресії пухлин, занадто багато уваги було

приділено опису розробки за її участю тест-системи для виявлення функціонально-активного диференційного токсину та протективних протидифтерійних антитіл. Ця вкрай важлива розробка вписується в тему роботи як практичне використання отриманих в ході роботи рекомбінантних sHB-EGF. Між тим виглядає доцільним більше уваги приділити обговоренню потенційних наслідків ядерної локалізації EGFR.

Крім тих зауважень та побажань, що зазначено в тексті, до роботи можна висловити ще декілька **зауважень та побажань**, більшість з яких має редакційний характер. Автор висловлює припущення, що біологічна роль ядерної локалізації рецептор-асоційованого ліганду пов'язана з підтримкою активної конформації рецептору у складі комплексу під час його надходження в клітині. Цей аспект роботи на жаль не досліджений, хоча він становить значний науковий інтерес. Висловлене вище припущення чітко не витікає з результатів роботи. В дисертаційній роботі не завжди наведені дані кількісного аналізу результатів. Приділено занадто уваги опису методичних деталей отримання рекомбінантних білків. Зустрічаються невдалі вирази як «літературні дані». Наведені зауваження не мають принципово наукового характеру.

Висновок. Враховуючи вищезазначене, вважаю, що дисертаційна робота Короткевич Н.В. присвячена важливій науковій і практичній проблемі, представляє собою завершену наукову працю, що за актуальністю проблеми, методичним забезпеченням, науковою новизною та практичним значенням результатів досліджень відповідає вимогам, які ставить ДАК України до кандидатських дисертацій, а її автор, Короткевич Наталія Валеріївна, заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія.

Завідувач відділу функціональної геноміки

Інституту молекулярної біології і генетики

НАН України, д.б.н., професор,

член-кореспондент НАН України



Риндич

Риндич А.В.

Підпис Риндич А.В.
посвідчується
Зав. відділом