

1 2 КВІ 2017

Вх. № 65/03-07  
*Літвін*

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

**Кривдюк Ірини Володимирівни**

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

**Актуальність теми дисертації.** Дисертаційна робота Ірини Володимирівни Кривдюк присвячена вивченню молекулярних основ регуляції проліферації клітин гліоми на рівні експресії генів родини GADD та суперродини TNF рецепторів і асоційованих з ними протеїнів у клітинах гліоми з пригніченим ензимом ERN1, а також за умов гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну. Гліоми є найбільш поширеними новоутвореннями мозку, зустрічаються в 60% випадків пухлин головного мозку. Ці пухлини є дуже агресивними, вони тяжко піддаються лікуванню, характеризуються несприятливим прогнозом та високим рівнем смертності. Існуючі на сьогодні методи лікування мають низку ефективність, тому напрямок досліджень, що запланований цією роботою, є дуже актуальним і перспективним у розробці сучасних підходів до лікування гліом та профілактики їх розвитку.

Іриною Володимирівною вперше проведено досить масштабне дослідження для з'ясування ролі генів родини GADD та суперродини TNF рецепторів в контролі процесів проліферації, що опосередкований ERN1. Активація реакцій стресу ендоплазматичного ретикулума у пухлинних клітинах є ознакою їх адаптації до умов гіпоксії, нестачі поживних речовин і 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 з'ясовані не до кінця. У зв'язку з вище зазначеним, тема

дисертаційної роботи є безсумнівно актуальною як з фундаментальної, так і з прикладної точки зору.

**Наукова новизна** отриманих у роботі результатів полягає в наступному:

1. Вперше було доведено, що експресія генів родин GADD, TNF рецепторів та TNF-залежних протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 залежить від функціональної активності ERN1, який є сенсорно-сигнальним ензимом стресу ендоплазматичного ретикулула.
2. Показано, що зміни рівня експресії окремих генів обумовлені виключенням саме кіназної активності ERN1, інших – виключенням його ендорибонуклеазної активності, а генів *GADD153*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF11B* та *FADD* – обох активностей.
3. Доведено залежність рівня експресії мРНК практично усіх досліджуваних представників родини GADD від рівня глютаміну та глюкози. За умови дефіциту зазначених речовин він збільшується і цей ефект залежить від функціональної активності ERN1.
4. Дефіцит глюкози у трансформованих гліальних клітинах лінії U87 суттєво знижує експресію більшості рецепторів TNF та протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, в той час як пригнічення ензиму ERN1 змінює чутливість експресії більшості генів до нестачі глюкози.

**Практичне значення отриманих результатів.** Отримані Іриною Володимирівною результати мають практичне значення, оскільки детальне вивчення молекулярних механізмів регуляції ключових факторів контролю програмованої смерті клітин необхідне для з'ясування механізмів контролю процесів проліферації і виявлення перспективних генів-мішеней для розробки нових стратегій пригнічення росту злоякісних пухлин. Результати дослідження вказують на взаємозв'язок сигнальної системи стресу ендоплазматичного ретикулула з гіпоксією та дефіцитом поживних речовин

у регуляції експресії генів, залучених до контролю процесів проліферації та апоптозу, що необхідно враховувати при розробці нових підходів до терапії злоякісних новоутворень.

### **Характеристика розділів, оцінка змісту дисертації та її завершеності:**

Дисертаційна робота Кривдюк Ірини Володимирівни викладена на 156 сторінках друкованого тексту та складається із “Вступу”, “Огляду літератури” (4 підрозділи), розділів „Матеріали та методи досліджень” та „Результати досліджень” (4 підрозділи), а також „Обговорення результатів”, “Висновків” і “Списку використаних літературних джерел” (204 посилання). Робота ілюстрована 67 рисунками та містить 2 таблиці.

У **вступній частині** чітко обґрунтована тема дисертаційної роботи та її зв'язок з науковими програмами і темами, сформульована мета і конкретні задачі досліджень, оцінена наукова новизна одержаних результатів та їх практичне значення.

Розділ **“Огляд літератури”** охоплює велику кількість літературних даних за темою дисертаційної роботи, причому Ірина Володимирівна провела не лише детальний аналіз наявних в літературі даних по обраному напрямку наукових досліджень, а й зробила їх узагальнення. Вона проаналізувала роль стресу ендоплазматичного ретикулума, а також гіпоксії та ішемії в рості злоякісних пухлин, основні ефекти протеїнів, що пригнічують ріст пухлин, зокрема функціональне значення численної групи рецепторів фактора некрозу пухлин (TNFRSF) та асоційованих з ними протеїнів, їх ролі у регуляції проліферації і апоптозу клітин. Особлива увага була приділена протеїнам родини GADD (зупинки росту і пошкодження ДНК) у виживанні клітин та контролі процесів проліферації клітин. В цьому розділі чітко сформульовані питання, що ще не знайшли рішення на даний момент, і обґрунтована необхідність проведення відповідних наукових досліджень.

**Другий розділ** дисертаційної роботи містить опис методів досліджень, що були використані для виконання даної роботи. Детально описані методи

культивування клітин, виділення РНК із них, спектрофотометричні методи визначення кількості РНК, електрофоретичного аналізу нуклеїнових кислот, а також метод синтезу комплементарних ДНК, методи полімеразної ланцюгової реакції, вестерн-блот аналізу та інші. Варто відмітити, що всі застосовані методи є сучасними за рівнем і повністю відповідають поставленим задачам.

У розділі „**Результати досліджень**” Ірина Володимирівна приводить результати великого за об’ємом експериментального матеріалу. В ході досліджень вона продемонструвала, що за умов пригнічення сигнального ензиму ERN1 зменшується інтенсивність проліферації клітин гліоми лінії U87 і що гіпоксія збільшує швидкість проліферації контрольних клітин гліоми, але не проявляє своєї дії у клітинах з пригніченою активністю ERN1. Було також показано, що пригнічення активності сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми лінії U87 збільшує кількість апоптотичних клітин за нормоксії, в той час як стан гіпоксії істотно не впливає на життєздатність клітин незалежно від функціональної активності ERN1. Дисертантом було показано, що рівень експресії основних генів родини GADD знижується у клітинах гліоми за умов пригнічення активності ензиму ERN1, за винятком генів *GADD45B* та *SESNI*, рівень експресії яких підвищується. Одночасно було виявлено і зниження рівня протеїну фактора GADD45A за цих умов.

Іриною Володимирівною також було встановлено, що гіпоксія підвищує рівень експресії генів *GADD34*, *GADD45 $\alpha$* , *GADD45 $\beta$*  та *GADD153* у клітинах гліоми, але не змінює експресію гена *SESNI*. В той же час, пригнічення функціональної активності ензиму ERN1 у клітинах гліоми посилює вплив гіпоксії на експресію зазначених вище генів родини GADD та індукує чутливість експресії гена *SESNI* до умов гіпоксії. Слід підкреслити, що рівень HIF1 альфа протеїну в обох типах клітин збільшувався за гіпоксії. Показано також, що експресія більшості генів родини GADD є чутливою до дефіциту глюкози та глутаміну і переважно залежить від активності ензиму ERN1. Таким чином, дисертантом вперше було показано, що пригнічення

активності ензиму ERN1 модифікує ефекти гіпоксії на експресію генів родини GADD, що свідчить про різні механізми гіпоксичної регуляції експресії окремих генів.

У **четвертому розділі** Ірина Володимирівна проводить детальний аналіз отриманих нею результатів з урахуванням літературних даних та обґрунтуванням молекулярних механізмів відповідних сигнальних шляхів, що включені в регуляцію експресії генів родини GADD, надродини рецепторів TNF та протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, у клітинах гліоми. Узагальнюючи наведені в попередньому розділі результати, дисертант приходить до висновку, що рівень експресії досліджуваних в роботі генів регулюються ERN1, який є ефектором стресу ЕПР, і залежить від таких факторів середовища, як гіпоксія, дефіцит глюкози та глутаміну.

Великий обсяг досліджень, проведених Іриною Володимирівною та аналіз отриманих нею результатів дозволяють визначити роль ключових регуляторних протеїнів суперродини TNF рецепторів у ланцюжку подій, що пов'язують пригнічення функціональної активності ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула ERN1 з його протипухлинними ефектами, і розкривають молекулярні механізми впливу гіпоксії, дефіциту глюкози, або глутаміну, на функціональну активність цього протеїну.

**Наукові положення** дисертаційної роботи Ірини Володимирівни та зроблені нею висновки чітко сформульовані у дисертації і повністю відображені в опублікованих нею 15 наукових працях, з яких 6 є експериментальними, а 2 оглядовими статтями, що опубліковані у фахових вітчизняних та міжнародних наукових виданнях; 7 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференцій та з'їздів у тому числі на конгресі FEBS.

**Оформлення дисертації** відповідає прийнятним вимогам до дисертацій, що подаються на захист до здобуття ступеня кандидата біологічних наук, а зміст автореферату є ідентичним основним положенням дисертаційної роботи. Всі наведені у дисертації експериментальні дані досить ретельно та

критично проаналізовані, мають необхідну статистичну обробку і є достовірними, що дозволяє вважати цю роботу завершеним науковим дослідженням за зазначеною темою.

За обсягом, предметом та методами дослідження дисертація **відповідає паспорту спеціальності 03.00.04 – біохімія.**

Принципових зауважень щодо дисертаційної роботи Ірини Володимирівни немає.

**У порядку дискусії хотілось би почути від автора роботи відповідь на наступні питання:**

1) Яка, на Вашу думку, роль досліджених вами генів родин GADD та рецепторів TNF у контролі процесів проліферації та смерті клітин за злякисного росту у порівнянні з іншими ростовими факторами?

2) Виявлені в роботі зміни експресії основних генів родин GADD та рецепторів TNF за умов пригнічення ERN1 та гіпоксії у клітинах гліоми є унікальними, характерними лише для цих клітин гліоми, чи можуть мати місце і в клітинах інших видів злякисних пухлин?

3) Чим можна пояснити різноспрямованість змін експресії досліджуваних Вами генів родини GADD за умов пригнічення сигнального ензиму ERN1 і обумовленого ним зниження процесів проліферації?

4) В огляді літератури та при подальшому обговоренні результатів досліджень вказується, що фактор *TNFRSF11B* не здатен індукувати апоптоз. Враховуючи це, як Ви пояснюєте твердження, що зниження експресії гена *TNFRSF11B* за умов гіпоксії та пригніченої функції ензиму ERN1 може сприяти протипухлинному ефекту цього ензиму?

Поставлені вище запитання не впливають на загальну високу оцінку роботи Ірини Володимирівни, 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 та апоптозу клітин на рівні експресії генів системи TNF рецепторів та родини GADD і відкривають нові перспективи у



розробці сучасних терапевтичних заходів, спрямованих на пригнічення злякисного росту.

### Висновок.

Вважаю, що дисертаційна робота Кривдюк Ірини Володимирівни „ERN1-залежна регуляція експресії генів родин GADD та TNF рецепторів 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, 13 «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 Кривдюк Ірина Володимирівна заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент,  
професор кафедри біохімії та медичної хімії  
ДЗ “Дніпропетровська медична академія”  
доктор біологічних наук, професор

