

5 - С14 2021

ВІДГУК

на дисертаційну роботу **Криніної Ольги Ігорівни** 108/03-07 Акад
“Біологічна роль гепарин-зв’язувальної ділянки в структурі гепарин-
зв’язувального EGF-подібного фактору росту”
Н.Т. Карлова

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

Актуальність вибраної теми дисертації. Здавалося б, що роль факторів росту зокрема, родини епідермального фактору росту, достатньо глибоко досліджена. Їх моделювання застосовується в лікуванні ракових пухлин. Проте різні ліганди EGFR відрізняються за своєю здатністю індукувати внутрішньоклітинний транспорт рецептору та його ендосомальний сортинг. Особливої уваги заслуговує гепарин-зв’язувальний EGF-подібний фактор росту (НВ-EGF), який призводить до найбільш сильного та стійкого фосфорилування EGFR та його лізосомальної деградації; слугує рецептором дифтерійного токсину та опосередковує його транслокацію до цитоплазми; і надекспресується при канцерогенезі. Проте дані щодо особливостей біологічної активності НВ-EGF в залежності від зв’язування з рядом ко-рецепторних молекул, зокрема гепаран сульфат протеогліканами обмежена. Тема дисертаційної роботи Криніної Ольги Ігорівни присвячена аналізу ролі гепарин-зв’язувального домену у структурі НВ-EGF людини та його значення для забезпечення НВ-EGF-опосередованих ефектів. Відповідно, в роботі вирішується як практична так і фундаментальна проблема сучасної біохімії, зокрема молекулярний механізм взаємодії лігандів з рецепторною кіназою, а також особливості молекулярного патогенезу росту ракових пухлин і відповідно їх лікування.

Зв’язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами Дисертаційна робота виконана у лабораторії імунології відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України в рамках бюджетної теми «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» за 2012-2016 рр. 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).

Мета і задачі дослідження. Мета дисертаційної роботи сформульована чітко і відповідно до теми дисертаційної роботи: дослідження ролі гепарин-зв'язувального домену у структурі HB-EGF людини та його значення для забезпечення біологічної активності ростового фактору, а саме рецепції трансмембранною формою дифтерійного токсину та утворення комплексів його секреторної форми з EGFR і їх подальшої інтерналізації.

А конкретні завдання, поставлені в роботі, в повній мірі відповідають меті.

Робота виконана сучасними методами біохімії, молекулярної фармакології та біотехнології.

Наукова новизна одержаних результатів. В дисертаційній роботі Криніної О.І. отримані нові дані щодо розуміння біологічних ефектів родини епідермального фактору росту в залежності від їх зв'язування з компонентом екстрацелюлярного матриксу ГСПГ, що поглиблює розуміння процесів онкогенної трансформації, а також поширеність впливу дифтерійного токсину на організм людини. Зокрема кількісно оцінено інтенсифікацію транслокації ліганд-рецепторного комплексу до цитоплазми та зменшення фосфорилування рецептору за відсутності гепарин-зв'язувального домену у sHB-EGF. Також встановлено, збільшення афінності дифтерійного токсину до HB-EGF за мутації в його гепарин-зв'язувальному домені. Окремий розділ присвячений клітинним ефектам HB-EGF, як мітогенного фактору.

Практичне значення роботи. Представлена дисертаційна робота має декілька безперечних практичних результатів, які є дієвими інструментами для подальшого вивчення біологічної ролі HB-EGF. Зокрема: (1) створено нові генетичні конструкції, що кодують флуоресцентно-мічені похідні ргоHB-EGF людини з мутаціями в гепарин-зв'язувальному домені; (2) створена клітинна лінія з ноукаутом гену HB-EGF, з використанням технології CRISPR/Cas9, яка є зручною моделлю для контролю направленості дії, ефективності та безпечності протипухлинних засобів; (3) отримані нейтралізуючі поліклональні антитіла до sHB-EGF з визначеною біологічною активністю.

Структура та обсяг дисертації. Ця дисертаційна робота викладена на 129 сторінках друкованого тексту і складається із вступу, огляду літератури,

експериментальної частини, яка включає опис матеріалів і методів, отримані результати, аналіз і узагальнення результатів досліджень, висновки та список використаних літературних джерел, що охоплює 95 найменувань. Робота містить 38 рисунків та 7 таблиць.

В літературному огляді досить ретельно проаналізовано сучасні відомості щодо загальної характеристики та будови ростового фактору HB-EGF, особливостей його протеолітичного процесингу, гепарин-зв'язувальної активності, а також різної афінності до рецепторів HB-EGF та особливостей внутрішньоклітинної сигналізації. Наведений аналіз біологічної ролі HB-EGF на різні системи організму ссавців, зокрема як рецептора до дифтерійного токсину та мішені протиракової терапії.

Криніна О.І. проаналізувала 95 джерел, виключно англійською мовою, які мають безпосереднє відношення до теми дисертації і віддзеркалюють сучасний стан проблеми. Серед літературних джерел 1/3 опубліковані за останні п'ять років. В огляді літературу автор намагався підкреслити ключові моменти щодо актуальності та необхідності проведення дисертаційних досліджень.

Результати досліджень викладені логічно, добре систематизовані, опрацьовані статистично. Сподобалося наявність окремого підрозділу в матеріалах і методах – де узагальнено перелік всіх програмних продуктів «програмне забезпечення».

Вражає кількість проведених досліджень, склалось враження, що автор намагався відповісти на всі можливі запитання.

В роботі проведений детальний аналіз отриманих результатів, автор намагається пояснити всі відхилення отриманих даних. Надає пояснення щодо необхідності певних експериментальних кроків.

В роботі застосовані класичні підходи фармакологічних дослідження перекладені на інструменти молекулярної фармакології, зокрема: замість антагоністів застосовано нокаут гену, чи нейтралізоване антитіло; замість селективного блокатора – заміна амінокислотних залишків у гепарин-зв'язувальному сайті. Наприклад для доказу ролі гепарин-зв'язувальної ділянки HB-EGF у взаємодії з дифтерійним токсином спочатку перевірено ефект рекомбінатного ДТ на лінію клітин, встановлена залежність між кількістю HB-EGF та ефектом ДТ. Потім, застосований метод молекулярного антагоністу, зокрема отримана клітинна лінії MDA-MB-231 з відсутнім синтезом proHB-

EGF шляхом трансфікування (нокаут гену), для підтвердження ефектів ДТ на життєдіяльність ракових клітин.

Взагалі роботу можна розділити на дві частини: механістичну (дослідження особливостей зв'язування та внутрішньоклітинного транспорту, а також життєдіяльності клітин) і інструментальну (рекомбінантні протеїни, мутації, клітинні лінії, поліклональні антитіла).

У розділі «Обговорення результатів» зроблений детальний аналіз отриманих результатів, а також проведено їх співставлення з літературними даними.

У висновках відображені основні результати дисертаційної роботи.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. За результатами дисертації опубліковано 11 робіт, з них 5 статей у вітчизняних та іноземних фахових наукових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України і реферуються БД Scopus/Web of Science і 6 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових форумів.

Дисертаційна робота Ольги Ігорівни заслуговує на позитивну оцінку, але в процесі роботи над дисертацією виникли деякі зауваження та дискусійні питання та побажання:

1. Огляд літератури хотілося б щоб завершувався узагальнюючим висновком, який повинен логічно підвести читача до мети роботи.
2. Розділ матеріали і методи виграв би, якщо містив би окремий підрозділ зі схемою експерименту, де були приведені деталі всіх протоколів.
3. В підрозділі «Дослідження активації EGFR та кінази MAPK-каскаду в клітинах під впливом повнорозмірної та вкороченої форм sHB-EGF» відсутні дані про активність кінази MAPK-каскаду. Не зрозуміло чи дані відсутні чи некоректно названий розділ?
4. Експериментальні дані було б легше структурувати і сприймати, якщо б після кожного розділу експериментальних даних наводили перелік ключових висновків.
5. Також, відсутній один конкретний узагальнюючий висновок, який відповідає на питання «Яка біологічна роль гепарин-зв'язувального домену у складі HB-EGF?»
6. Також в роботі є невдалі вирази/калька з англійської мови – сайленсинг клатрин, секвеструвати ростові фактори, проліферативні дослідження,

клітинний дебріс. Зустрічаються повтори слів. Це не впливає на загальний зміст роботи.

В якості дискусії хотілося почути відповіді на наступні запитання:

1. Чи не пов'язаний показник інтенсивності зв'язування укороченої форми рекомбінатного sHB-EGF на поверхні клітин з більш швидкою інтерналізацією рецептора, а не зменшенням зв'язувальної активності?
2. Чи не порівнювали ви активацію кіназ MAPK-каскаду клітин лінії A431 після інкубування з повнорозмірною або вкороченою формою рекомбінатного sHB-EGF. Чи співвідносяться ці дані із даними фосфорилування EGFR? І чи не пов'язано зменшення фосфорилування EGFR за дії вкороченої форми рекомбінатного sHB-EGF зі зменшеною зв'язувальною активністю, яка була вами встановлена?
3. На Рис. 4.16. Б - Мітогенна активність природного sHB-EGF, що виділявся клітинами U937 при ко-культивуванні з використанням напівпроникних мембран по відношенню до різних субліній MDA-MB-231. На рисунку наведені дані проліферативної активності за МТТ-тестом в нокаутуваних клітинах він вищий ніж в клітинах дикого типу? Як це можна пояснити? Також, прокоментуйте будь ласка на різнонаправлений ефект sHB-EGF на мітогенну активність інтактних та нокаутуваних клітин.
4. Який можливий механізм більш інтенсивної міграції клітин MDA-MB-231^{HB-EGF(-)}?
5. Як ви можете пояснити той факт, що мутація ргоHB-EGF по гепарин-зв'язувальному домені призводила до збільшення сайтів зв'язування до ДТ. Більш того мутантна форма ргоHB-EGF мала менше значення K_d , порівняно з нормальною формою. Т.б. гепарин-зв'язувальний домен не є ключовим для опосередкування ефектів ДТ на клітини? В той же час мутація у гепарин-зв'язувальному домені sHB-EGF призводила до зменшення зв'язувальної активності з ДТ?
6. В літературному огляді Ви зазначаєте, що «HB-EGF має здатність активувати металопротеїнази, а саме MMP-9 та MMP-3, що може сприяти метастазуванню та прогресуванню пухлин. При надмірній експресії HB-EGF спостерігалось збільшення рівня експресії MMP-9 та MMP-3», можна більш детально прокоментувати - як це відбувається?

Вищенаведені питання і побажання не знижують наукової цінності дисертаційної роботи, адже вони стосуються переважно її оформлення та інтерпретації результатів.

Загальний висновок. Зважаючи на актуальність теми, наукову новизну одержаних результатів, теоретичне і практичне їх значення, високий методичний рівень проведених досліджень та інші позитивні якості дисертаційної роботи Криніної Ольги Ігорівни «Біологічна роль гепарин-зв'язувальної ділянки в структурі гепарин-зв'язувального EGF-ПОДІБНОГО фактору росту», вважаю, що вона відповідає вимогам п.п. 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р., № 567 (зі змінами), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Начальник науково-дослідної частини,
професор Інституту високих технологій
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка, д.б.н., проф.



Толстанова Г.М.

ПЛАННС ЗАСЛУЖУЮ
ВЧЕШНІЙ СЕКРЕТАР НАЧ
КАРАУЛЬНА Н.В.
31.10.2020р.

