

## Відзив офіційного опонента

на дисертаційну роботу **КУКЛІНА Андрія Володимировича**  
**«ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ В ІНТАКТНИХ**  
**ГЕПАТОЦИТАХ ТА ПЕЧІНЦІ ЩУРА ПІД ЧАС ЇЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ»,**  
поданої до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних  
наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Дисертаційна робота А.В. Кукліна присвячена **актуальним проблемам** сучасної біології – з'ясуванню молекулярних механізмів процесів регенерації і ролі імунних механізмів у забезпеченні цих процесів. Еспериментальною моделлю для такого дослідження автор вибрав регенерацію печінки, що, з одного боку, інтенсивно вивчається, а, з іншого боку, трансплантація цього органу є надзвичайно складною операцією, а вирощування клітинного матеріалу для регенерації залишається невирішеним питанням. Ця робота має також певне методичне значення, оскільки запропоновані автором відомості про характер експресії специфічних генів печінкових клітин є корисною вказівкою (алгоритмом) для інших дослідників, які займаються проблемами регенерації.

Робота відповідає **спеціальності** 03.00.03 – молекулярна біологія.

**Роботу виконано** в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України **в рамках** держбюджетної теми «Особливості функціонування та множинність форм фактора елонгації трансляції 1 вищих еукаріотів» (№ 0105V005340, 2006-2010 рр.). Крім того, автором проведені дослідження за грантом УНТЦ № 4381 «Новітні технології у вивченні функціональної активності інтерферону альфа» (2007-2009 рр.), а також за короткостроковими грантами ЮНЕСКО для досліджень в Інституті онкології імені М. Склодовської-Кюрі (м. Глівіце, Польща) і грантом на виконання українсько-індійського науково-дослідного проекту "Роль модифікуючих ензимів родини TRIM в регуляції інтерферону альфа і виживання клітин печінки при регенерації". У роботі також використані результати державної цільової науково-технічної програм із впровадження і застосування технологій ГРІД для моделювання мереж генної регуляції з метою системного аналізу відповіді печінки на дію інтерферону альфа».

У **списку праць** за темою дисертації наведено 5 статей, включно зі статтею у міжнародному журналі *J. Interferon & Cytokine Res.* (2014), в якій здобувач є 1-м автором, а також 4 статті у такому академічному виданні, як **Biopolymers and Cell**. Серед тез за результатами дисертаційної роботи переважають такі, що опубліковані у матеріалах міжнародних наукових конференцій. Хотілося б почути від здобувача, на яких із цих конференцій він

побував особисто і з якою доповіддю (усною чи стендовою) він там виступав. Автором дисертації одержано Патент України на корисну модель, але згадка про це чомусь наведена у кінці списку тез, тоді як цю інформацію доцільно було навести відразу після списку опублікованих статей.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Дисертаційна робота А.В. Кукліна була націлена на: 1) визначення особливостей зміни профілю генної експресії у первинних гепатоцитах щура із використанням мікрочіпів на базі олігонуклеотидів ДНК із високою щільністю зондів; 2) характеристику транскрипційної відповіді з боку генів *Isg15*, *Ubell*, *Ube2l6*, *Usp18* після часткової гепатектомії. При цьому встановлено, що така відповідь не співпадає у часі з транскрипційною відповіддю з боку гена *Ifna*.

Враховуючи значну кількість досліджень процесів, які супроводжують часткову гепатектомію у щура, автору дисертаційної роботи необхідно було **більш чітко підкреслити**, що принципово нового ним було досягнуто в ході виконання роботи. Очевидно, новизна тут полягає у встановленні послідовності активації генної експресії у первинних гепатоцитів упродовж 3-х і 6-ти год з початку дії IFN $\alpha$ . Тоді як твердження автора у 1-му реченні Висновку 2 про те, що «Вперше охарактеризовано зміни в профілі генної експресії у первинних гепатоцитах під впливом IFN $\alpha$  за умов, наближених до ситуації після часткової гепатектомії», викликає певні сумніви щодо терміну «вперше».

В описі «**Практичного значення одержаних результатів**» об'єктивно вказано основні положення науково-практичної цінності дисертаційної роботи. Разом з тим, 1-ше речення, яке звучить «Результати проведених досліджень із симуляції впливу ендогенного IFN $\alpha$  на клітини печінки під час регенерації печінки **поглиблюють існуючі дані** про участь цього цитокіну у відновлювальних процесах, а також у процесах, які не пов'язані із вірусною інфекцією» слід визнати «**науковим штампом**» і без нього тут можна було б обійтися.

На думку опонента, визначення **мети дослідження** (Охарактеризувати експресію гена *Ifna* та його генів-мішеней в печінці, що регенерує, впродовж пререплікативного періоду) більш чітко відображає головну ідею роботи, ніж існуюча назва роботи (Експресія генів вродженого імунітету в інтактних гепатоцитах та печінці щура під час її регенерації), яка є досить загальною. Натомість, до мети роботи доцільно було б додатково включити положення про характеристику експресії гена *Ifna* на рівні мРНК в тканині, ізольованих гепатоцитах і непаренхімних клітинах інтактної печінки та печінки після лапаротомії.

Відповідно до поставленої мети, автор запропонував вирішення **6-ти головних завдань**, які повністю відповідають спеціальності «молекулярна біологія». Необхідно зауважити, що Завдання 3 (Верифікувати результати експерименту з мікроареями ДНК шляхом аналізу експресії вибіркового генів методом зворотної транскрипції і кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-кПЛР)) не можна вважати абсолютною верифікацією експресії генів, що, в першу чергу, передбачає Вестерн-блот аналіз продуктів генів, чи оцінку біологічної активності цих продуктів. Без такого аналізу важко стверджувати про те, що генна експресія призводить до прояву тих чи інших біологічних функцій.

**Методи дослідження**, використані під час виконання дисертаційної роботи, сучасні й адекватні спеціальності «молекулярна біологія». Разом з тим, у роботі доцільно було застосувати й деякі біохімічні (Вестерн-блот аналіз білків і визначення їх ензиматичної активності) і клітинно-біологічні (проточна цитофлуориметрія і мікроскопічна цитохімія клітин). Це суттєво підвищило б цінність одержаних результатів і їх фізіологічну інтерпретацію.

Розділ 4 «**Узагальнення одержаних результатів**» написаний логічно і базується на одержаних даних. Зауваження тут можна висловити до значної кількості «*наукового сленгу*», який зустрічається в тексті цього розділу.

Крім розділу «Узагальнення одержаних результатів» і «Висновків» у дисертаційній роботі міститься також Розділ 4.5 «**Резюме**», написаний майже на 3-х сторінках. Тут здобувач обговорює висловлене ним і співавторами припущення про «можливу участь  $IFN\alpha$  як найактивнішого фактора вродженого імунітету і цитокіна плейотропної дії, в переході клітин печінки від стану проліферативного спокою до активації проліферації». Результати дисертаційної роботи слугують доказами на користь цього припущення. Разом з тим, тут використовується теза про «*квазіфізіологічну дію  $IFN\alpha$* , яка мала би перешкоджати розвитку проапоптичних процесів та інгібуванню проліферації, що спостерігаються за терапевтичної дії  $IFN\alpha$ , наприклад, під час лікування вірусного гепатиту». Питання до здобувача – чому саме він називає цю дію квазіфізіологічною.

За результатами дисертаційного дослідження автором зроблено **6 висновків**, які, в цілому, відповідають одержаним результатам.

**Список використаних джерел** налічує 180 цитувань, серед яких 6 цитувань 2016 року, 2 - 2015 року, 4 - 2014 року, багато – 2013 року.

Результати дослідження були піддані **статистичній обробці**, що відмічено на рисунках і у підписах до них.

**Структура роботи** є традиційною. Детально описаний «Зміст роботи» Розділ «Огляд літератури» добре ілюстрований, що полегшує сприйняття

наведеного там матеріалу. В кінці цього розділу підведений підсумок, де вказано, що було відомо до виконання дисертаційної роботи, що було невідомо, і які головні цілі були поставлені в роботі. Робота містить «Додатки» з матеріалами біо-інформаційного аналізу одержаних результатів.

**Редакційні зауваження і запитання** до дисертаційної роботи А.В. Кукліна, що не наведені у викладеному вище тексті Відзиву опонента.

1) В авторефераті, а не лише в тексті дисертації, при описі «Матеріалів і методів дослідження» необхідно було вказати Протокол засідання комісії з Біоетики за номером №8 від 20.09.2016 р. про дотримання автором норм і вимог гуманного ставлення до лабораторних тварин у дослідженні.

2) У молекулярно-біологічній термінології пора запровадити замість терміну «мікроареї ДНК», що використовується автором у рецензованій роботі, інший більш відповідний термін, наприклад, «мікрочіпи чи мікроматриці ДНК».

3) У дисертаційній роботі зустрічається «лабораторний сленг», наприклад, «вода, що оброблена ДЕПКом». По-перше, такого скорочення (ДЕПК) нема у списку скорочень до дисертації, а, по-друге, скорочення не мають відмінків.

4) У підписі до Таблиці 3.1 вказано «концентрація мРНК...», тоді як насправді це – кількість копій молекул РНК у розрахунку на нг тотальної РНК. Про це, до речі, написано у дужках у коментарі до підпису. Очевидно, це ж зауваження стосується і Рис. 3.1 та Рис. 3.2.

5) Назва підрозділу 3.2. звучить «IFNa «включає» 24 диференційно експресованих гена....» доцільно відредагувати на «IFNa диференційно індукує експресію 24-х генів....».

6) У підписах до Рис. 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 замість терміну «планка похибки» краще було б використати термін «діапазон похибки».

7) Не зовсім прийнятним є термін «ІСГілування», який доцільно замінити більш адекватним терміном.

8) Висновки до дисертаційної роботи звучать дуже лаконічно і хотілося б побачити в них більше конкретики і кількісної характеристики наведених результатів. Наприклад, у Висновку 1 сказано «Експресія гена *Ifna* у непаренхімних клітинах печінки **зростає** на початку відновлювального процесу вже через 1 год після часткової гепатектомії і **знижена** впродовж 12 год після лапаротомії». Питання до автора – **наскільки вона зростає** через 1 год після часткової гепатектомії і **наскільки вона знижується** впродовж 12 год після лапаротомії. У Висновку 6 стверджується про те, що «більш рання відповідь на часткову гепатектомію реалізується за участі процесів транскрипції і трансляції, а на лапаротомію – за участі тимчасової модифікації білків шляхом ІСГілування». Це – дуже не конкретні твердження.

Як видно із наведених зауважень, переважна більшість із них має редакційний або рекомендаційний характер і тому вони суттєво не впливають на основний зміст дисертаційної роботи А.В. Кукліна і на зроблені в ній висновки.

**Висновок.** Дисертаційна робота Кукліна Андрія Володимировича «ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ В ІНТАКТНИХ ГЕПАТОЦИТАХ ТА ПЕЧІНЦІ ЩУРА ПІД ЧАС ЇЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ», за своїм об'ємом та актуальністю, науково-практичною цінністю, методичним рівнем, проведеним аналізом і зробленими висновками відповідає вимогам ДАК МОН України до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент,

Завідувач відділу регуляції проліферації клітин та апоптозу

Інституту біології клітини НАН України,

доктор біологічних наук, професор,

член-кореспондент НАН України



Стойка Р.С.

Львів, 30 вересня 2016 р.

Підпис член-кореспондента НАН України Стойки Р.С. засвідчую:

Учений секретар Інституту біології клітини НАН України,

к.б.н.



Барська М.Л.