

Голові спеціалізованої вченої ради
при Інституті біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
доктору біологічних наук,
старшому науковому співробітнику,
завідувачу відділу хімії та біохімії
ферментів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України
Артему ТИХОМИРОВУ

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук,
професора, завідувача відділу молекулярної генетики Інституту
молекулярної біології і генетики НАН України
Геннадія ТЕЛЕГЄЄВА
на дисертаційну роботу Юлії КУЛШ
**”Вплив вуглецевих наночастинок на експресію генів
транскрипційних факторів та мікроРНК”**,
подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії
з галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія

1. Актуальність обраної теми

Актуальність роботи пов'язана з постійно зростаючим застосуванням різних за природою і структурою наночастинок у різноманітних галузях, у тому числі у біології та медицині, зокрема для діагностики і лікування онкологічних захворювань, а також багатьох інших патологій. Вуглецеві наночастинок вважаються найбільш перспективними завдяки високій стабільності та великій різноманітності їх структури. Разом з тим, молекулярні механізми їх впливу на клітини злоякісних пухлин і функціонування геному в них залишаються ще недостатньо з'ясованими, а ще менше відомо про можливий вплив вуглецевих наночастинок, як і наночастинок іншої природи, на нормальні клітини організму, тим паче на клітини головного мозку. На даний момент уже є дані про численні негативні наслідки застосування вуглецевих наночастинок, таких як оксид графену та SWCNTs. Це є особливо важливим попередженням до застосування вуглецевих наночастинок для лікування злоякісних новоутворень, оскільки користь від такого лікування

повинна перевищувати можливу потенційну шкоду, яка може бути завдана здоровим клітинам організму. І саме тому, на першому плані має стояти поглиблене і всебічне вивчення молекулярних механізмів дії не лише вуглецевих, а й інших, різних за природою, наночастинок на нормальні клітини всіх органів та тканин організму. І лише за умов відсутності негативних ефектів, можна розглядати можливість їх використання у біології і медицині.

Вірогідним молекулярним механізмом дії на клітини наночастинок різної природи та структури є стрес ЕР. Він підтримує гомеостаз, а за умов дії різних токсичних речовин, підтримує життєдіяльність клітин змінюючи метаболічні процеси і збільшуючи життєздатність клітин, їх адаптацію до нових умов існування. У випадку довготривалих і тяжких негативних впливів – призводить до запуску спеціальної, специфічної для ЕР, програми загибелі клітин або утворення та росту злоякісних пухлин.

2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційну роботу виконано протягом 2021–2025 рр. у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: «Молекулярні механізми взаємодії сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума та гіпоксії в репрограмуванні геному клітин гліоми», № ДР 0121U100662 (2021–2025 рр.) та «Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів», № ДР 0117U002624 (2017–2021 рр.).

3. Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації

Матеріали дисертаційної роботи викладено згідно поставленої мети та завдань на основі обраних предмету та об'єкту дослідження. Дисертанткою було детально проаналізовано сучасну літературу щодо стану проблеми використання наноматеріалів в біомедичних дослідженнях Детальне вивчення

проблеми дозволило дисертантці використати велику кількість класичних та новітніх методів біохімії, молекулярної та клітинної біології. Результати та висновки є чіткими та переконливими як в площині власне експериментальних процедур, так і статистичного аналізу. Висновки дисертаційної роботи відповідають назві, меті та завданням дослідження, повно та чітко відображають отримані дисертанткою результати, є глибоко обґрунтованими та відображають основний зміст роботи.

4. Достовірність основних наукових положень, висновків і практичних досліджень та одержаних результатів

Достовірність основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій та одержаних результатів не викликає сумнівів, оскільки проведений Юлією КУЛШ статистичний аналіз включав визначення нормальності розподілу варіант у групах і перевірявся декількома методами, а основні наукові положення та висновки, як і практичні рекомендації були зроблені лише на основі статистично достовірних результатів.

5. Новизна основних наукових положень, висновків і практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень та одержаних результатів

Юлією КУЛШ вперше встановлено, що у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS під впливом наночастинок оксиду графену відбуваються істотні зміни в експресії важливих транскрипційних факторів, а також низки регуляторних протеїнів і мікроРНК. У той же час, у клітинах гліобластоми були виявлені менш виражені зміни рівня експресії важливих транскрипційних факторів та регуляторних протеїнів і мікроРНК під впливом оксиду графену. Аналогічні зміни в експресії досліджених генів спостерігалися і за дії одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs) як у нормальних астроцитах, так і у клітинах гліобластоми, причому у нормальних клітинах зміни в експресії генів були також більш вираженими.

Вперше було показано, що дія наночастинок оксиду графену та вуглецевих нанотрубок на експресію різних генів переважно

опосередковується стресом ендоплазматичного ретикулума, оскільки за умов пригнічення ERN1, головного сигнального шляху цього стресу, ефект як наночастинок оксиду графену, так і SWCNTs, різко зменшувався. Отримані результати продемонстрували важливу роль ензиматичної активності ERN1 у регуляції експресії генів важливих стрес-залежних транскрипційних факторів (DDIT3, ATF3, ATF4, E2F1 та TP53) та регуляторних факторів і ензимів (DNAJB9, HBEGF, TOB1, EDEM1, DDX58, P4HA2, TFPI2 і IDH2). Вперше показано, що наночастинки оксиду графену впливають на рівень експресії мікроРНК, які є важливими регуляторами експресії генів *HBEGF*, *TOB1* та *TP53* на пост-транскрипційному рівні за рахунок наявності в їх мРНК специфічних сайтів зв'язування, оскільки збільшення рівня мРНК *HBEGF* і *TOB1* узгоджувалося зі зниженням рівня експресії специфічної до них мікроРНК *miR-182-5p*, а зменшення рівня експресії мРНК *TP53* – з підвищенням *miR-98-5p*.

Аналіз рівня експресії мікроРНК в ембріонах рибок *Danio rerio* за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок виявив значні порушення експресії низки мікроРНК: *miR-19-3p*, *miR-21-5p* і *miR-96-5p*, які контролюють проліферацію клітин та процеси нейрогенезу і можуть ініціювати порушення нормального розвитку головного мозку ембріонів.

Вперше встановлено, що експресія ключових транскрипційних факторів і стрес-залежних протеїнів змінюється у значно більшій мірі під впливом як наночастинок оксиду графену, так і одностінних нанотрубок саме у нормальних астроцитах, ніж у клітинах гліобластоми. Більш виражений вплив наночастинок оксиду графену і одностінних вуглецевих нанотрубок був показаний для генів *DDIT3*, *ATF3* та *DNAJB9* у нормальних астроцитах, ніж у клітинах гліобластоми як за дії менших, так і більших доз цих вуглецевих наночастинок, причому зменшена чутливість клітин гліобластоми до їх дії може бути обумовлена полі-резистентністю пухлинних клітин із-за наявного у них стресу ендоплазматичного ретикулума. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 14 робіт, з них 5 статей в іноземних фахових наукових

виданнях, які представлені в базах Scopus і PubMed, та 9 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференцій.

6. Теоретичне та практичне значення одержаних результатів

Результати досліджень, викладених дисертанткою у представленій роботі, мають вагоме теоретичне та практичне значення. Представлене дослідження розкриває нові механізми та сприяє кращому розумінню молекулярних механізмів впливу наноматеріалів на нормальні і пухлинні клітини. Ці результати вказують на важливість подальших досліджень їх впливу та мають важливе практичне значення.

Виявлена більш виражена реакція нормальних клітин, а саме нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS, порівняно з пухлинними клітинами, зокрема клітинами гліобластоми лінії U87MG, до дії на них наночастинок оксиду графену та SWCNTs, яку оцінювали по рівню експресії генів важливих транскрипційних і регуляторних факторів. Цей результат є дуже важливим застереженням щодо застосування наночастинок нанографену та нанотрубок у біомедицині без детального вивчення їх можливого впливу на різні нормальні клітини організму, на функціональну активність геному в них. Виявлені нами зміни рівня експресії генів вагомих транскрипційних факторів і регуляторних протеїнів під впливом наночастинок оксиду графену та SWCNTs є основою для виявлення високочутливих геномних маркерів порушень метаболізму. Це є важливим для раннього виявлення порушень головного мозку, які становлять серйозні ризики для здоров'я та життя пацієнтів.

7. Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях

Основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації в повній мірі відображені у 5 статтях, опублікованих Юлією КУЛШ у закордонних журналах, представлених у Scopus та PubMed, і у 9 тезах доповідей, зроблених на вітчизняних та міжнародних наукових форумах.

8. Структура дисертації. Оцінка змісту дисертаційної роботи, мови, стилю

Дисертаційна робота Юлії КУЛШ викладена українською мовою на 165 сторінках друкованого тексту, складається зі анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів досліджень, їх обговорення, висновків та списку використаних літературних джерел, що включає 202 посилання. Робота містить 57 рисунків та 4 таблиці. Більшість досліджень виконано дисертанткою особисто.

У вступі викладено дані про актуальність роботи, мету дослідження, завдання, об'єкт та предмет дослідження, методи, наукову новизну, практичне значення отриманих результатів, особистий внесок здобувача, дані про апробацію результатів дисертації, публікації, структуру та обсяг дисертації.

Першим розділом є огляд літератури, складається з шести підрозділів в якому дисертантка наводить детальні відомості щодо властивостей наночастинок і їх впливу на функціонування клітини. Зокрема він містить такі підрозділи - 1. Застосування наночастинок у біології та медицині, 2. Молекулярні механізми дії наночастинок на метаболізм, 3. Стрес ендоплазматичного ретикулума і його роль у механізмах дії наночастинок, 4. Вплив наночастинок на експресію генів, 1.5. Транскрипційні фактори і їх роль у регуляції експресії генів і 1.6. Структура та регуляторні функції мікроРНК.

Наведені в першому розділі дані одразу дають уявлення про логіку експериментів та план роботи цього дослідження.

Другий розділ стосується матеріалів та методів дослідження. У ході виконання роботи були використанні сучасні методи біохімії та молекулярної біології: виділення РНК, визначення концентрації та спектральних характеристик РНК спектрометричним методом, синтез комплементарних ДНК за допомогою методу зворотної транскрипції, методи кількісної полімеразної ланцюгової реакції для визначення рівня експресії мРНК та мікроРНК, електрофоретичні методи аналізу нуклеїнових кислот, методи біоінформатики та статистичної обробки результатів досліджень.

Третій розділ представляє результати досліджень. В цьому розділі Юлія КУЛШ чітко та зрозуміло наводить результати досліджень, які є добре

обґрунтованими та підтримуються даними статистичного аналізу. Рисунки, наведені у цьому розділі, змістовні та якісні, підписи до них чіткі та зрозумілі.

Четвертий розділ містить узагальнення та обговорення отриманих результатів, які коректно зіставлені з даними літератури, а також зроблено коректні узагальнення. Чудово доповнюють роботу і 7 узагальнюючих схем рівня експресії генів. Висновки, наведені в дисертаційній роботі Юлії КУЛШ відповідають поставленій меті та завданням дослідження, адекватно висвітлюють основні результати досліджень.

Список використаних джерел складається з 202 посилань на першоджерела у вітчизняних і міжнародних виданнях.

Таким чином, дисертація Юлії КУЛШ викладена у науковому стилі, грамотною мовою, відповідає діючим вимогам, що пред'являються до дисертаційних робіт, та є завершеною науковою працею, результати якої вирішують актуальну наукову задачу сучасної біохімії і молекулярної біології та мають високе теоретичне та практичне значення.

9. Недоліки дисертаційної роботи щодо їх змісту та оформлення

Загалом дисертаційна робота Юлії КУЛШ має високу позитивну оцінку, принципових недоліків у роботі не виявлено.

Проте є декілька питань, що носять переважно дискусійний характер.

1. Виходячи з Ваших результатів наночастинки оксиду графену мають більшу активність порівняно з нанотрубками. Чим це можна пояснити?

2. Чим можна пояснити менш виражену чутливість експресії більшості досліджених Вами генів до оксиду графену у клітинах гліобластоми у порівнянні з нормальними астроцитами?

3. Ви показали, що рівень експресії різних генів за дії оксиду графену змінюється по-різному не лише за величиною, а і за напрямком. Чому?

4. Вами встановлено, що пригнічення ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 знижує ефект оксиду графену на рівень експресії досліджених генів. На що це вказує?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертаційна робота Юлії КУЛІШ “Вплив вуглецевих наночастинок на експресію генів транскрипційних факторів та мікроРНК”, подана на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 09 - «Біологія» за спеціальністю 091 - «Біологія», є самостійною завершеною науковою працею, що містить новітні наукові положення, які обґрунтовані отриманими результатами та не порушує принципів академічної доброчесності. За методичним рівнем виконання, обсягом проведених досліджень, науковою новизною результатів, повнотою публікацій матеріалів дослідження, їх апробації на наукових конференціях дисертаційна робота повністю відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44 «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (зі змінами, внесеними згідно із постановою Кабінету Міністрів України №341 від 21.03.2022р. та постановою Кабінету Міністрів України №502 від 19.05.2023р.), а її авторка заслуговує присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 - «Біологія» за спеціальністю 091 - «Біологія».

Доктор біологічних наук, професор
завідувач відділу молекулярної генетики
Інституту молекулярної біології
і генетики НАН України

Геннадій

Геннадій ТЕЛЕГЄВ

