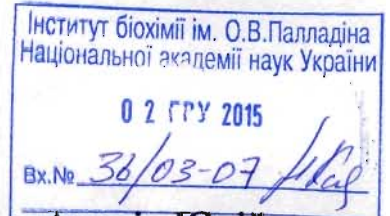


ВІДГУК



офіційного опонента на дисертаційну роботу **Лабинцева Андрія Юрійовича** «Молекулярні механізми реалізації рецептор-зв'язувальної та транспортної функції дифтерійного токсину», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Актуальність обраної теми дисертації. Дисертаційна робота Лабинцева Андрія Юрійовича присвячена актуальній проблемі сучасної біохімії, а саме вивченню особливостей структурної організації дифтерійного токсину (ДТ) для з'ясування механізмів реалізації його токсичної функції. Насьогодні відзначається значний рівень зацікавленості наукової спільноти до виявлення причини проявів захворювання на дифтерію, пов'язаної з колонізацією верхніх дихальних шляхів токсигенними штамми дифтерійної палички *Corynebacterium diphtheriae*, що призводить до значних ускладнень на тканинному та органному рівні. Загальновідомо, що дифтерійний токсин каталізує реакцію АДФ-рибозилування фактора елонгації еукаріотів eEF-2 (належить до родини G-білків), що сприяє його інактивації з подальшим порушенням процесу транслокації і зупинкою трансляції в цілому. Отже, дослідження доменної організації та механізмів виокремлених функцій доменів дифтерійного токсину, а саме рецептор-зв'язувальної та транспортувальної, на молекулярному рівні і стало метою дисертаційної роботи, яку слід вважати актуальною.

Дисертаційне дослідження А.Ю. Лабинцева проведено в рамках виконання НДР, які є пріоритетними напрямками розвитку науки: «Структурно-функціональний аналіз протеїнів за норми та деяких патологій», ДРН_№ 0107U007187, 2007-2011 р.р.; «Вивчення структури і функції протеїнів і пептидів для біомедицини», ДРН_№ 0109U002778, 2009-2013 р.р.; «Використання рекомбінантного рецептора HB-EGF в тест-системах для виявлення дифтерійного токсину та антитоксичних антитіл з

протективними властивостями», ДР№ 0111U004316, 2011 р.; «Структурно-функціональний аналіз протеїнів за норми та деяких патологій», ДР № 0112U002624, 2012-2016 р.р.

Обґрунтованість наукових положень дисертації, їх новизна та практичне значення. Лабинцев А.Ю., спираючись на обґрунтованість актуальності обраної теми, коректно сформулював мету та поставив відповідні до неї задачі: створення та характеристика модельних протеїнів-похідних ДТ, генетично-злитих з різними флуоресцентними протеїнами, для подальшого дослідження рецептор-зв'язувальної та транспортної функції ДТ; визначення особливостей взаємодії фрагментів ДТ з клітинами нечутливих до дії токсину видів тварин, дослідження цитотоксичності фрагмента ДТ – субодиниці В та встановлення впливу транспортного домену ДТ на внутрішньоклітинний транспорт токсину та на рН ендосомального середовища везикул з токсином.

Із наукової новизни одержаних результатів відразу слід виділити те, що автором було вперше проведено комплексне дослідження по встановленню особливостей реалізації молекулярних механізмів рецептор-зв'язувальної та транспортної функції дифтерійного токсину. Здобувачем вперше отримано генетичні конструкції фрагментів дифтерійного токсину, злитих з різноманітними флуоресцентними та рН-чутливими флуоресцентними протеїнами, оптимізовано методи їх виділення, ренатурації та очистки. Проведено детальні дослідження властивостей цих протеїнів, зокрема перевірено їх спектральні характеристики, продемонстровано їх здатність взаємодіяти з клітинами, розраховано кінетичні параметри такої взаємодії, оцінено можливість стимулювати формування ендосом. Вперше виявлено здатність субодиниці В ДТ взаємодіяти з клітинами нечутливих до токсину видів тварин та охарактеризовано кінетичні параметри цієї взаємодії. Дисертант вперше встановив можливість впливу транспортного домену ДТ на реалізацію внутрішньоклітинного транспорту токсину з залученням системи ендосом.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дослідження поглиблюють існуючі уявлення про особливості реалізації рецептор-зв'язувальної та транспортної функції дифтерійного токсину, що може мати широке прикладне застосування в науковій та медичній сферах. За допомогою рекомбінантного флуоресцентно-міченого рецептор-зв'язувального домену токсину можливо специфічно визначати рівень рецептора proHB-EGF, надекспресія якого є маркером ряду онкопроліферативних захворювань. Використання "модифікованого і навантаженого" транспортного домену дифтерійного токсину для цілеспрямованої доставки ліків та інших біологічно-активних сполук в цитозоль клітини є перспективним напрямом сучасної медицини. Виявлена автором здатність транспортного домену впливати на дозрівання ендосом може бути застосована в дослідженнях внутрішньоклітинного ендосомального транспорту. Насьогодні відомо про існування імунотоксинів на основі каталітичного і транспортного домену дифтерійного токсину та різних лігандів, що здатні цілеспрямовано знищувати пухлини певних типів. Крім того, з використанням рекомбінантних фрагментів дифтерійного токсину та рецептора proHB-EGF було створено унікальні тест-системи «IBChem-DiTox» та «IBChem-AntiDiTox», що дозволяють детектувати вміст дифтерійного токсину та протективних антитіл в крові пацієнта.

Стосовно структури та обсягу дисертації слід відзначити, що вона викладена на 140 сторінках, містить 34 рисунки, 1 таблицю та 1 додаток і традиційно складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень та їх аналізу і узагальнення, висновків та списку використаних літературних джерел. В огляді літератури представлено дані щодо особливостей будови, синтезу та функціонування ДТ. На особливу увагу, на мою думку, заслуговує розділ, присвячений висвітленню нових, малодосліджених функцій дифтерійного токсину, які названо «неканонічними». В методологічній частині розглянуто особливості використання та переваги використаної експресійної системи; наведено

аналіз різних методів рефолдингу рекомбінантних протеїнів. Крім того, наведено характеристику сучасних методів, використаних у роботі, а саме конфокальної мікроскопії та протокової цитометрії.

Щодо представлення результатів власних досліджень, то здобувач активно і творчо використовує методи комп'ютерного аналізу, зокрема для розрахунку кінетичних параметрів взаємодії фрагментів ДТ з клітинами, визначення рН всередині ендосом з токсином та динаміки її зміни. Слід особливо відзначити цю частину роботи, оскільки в зарубіжних та вітчизняних наукових статтях в основному статистична і математична обробка таких даних або частково представлена, або навіть відсутня, що не дає змоги кількісно оцінити результати як протокової цитометрії, так і конфокальної мікроскопії. Висновки, наведені в роботі, є логічно пов'язаними з поставленою здобувачем метою та відповідним задачам дослідження. Автореферат повною мірою відображає найважливіші положення дисертації.

Результати роботи достатньо висвітлені у 14 наукових працях, 7 з яких опубліковано у вигляді статей у фахових періодичних наукових виданнях, затверджених переліком МОН України, та 7 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

Поряд з наведеною позитивною оцінкою дисертаційної роботи слід навести ряд зауважень та побажань:

1. Слід відзначити певну дискусійність можливості екстраполяції отриманих даних щодо рекомбінантних фрагментів ДТ на модель функціонування нативного токсину.
2. З методичної точки зору для дослідження функціонування фрагментів дифтерійного токсину вважаю за необхідне застосування специфічних інгібіторів клатрин-залежного ендоцитозу, оскільки використаний здобувачем феніларсеноксид вважається інгібітором загального шляху ендоцитозу.

3. Огляд літератури викладений дещо стисло, хоча за обсягом цілком відповідає вимогам до оформлення дисертацій. Щодо певних підрозділів, то, на мій погляд, підрозділ 1.6, де описано загальні ферментативні характеристики дифтерійного токсину, треба перенести на початок огляду літератури.
4. В результатах дослідження варто зазначити шкали розмірностей на рисунках 3.10, 4.4.
5. В дисертаційній роботі мають місце деякі стилістично невдалі вислови та незначна кількість граматичних помилок.
6. Вважаю за необхідне рекомендувати продовжити в подальшому дослідження механізмів індукції програмованої клітинної загибелі (апоптозу) за участі SubB на інших клітинних лініях, як представлено в роботі на прикладі U937, що поглибить знання про біохімічні механізми активації апоптозу та матиме практичне застосування.

Зазначені зауваження, недоліки та побажання не знижують наукової цінності представленої дисертаційної роботи та не змінюють загальної позитивної оцінки. У зв'язку з викладеним вище вважаю, що дисертаційна робота Лабинцева Андрія Юрійовича на тему «Молекулярні механізми реалізації рецептор-зв'язувальної та транспортної функції дифтерійного токсину» відповідає вимогам п.п. 11, 12, 13 постанови Кабінету Міністрів України «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» від 24 липня 2013 року, № 567, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, доцент кафедри біохімії ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка



Т.Р. Андрійчук