

16 СІЧ 2017

Вх. №

62/03-07/19
Харькова А.П. / А.П.

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Харькової Анастасії Павлівни

**„ERN1-залежна регуляція експресії генів системи IGF у клітинах гліоми”,
що представлена до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата
біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія**

Дисертаційна робота Анастасії Павлівни Харькової присвячена вивченню молекулярних основ регуляції проліферації клітин гліоми на рівні експресії генів системи IGF (подібного до інсуліну фактора росту) за умов пригнічення сигнального ензиму ERN1, який є основним шляхом реалізації ефектів стресу ендоплазматичного ретикулума, а також за умов гіпоксії та дефіциту поживних речовин, зокрема глюкози і глутаміну, що є важливими факторами пухлинного росту. Актуальність цієї дисертаційної роботи визначається тим, що гліоми є найбільш агресивними пухлинами, які тяжко піддаються лікуванню, а досліджені Анастасією Павлівною гени можуть бути мішенню для розробки сучасних підходів до лікування та профілактики гліом. Анастасією Павлівною вперше проведено масштабне дослідження для в'ясування ролі генів системи IGF в опосередкованому ERN1 контролі процесів проліферації. Активація реакцій стресу ендоплазматичного ретикулума у пухлинних клітинах, що характеризується швидким поділом та підвищеним рівнем метаболічних процесів, є ознакою їх адаптації до умов гіпоксії, нестачі поживних речовин, а також свідчить про важливу роль стресу ендоплазматичного ретикулума у регуляції проліферації та виживання пухлинних клітин. Участь ERN1 у стресових реакціях клітини за умов пухлинного росту підтверджується тим фактом, що інгібування його активності має виражені протипухлинні ефекти, але молекулярні механізми пригнічення пухлинного росту шляхом інгібування ERN1 поки що не до кінця з'ясовані. У зв'язку з цим, тема дисертаційної роботи безсумнівно є актуальною як з фундаментальної, так і з прикладної точки зору.

Дисертаційна робота Анастасії Павлівни Харькової викладена на 143 сторінках друкованого тексту та складається із “Вступу”, “Огляду літератури” (5 підрозділів), розділів „Матеріали та методи досліджень” та „Результати досліджень” (6 підрозділів), а також „Обговорення результатів”, “Висновків” і “Списку використаних літературних джерел” (238 посилань). Робота містить 30 рисунків та 3 додатки.

У “Вступі” чітко обґрунтована тема дисертаційної роботи та її зв'язок з науковими програмами і темами, сформульована мета і конкретні задачі досліджень, а також наукова новизна одержаних результатів та їх практичне значення. Розділ “Огляд літератури” охоплює велику кількість літературних даних по темі дисертаційної роботи, причому Анастасія Павлівна провела не лише детальний аналіз наявних в літературі даних по обраному напрямку наукових досліджень, а і їх узагальнення. Вона проаналізувала основні ефекти факторів росту IGF1 та IGF2 на рівні клітини, механізми передачі сигналу від їх рецептора (IGF1R) в середину клітини та регуляції активності IGF за допомогою протеїнів родини IGFBR. Особлива увага була приділена також незалежним від IGF ефектам IGFBR та диференційній ролі окремих протеїнів цієї родини у регуляції проліферації, міграції і апоптозу клітин. Нею чітко сформульовані питання, що ще не знайшли вирішення на даний момент і обґрунтувала необхідність виконання цієї дисертаційної роботи.

Другий розділ дисертаційної роботи присвячений методам досліджень, що були використані для виконання даної роботи. Варто відмітити, що вони повністю відповідають поставленим задачам. Детально описані методи виділення РНК із клітин, спектрофотометричні методи визначення кількості РНК, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, метод синтезу комплементарних ДНК, методи полімеразної ланцюгової реакції, вестерн-блот аналіз та інші.

У розділі „Результати досліджень” Анастасія Павлівна приводить результати великого за об'ємом експериментального матеріалу. Проведеними дослідженнями вона продемонструвала, що у клітинах гліоми за умов

індукції стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином підвищується рівень залежного від ERN1 транскрипційного фактора XBP1, особливо у ядрі. Нею вперше було встановлено, що експресія генів *IGF1*, *IGF2*, *IGF1R*, *IRS1*, *IGFBP1*, *IGFBP2*, *IGFBP3*, *IGFBP4*, *IGFBP5*, *IGFBP6* та *IGF2BP3* залежить від функціональної активності ERN1 і відіграє певну роль у контролі проліферації клітин гліоми. Виявлено, що рівень експресії генів основних про-проліферативних факторів (*IGF1*, *IGF2*, *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3*) знижується за умов пригнічення ERN1 у клітинах гліоми на рівні мРНК, а також і на рівні протеїнів IGF2, IGFBP2 та IGF2BP3. У той же час, рівень експресії генів анти-проліферативних факторів (*IGFBP3*, *IGFBP4* та *IGFBP5*) підвищується за умов пригнічення активності ензиму ERN1, причому саме IGFBP3, як основний інгібітор IGF, може відігравати ключову роль у пригніченні проліферації клітин гліоми за умов інгібування ензиму ERN1.

Анастасією Павлівною було також встановлено, що гіпоксія посилює експресію генів *IRS2*, *IGFBP1*, *IGFBP2*, *IGFBP3*, *IGFBP4* і *IGFBP6*, але пригнічує експресію генів *IGF2* та *IRS1*, істотно не впливаючи на рівень експресії *IGF1*, *IGF1R* і *IGFBP5* у контрольних (з інтактним ERN1) клітинах гліоми. Нею вперше показано, що пригнічення ензиму ERN1 модифікує ефекти гіпоксії на експресію частини досліджених генів, а це свідчить про різні механізми гіпоксичної регуляції експресії генів системи IGF. Показано, що за умов дефіциту глутаміну або глюкози експресія гена *IGFBP3* залежить від активності ензиму ERN1, експресія гена *IGFBP1* залежить від активності ERN1 лише за відсутності глюкози, а *IGFBP5* – за відсутності глутаміну.

Отримані Анастасією Павлівною результати дозволяють визначити роль ключових регуляторних протеїнів системи IGF у ланцюжку подій, що пов'язують пригнічення функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула ERN1 та протипухлинні ефекти на рівні клітини, а також молекулярні механізми впливу гіпоксії і

дефіциту глюкози або глутаміну на ERN1, основну сигнальну систему відповіді клітини на стрес ендоплазматичного ретикулула.

Отримані Анастасією Павлівною результати мають і практичне значення, оскільки детальне вивчення молекулярних механізмів регуляції ключових факторів росту, їх рецепторів та регуляторних протеїнів необхідно для з'ясування механізмів контролю процесів проліферації і виявлення перспективних генів-мішеней для розробки нових стратегій пригнічення росту злоякісних пухлин. Більше того, отримані результати вказують на взаємозв'язок сигнальної системи стресу ендоплазматичного ретикулула з гіпоксією та дефіцитом поживних речовин у регуляції експресії генів, залучених до контролю процесів проліферації, що необхідно враховувати при розробці нових підходів до терапії злоякісних новоутворень. Експериментальний матеріал послідовно викладений, добре проаналізований та статистично опрацьований.

Наукові положення дисертаційної роботи Анастасії Павлівни і зроблені нею висновки чітко сформульовані у дисертації, досить повно відображені в опублікованих нею 23 наукових працях, із них 11 статей, які опубліковані у фахових вітчизняних та міжнародних наукових виданнях, та 12 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференцій та з'їздів.

Дисертація оформлена відповідно прийнятим вимогам до кандидатських дисертацій, а зміст автореферату є ідентичним основним її положенням.

Результати експериментальних досліджень є достовірними, оскільки вони статистично опрацьовані і ретельно проаналізовані. У зв'язку з вище сказаним, принципових зауважень щодо дисертаційної роботи Анастасії Павлівни Харькової немає.

Але у процесі роботи над дисертацією виникло декілька дискусійних питань, на які хотілося б почути думку Анастасії Павлівни:

1) В якій мірі досліджені гени є відповідальними за процеси проліферації у гліомах у порівнянні з іншими злоякісними пухлинами?

2) Вами проведені дослідження на клітинах гліоми, а чи можна перенести ці дані на клітини інших видів злоякісних пухлин?

3) Яка на вашу думку роль дослідженої вами системи IGF у контролі процесів проліферації за злоякісного росту у порівнянні з іншими факторами росту?

Поставлені вище запитання не впливають на загальну високу оцінку роботи Анастасії Павлівни, яка успішно виконала всі наукові завдання для досягнення поставленої мети. Важливо відмітити, що результати роботи розширюють сучасні уявлення про механізми ERN1-опосередкованої регуляції процесів проліферації на рівні експресії генів системи IGF, що може сприяти ідентифікації нових генів-мішеней для розробки сучасних підходів для пригнічення злоякісного росту.

Вважаю, що дисертаційна робота Харькової Анастасії Павлівни „ERN1-залежна регуляція експресії генів системи IGF у клітинах гліоми ” за актуальністю проблеми, науковою новизною отриманих результатів і можливістю їх практичного використання, а також достовірністю зроблених висновків відповідає вимогам пп. 11, 12 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567, а її автор Харькова Анастасія Павлівна заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.



Офіційний опонент,
завідувач відділу молекулярної генетики
Інституту молекулярної біології і генетики,
доктор біологічних наук

Телегеев

Телегеев Г.Д.

Підпис *Телегеев Г.Д.*
посвідчується

Зав. відд. М. Телегеев