

5 - СІЧ 2021

Вх. № 107/03-07  
Г.П. Карлова

## ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу **Криніної Ольги Ігорівни** "Біологічна роль гепарин-зв'язувальної ділянки в структурі гепарин-зв'язувального EGF-подібного фактору росту", представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія».

Робота Криніної Ольги Ігорівни присвячена дослідженню особливостей функціонування гепарин-зв'язувального EGF-подібного ростового фактору (НВ-EGF), який проявляє широкий спектр біологічної дії.

**Актуальність теми.** Дослідження, спрямовані на з'ясування механізмів функціонування ростових чинників в цілому і EGF-подібного фактору росту зокрема, наразі проводяться досить активно, оскільки порушення їх функціонування зареєстровані за численних патологічних станів, включаючи канцерогенез, діабет, атеросклероз, тощо. Ростові чинники розглядають не лише, як ключові ланки, а і як мішенні при проведенні відповідних терапевтичних заходів. Однак, наявних даних про ключові етапи функціонування EGF-подібного фактору росту наразі недостатньо. Представлена до захисту робота якраз і розкриває деякі особливості функціонування зазначеного ростового фактору, а саме у роботі детально проаналізовано роль роль гепарин-зв'язувальної ділянки для реалізації ефекту EGF-подібного фактору росту у різних експериментальних моделях.

**Зв'язок роботи з державними чи галузевими науковими програмами.** Дослідження Криніної О.І. виконувались на базі лабораторії імунології відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України у межах бюджетної теми «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» за 2012-2016 рр. Також експериментальні дослідження проводились в рамках наступних програм: «Розробка засобів для інгібування мітогенної активності гепарин-зв'язувального

EGF-подібного фактору росту (№ держреєстрації – 0115U003643); проекту науково-дослідної роботи за грантом Президента України докторам наук «Рекомбінантні фрагменти молекули дифтерійного токсину як потенційний засіб протиракової терапії» (№ держреєстрації 0116U006914).

**Новизна дослідження та отриманих результатів.** У представлений роботі вперше було з'ясовано, що за відсутності взаємодії гепаран сульфатів із секреторним HB-EGF має місце більш рання транслокація ліганд-рецепторного комплексу до цитоплазми та фосфорилювання відповідного рецептору ніж за наявності такої взаємодії. Також, у ході виконання роботи було створено нові генетичні конструкції, що кодують флуоресцентно-мічені похідні proHB-EGF людини з мутаціями в гепарин-зв'язувальному домені, та на їх основі продемонстровано внутрішньоклітинне транспортування похідного дифтерійного токсину. У роботі застосовано кількісну оцінку процесу ендоцитозу повнорозмірного sHB-EGF та його вкороченої форми з відсутнім гепарин-зв'язувальним доменом.

Враховуючи вищеозначене, результати представленої до захисту роботи Криніної О.І. можуть служити додатковим внеском у розуміння механізмів функціонування EGF-подібного фактору росту.

**Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Переважна частина експериментальних даних представленої роботи отримана та оброблена автором самостійно. Наукова співпраця з керівником роботи та іншими спеціалістами-співавторами докладно представлена у підрозділі «Особистий внесок здобувача».

Експериментальна частина роботи виконана із застосуванням сучасних методів біохімії, молекулярної та клітинної біології, підбір яких повністю відповідає досягненню поставлених задач і дозволив зробити цілком обґрунтовані висновки з отриманих результатів.

Отримані результати в достатній мірі представлені якісними графіками, гістограмами, мікрофотографіями. Результати статистично оброблені за

допомогою двовибіркового t-тесту Ст'юдента для незалежних вибірок з нерівними дисперсіями. Для порівняння трьох та більше вибірок використовували тест ANOVA. Обробку результатів проводили з використання програмного забезпечення GraphPad Prism.

Висновки роботи є ємними, лаконічними і належним чином відображають отримані результати.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті.** Результати, викладені в дисертації, повністю представлені в друкованих працях, серед них 5 статей у фахових наукових виданнях та 6 тез у матеріалах наукових форумів, як українських, так і зарубіжних. Роботи опубліковані протягом 2014-2020 років.

**Загальна характеристика роботи та її відповідність вимогам, що висуваються до кандидатських дисертацій.** За свою актуальністю, високим методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, ступенем новизни отриманих результатів і обґрунтованістю висновків представлена до захисту дисертаційна робота Криніної О.І. “*Біологічна роль гепарин-зв’язувальної ділянки в структурі гепарин-зв’язувального EGF-подібного фактору росту*” повністю відповідає вимогам, що висуваються до кандидатських дисертацій в Україні. Дисертація оформлена відповідно до офіційних вимог – в ній представлені всі необхідні розділи: вступ, огляд літератури, опис методів дослідження, викладення власних результатів та їхнє узагальнення, висновки, список використаної літератури. Науково-експериментальний зміст роботи викладено на 118 сторінках (без списку літератури). Розділ огляд літератури побудований на аналізі 95 літературних джерел, переважна більшість із яких сучасні. В огляді літератури викладені основні дані про об’єкт дослідження (взаємодію HB-EGF з ГС на поверхні клітини чи в позаклітинному матриксі, опосередковану гепарин-зв’язувальним доменом ростового фактору). Літературні дані викладені чітко, логічно, із дотриманням причинно-наслідкових зв’язків.

Розділ «Огляд літератури» дає чітке уявлення про стан проблеми і важливість продовження наукових досліджень в межах, обраних автором.

Експериментальна частина роботи виконана із застосуванням численних сучасних методів біологічних досліджень. Серед них: створення генетичних конструкцій, що кодують proHB-EGF з різними мутаціями в гепарин-зв'язувальному домені, експресія рекомбінантних протеїнів, твердофазний імуноферментний аналіз, культивування клітин евкаріот, вестерн-блот та хемілюмінісцентний аналіз, отримання нокаутної клітинної лінії, МТТ тест, трансфікування клітин евкаріот, конфокальна мікроскопія, протокова цитофлуориметрія, імунізація тварин, тощо. В цілому, докладний опис методів роботи дає змогу при необхідності відтворити умови експерименту і дозволяє зробити висновок про адекватність обраних методів. У роботі проведена ретельна статистична обробка отриманих результатів. Отже, методична частина представленої роботи є дуже вдалим і адекватно підібраним поєднанням сучасних методів біохімії, молекулярної і клітинної біології.

Результати досліджень викладені у 3-х підрозділах роботи з належною повнотою і наведенням відповідних графіків, гістограм, мікрофотографій.

В дисертаційній роботі були отримані результати, що розкривають вплив гепарин-зв'язувального домену в структурі HB-EGF людини на швидкість утворення комплексів секреторної форми HB-EGF з EGFR і їх подальшої інтерналізації та ступінь і тривалість фосфорилювання рецептору, а також підтверджують його значення для утворення стабільного комплексу з похідним дифтерійного токсину.

В цілому, викладення і аналіз результатів свідчить про глибоке володіння автором знаннями з широкого кола проблем, що стосуються галузі досліджень.

Робота викладена грамотною науковою мовою.

Зміст автoreферату відповідає основним положенням дисертації.

При аналізі дисертаційної роботи Криніної О.І. принципових зауважень наукового характеру щодо викладених результатів не виникло.

Окремі зауваження і побажання стосуються переважно аналізу отриманих даних та редакційного оформлення тексту роботи:

1. У кінці розділу «Огляд літератури», базуючись на проаналізованих джерелах, варто було б надати узагальнюючий висновок про необхідність проведення досліджень, що представлені у дисертації;
2. У розділі «Матеріали і методи дослідження», у підрозділі, що описує культивування евкаріотичних клітин не зазначені концентрації антибіотиків, глутаміну, не зазначено, що застосовувались лінії L929a, Vero, MCF-7;
3. У підписі до Рис. 3.4 необхідно вказати одиниці вимірювання.
4. Бажано пояснити, яку характеристику клітин автор пов'язує із циркуляльністю колоній (Рис.4.11 та Рис.4.12).
5. У підписі до Рис. 4.15 варто навести збільшення окуляра і об'єктива, або позначити масштаб безпосередньо на мікрофотографіях;
6. У роботі визначали мітогенну активність природного розчинного sHB-EGF, що продукувався клітинами U937 за умови співкультивування (із використанням напівпроникних мембрани) по відношенню до різних субліній MDA-MB-231. Однак, культивовані клітини U937 окрім sHB-EGF, продукують, як і будь-які евкаріотичні клітини, значну кількість інших біологічно активних речовин. Варто було б надати більш грунтовне пояснення того, чому був зроблений висновок про винятковий вплив sHB-EGF, а не про непряму дію на сублінії MDA-MB-231 інших чинників, синтезованих клітинами U937.
7. В роботі зустрічаються поодинокі синтаксичні та друкарські помилки.

**Висновок.** Дисертаційна робота Криніної О.І. є закінченою, самостійною науковою працею, в якій отримано низку нових даних, важливих як у теоретичному, так і в практичному аспекті. Результати роботи є достовірними. Всі основні положення дисертації відображені у авторефераті. Основний зміст

дисертації опублікований у 11 друкованих працях, серед них 5 статей у фахових наукових виданнях. За своєю актуальністю, методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, новизною отриманих результатів, логічністю, обґрунтованістю висновків представлена до захисту дисертаційна робота Криніної Ольги Ігорівни *“Біологічна роль гепарин-зв'язувальної ділянки в структурі гепарин-зв'язувального EGF-подібного факторуросту”*, відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567, а її автор Криніна Ольга Ігорівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія».

Офіційний опонент

С.н.с., к.б.н.,

С.н.с. відділу сигнальних систем клітини

Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Хоруженко А.Л.  
код 05417101

Підпис обережно! *(Handwritten signature)*  
посвідчується

*Dok. наук. к. ф. Модестова*