

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Манойлова Кирила Юрійовича на тему «Біологічні властивості рекомбінантних фрагментів молекули дифтерійного токсину», поданої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Дослідження ролі та можливого застосування окремих фрагментів біологічно активних білків належить до провідних напрямків сучасних біохімічних досліджень. Спільно з традиційними методами протеолітичної фрагментації білків, дедалі більшого значення набуває отримання функціональних субодиноць рекомбінантними методами. Це дає змогу отримати досить значні кількості білків та пептидів, що містять окремі зв'язуючі чи каталітичні домени, дослідити їх властивості та з'ясувати можливості застосування як для науково-пізнавальних, так прикладних цілей. За наявності ж у клітини-продуцента інфекційних властивостей застосування рекомбінантних технологій отримання фрагментів відповідної молекули практично зводить нанівець ризику інфікування, розширює можливості проведення різнопланових досліджень та різко зменшує їх кошторис. Подібні міркування було покладено й в основу розглянутої роботи. За об'єкт дослідження обрано молекулярні механізми реалізації біологічної активності нетоксичних аналогів функціональних фрагментів дифтерійного токсину. Вибір подібного об'єкта заслуговує схвалення, оскільки хоча сам дифтерійний токсин на протязі багатьох років всебічного досліджується у провідних наукових лабораторіях біологічного, медичного та біохімічного напрямку, однак через інфекційні властивості подібного роду роботи могли виконуватись в дуже обмеженій кількості лабораторій. Завдяки ж можливостям рекомбінантних технологій вдалося провести дослідження впливу окремих доменів молекули токсину на клітини ссавців та їх компоненти за умов *invitro* етапах зв'язування із рецептором токсину ргоНВ-EGF, їх інтерналізації у складі ендосом в цитоплазму та внутрішньоклітинного везикулярного транспорту, іон-провідної функції у штучних ліпідних мембранах. Проведено вивчення цитостатичної дії цих фрагментів по відношенню до малігнізованих клітин з організму людини. Остання риса роботи варта значної уваги, оскільки відомо, що застосування існуючих цитостатичних препаратів пов'язано з вкрай тяжкою побічною дією. Все це дає змогу говорити про розглянуту роботу як про виконане на

високому науково-методичному рівні дослідження, що не лише істотно поглиблює існуючі уявлення щодо механізмів дії дифтерійного токсину, але й може мати істотне практичне значення. Тому щодо актуальності теми розглянутої роботи жодних зауважень не виникає.

Відповідно до теми роботи сформульовано мету дослідження – встановити особливості взаємодії рекомбінантних похідних молекули дифтерійного токсину, синтезованих в клітинах *Escherichia coli*, з клітинами ссавців на етапах зв'язування з рецептором, взаємодії з ліпідними мембранами та ендосомної інтерналізації. Для досягнення поставленої мети було поставлено завдання окремі практичні завдання, що включали порівняння за умов *invitro* взаємодії з рекомбінантним HB-EGF людини та миші протеїнів CRM197 та субодиниці В, синтезованих в клітинах *E. coli*, та отриманих з нативного дифтерійного токсину, дослідження зв'язування аналога токсина, білка CRM197 та субодиниці В з клітинами чутливих та резистентних до його дії видів ссавців, процесів інтерналізації CRM197, субодиниці В та його рецепторного домену в клітини ссавців, з'ясування іон-провідної функції цих фрагментів у штучних бішарових ліпідних мембранах, їх цитостатичної дії на трансформовані клітини з організму людини. Подібна деталізація видається виправданою і заперечень не викликає.

Робота побудована за традиційною схемою і містить вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, результати та їх обговорення, висновки, список літератури. Літературний огляд свідчить про належне ознайомлення автора з розглянутими в роботі питаннями. Методична частина містить широкий набір сучасних біохімічних, біофізичних та молекулярно-біологічних методів, а саме – електрофоретичне розділення білків та нуклеїнових кислот, металоафінну хроматографію та хімічну модифікацію білків. Заслугує на схвалення й набір методів мікробіології та молекулярної біології, пов'язані з культивуванням бактерійних штамів-продуцентів, селекцією цільових мікроорганізмів, трансформацією прокаріотичних клітин векторними конструкціями, клонуванням фрагментів ДНК в плазмідні вектори. В роботі широко застосовані протокова цитофлуориметрія та конфокальна мікроскопія. Тобто один лише перелік застосованих методичних підходів свідчить про дослідження, виконане на виключно високому методичному рівні. Все це дало можливість отримати вагомі дані, що істотно розширюють уявлення щодо властивостей досліджуваних фрагментів, можливості їх застосування як з науково-дослідницькими, так і практичними цілями. Автором вперше показано,

що рекомбінантні аналоги дифтерійного токсину CRM197 та субодиниця В виявляють підвищену здатність до взаємодії з рекомбінантним рецептором HB-EGF резистентних до дії токсину видів ссавців порівняно до низьких зв'язуючих властивостей нативного токсину. Вперше показано, що взаємодія рекомбінантних протеїнів CRM197 та субодиниці В із токсин-чутливими клітинами Vero та токсин-резистентними клітинами L929 мають подібні між собою константи афінності. Показано відміни між клітинами L929 та Vero щодо кількісного співвідношення і внутрішньоклітинного розподілу інтерналізованих рекомбінантних молекул субодиниці В та рецептор-зв'язувального домену дифтерійного токсину. Показано збереження здатності транслокаційним доменом досліджуваних рекомбінантних білків до формування іонних каналів у штучних ліпідних мембранах, причому властивості цих каналів виявились подібними до каналів, утворених незміненим токсином. Подібні спостереження видаються перспективними щодо подальших досліджень як властивостей дифтерійного токсину, так і для моделювання іон-провідних каналів. Особливої уваги варте виявлення цитостатичного впливу транслокаційного домену у складі рекомбінантних аналогів токсину на проліферацію ракових клітин раку грудної залози. Останній здобуток роботи може мати значне практичне значення оскільки створює якісно новий підхід до пригнічення розвитку ракових клітин, що не матиме ключового недоліка сучасних цитостатиків – вкрай тяжкої побічної дії, обумовленої пошкодженням біосинтезу білка як ракових, так і здорових клітин.

Отже, можна впевнено говорити про розглянуту роботу як про виконане на високому науково-методичному рівні дослідження, здобутки якого мають як науково-пізнавальне, так і практичне значення. Висновки роботи повною мірою відповідають отриманим результатам. За матеріалами роботи опубліковано 6 експериментальних статей у фахових наукових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, їх неодноразово доповідали на вітчизняних та міжнародних наукових з'їздах та конференціях.

Принципових зауважень до роботи немає. Подекуди відмічається застосування невдалих виразів та друкарських помилок, в тексті зустрічаються повтори. Все це не впливає на оцінку роботи. Щоправда, хотілось би почути відповідь на наступні питання:

1. Відомо, що біосинтез білка в еволюційно чужорідній клітині зазвичай призводить до утворення функціонально неповноцінних похідних через неспроможність клітини-продуцента забезпечити нативний холдинг

новоутворюваного білка. Реактивація так званих тілець включення, тобто білкових агрегатів, утворених цільовим білком, становить важку і все ще далеку до успішного вирішення проблему. Яким чином авторові вдалося досягти отримання високоактивних рекомбінантних фрагментів?

2. Що може сказати пошукувач стосовно впливу субодиниці А в складі рекомбінантних аналогів дифтерійного токсину на іонну провідність через канали, утворені транслокаційним доменом молекули токсину у штучних ліпідних бішарових мембранах?

3. Як, на думку пошукувача, впливає транслокаційний домен у складі рекомбінантних аналогів дифтерійного токсину на цитостатичну дію досліджуваних рекомбінантних аналогів токсину?

Виходячи з наведених міркувань, вважаю, що розглянута дисертаційна робота є цілісною, закінченою науковою працею, що повною мірою відповідає вимогам п.п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», 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. та № 567 від 27.07.2016 р.), що висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор - Манойлов Кирило Юрійович - заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Офіційний опонент – завідувач лабораторії біохімії
ДУ «Інститут отоларингології ім. О.С. Коломійченка НАМН України»,
доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Верьовка С.В.

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ОТОЛАРИНГОЛОГІЇ
ІМ. ПРОФ. О.С. КОЛОМІЙЧЕНКА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»
ЗГІДНО З ОРИГІНАЛОМ

Підпис *Верьовка С.В.*
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. відділом кадрів *С.В. Верьовка*

