

**Голові спеціалізованої вченої ради
ДФ 26.240.002 в Інституті біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
провідному науковому співробітнику
відділу біохімії м'язів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН
України, доктору біологічних наук
Даниловичу Юрію Володимировичу**

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора біологічних наук, старшого дослідника, провідного наукового
співробітника Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

ГЕРАЩЕНКО ГАННИ ВОЛОДИМИРІВНИ

на дисертаційну роботу молодшого наукового співробітника

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

ЛУЗІНОЇ ОЛЬГИ ЯРОСЛАВІВНИ

«Роль IRE1 в експресії NAMPT та залежних від нього протеїнів у клітинах
гліоми» представлену до захисту у спеціалізовану вчену раду ДФ 26.240.002

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,

утворену наказом МОН від 19.07.21 №826

для розгляду та проведення разового захисту дисертації

на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія

Актуальність теми дисертації. Робота Ольги Ярославівни є актуальною, оскільки вона була направлена на з'ясування певних молекулярних особливостей клітин гліоми лінії U87, що лежать в основі антипроліферативного ефекту пригнічення сенсорно-сигнального протеїну IRE1, основного медіатора відповіді на неправильно згорнуті протеїни. Щороку у світі реєструють більше 3,7 мільйонів нових випадків

онкологічних захворювань і майже 2 мільйони смертей, викликаних онкопатологіями, причому найбільш злоякісними пухлинами головного мозку є гліоми, що важко піддаються терапії. Наразі ефективних методів лікування гліом ще не існує і саме тому вивчення молекулярних механізмів патогенезу цих пухлин є надзвичайно важливим напрямком наукових пошуків. Експериментальні дослідження, представлені в дисертаційній роботі Ольги Ярославівни розкривають потенційний вплив сигнального протеїну IRE1, який є елементом ендоплазматичного ретикулуму, змін його експресії, сайленсінгу важливого регулятора метаболізму пухлинних клітин NAMPT, факторів гіпоксії та рівню глутаміну на експресію низки пухлино-асоційованих генів у клітинах гліоми людини U87 задіяних у канцерогенезі гліом.

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

Дисертаційна робота виконувалася протягом 2016-2020 рр. у рамках проведення планових досліджень за наступними бюджетними темами: «Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у функціональній перебудові геному і пошук генів-мішеней для пригнічення росту гліом», № ДР 0116U001027 (2016–2020 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.), підрозділ теми «Роль ендоплазматичного ретикулума та мітохондрій у молекулярних механізмах інтегральної регуляції процесів проліферації».

Наукова новизна одержаних результатів. Ольга Ярославівна *вперше* продемонструвала, що експресія пухлино-асоційованих генів *NAMPT*, *PERK*, *ATF6*, *ATF3*, *BRCA1*, *DEK*, *BIRC5*, *GLO1*, *COL6A1*, *RAB5A* та *TGM2*, які кодують функціонально різні протеїни, є залежною від стресу ендоплазматичного ретикулума, а саме від функціонування сенсорно-сигнального протеїну IRE1. Принципово важливим результатом цієї роботи є встановлення факту опосередкованості змін в експресії гена *NAMPT* саме ендорибонуклеазою активністю IRE1, що можливо обумовлено як

транскрипційними, так і пост-транскрипційними механізмами і співпадало зі змінами в рівні протеїну NAMPT. Ольга Ярославівна також провела біоінформатичний аналіз 3'кінцевих некодуючих послідовностей мРНК NAMPT і виявила 2 сайти зв'язування мікроРНК miR-182-5p. Нею встановлено, що за умов пригнічення функціональної активності сигнального ензиму IRE1 рівень експресії цієї мікроРНК підвищується у порівнянні з контрольними клітинами гліоми лінії U87 і що в культурі нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS рівень мікроРНК miR-182-5p є також високим у порівнянні з клітинами гліоми. Все це переконливо свідчить про наявність і пост-транскрипційних механізмів регуляції мРНК NAMPT.

Ольга Ярославівна також встановила, що експресія більшості досліджених у роботі генів є залежною від гіпоксії, причому пригнічення функціональної активності IRE1 переважно модифікувало ефект гіпоксії на їх експресію. Це вказує на наявність складних механізмів гіпоксичної регуляції експресії генів і причетність до них IRE1-сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума і є надзвичайно важливим для розуміння молекулярних основ резистентності злоякісних пухлин до токсичної дії гіпоксії. Дисертанткою продемонстровано наявність різнонаправлених змін експресії досліджених генів у клітинах гліоми до умов дефіциту глутаміну, а також її залежність від функціональної активності IRE1-залежного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума.

Важливим розділом цієї дисертаційної роботи є дослідження із сайленсінгу NAMPT як таргетного гена і його наслідками на рівні експресії пухлино-асоційованих генів, що були перед цим досліджені. Отримані результати дають надію на розробку методів таргетної терапії гліом.

Практичне значення дисертаційної роботи полягає у з'ясуванні потенційних молекулярних механізмів, що лежать в основі зниження інтенсивності проліферації клітин гліоми, опосередкованого пригніченням сигнального ензиму IRE1, ключового медіатора відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулума. Це є необхідним для створення нових

стратегій системної терапії гліом, які б оминали побічні ефекти таргетної терапії. Отримані результати були використані у лекціях по спецкурсам «Конструювання генів» і «Механізми онкогенезу» для магістрів КНУ імені Тараса Шевченка та Національного університету «Києво-Могилянська академія», а також в курсі лекцій для аспірантів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Висвітлення результатів у наукових публікаціях. Представлені у дисертаційній роботі результати опубліковані в 5 наукових статтях в іноземних та вітчизняних фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, і в 10 тезах доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях і конгресах, включаючи Parnas Conference). Три із опублікованих статей представлені в базі даних Scopus.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності. У дисертаційній роботі відсутні порушення академічної доброчесності. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Структура і обсяг дисертації, оцінка її змісту, завершеності та відповідності встановленим вимогам.

Дисертація Ольги Ярославівни представлена за загальноприйнятою формою, що відповідає вимогам МОН України. Робота викладена на 154 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів власних досліджень, їх обговорення, висновків та списку цитованої літератури, що включає 228 посилань. Робота містить 50 рисунків та 3 таблиці. Структура дисертації логічно побудована, що сприяє розкриттю змісту теми дослідження і виконанню поставлених завдань.

В зробленому Ольгою Ярославівною огляді літератури висвітлено сучасний стан проблеми, зокрема, детально охарактеризовані гени, що кодують ключові фактори та ензими, залучені у контроль процесів

проліферації і апоптозу за умов злоякісного росту та особливості IRE1-опосередкованого сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума. При цьому авторкою було проаналізовано досить велику кількість нових, переважно закордонних публікацій, що мають безпосереднє відношення до теми дисертації.

Робота виконана на сучасному методичному рівні з використанням методів біохімії та молекулярної біології, які були детальні описані у розділі 2 даної роботи. В дисертації Лузіної О.Я. представлені результати численних досліджень, характерною особливістю яких є новизна, а також їх теоретичне та практичне значення.

У розділі «Обговорення результатів» зроблений детальний аналіз отриманих результатів і проведено їх обговорення.

Висновки сформульовані чітко, вони цілком відповідають поставленим завданням та повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Наукові положення та висновки, наведені в дисертації Ольги Ярославівни, є достовірними, що підтверджується використанням великого обсягу фактажу, логічністю постановки завдань, статистичним аналізом та узагальненням отриманих даних.

Дисертація виконана з дотриманням усіх вимог біоетики (протокол №2 засідання комісії з біоетики і біобезпеки Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України від 13 травня 2021 року).

Дисертаційна робота Ольги Ярославівни заслуговує на позитивну оцінку, але в процесі роботи над дисертацією виникла низка **зауважень**:

У формальній частині бажано було б об'єкт та предмет досліджень описати ближче до теми та змісту роботи. У переліку умовних скорочень незрозуміло дано перелік генів чи білків. Якщо генів, то їх назви пишуть курсивом і згідно анованих у базах даних (зокрема.ncbi) назв.

Якщо автор виносить у мету роботи «міжгенні взаємодії», то в огляді літератури бажано було б розглянути що це таке, які типи та механізми

відомі. Хоча у роботі достатньо було б зробити наголос на важливість процесів ендоплазматичного ретикулуму у канцерогенезі гліом і саме це винести у мету роботи.

У матеріалах та методах бажано було б виділити окремим пунктом спосіб функціонального пригнічення IRE1, так як це є ключовим моментом роботи. У статистичній обробці результатів перед використанням параметричних тестів необхідно вказувати яким чином було встановлено нормальність розподілу даних та які поправки на множинні порівняння використані.

Кожен новий розділ роботи повинен починатись з нової сторінки. Назва розділу «Список використаних літературних джерел» більш коректно назвати «Список використаних джерел».

У дисертаційній роботі авторкою невдало викриваються певні вирази, зокрема «пухлинозалежні гени/протеїни». Загальноприйнятим є термін пухлино-асоційовані гени. Вираз «чутливість експресії» (с.22) не виражає суті описаного в тексті. Невдалим є вираз «експресія функціонально різних генів». Використання виразу «експресія мРНК» також є невдалим. У даному випадку авторка мала на увазі рівні відносної експресії якогось певного гена на рівні мРНК.

Дослідження змін експресії генів ще не достатньо, щоб говорити про конкретні механізми міжгенних взаємодій, а тим паче про репрограмування геному – що висвітлюється у загальному висновку дисертаційної роботи. Тому треба бути більш обережними з такими гучними висновками. І дані, отримані на одній клітинній лінії також не можна узагальнювати на всі гліоми, тим паче, що всім видам пухлин притаманна дуже велика гетерогенність як у структурі пухлинних клітин, так і їх властивостях.

Крім того є кілька дискусійних питань:

1. Що дисертантка має на увазі під «міжгенними взаємодіями», які існують механізми цих взаємодій та які на думку авторки роботи показники є найбільш актуальними для дослідження механізмів канцерогенезу гліом?

2. Що таке «репрограмування геному» у аспектах канцерогенезу та які показники є найбільш важливими на думку авторки.

3. В роботі показано, що зміни в експресії багатьох досліджених генів за умов пригнічення активності сигнального протеїну IRE1 узгоджуються з функціональним значенням протеїнів, які вони кодують. У той же час, зміни в експресії деяких про-проліферативних генів за умов сайленсінгу NAMPT є протилежно направленими, хоча рівень протеїну NAMPT і проліферативний потенціал знижується як за умов пригнічення IRE1, так і сайленсінгу NAMPT. Чим це можна пояснити?

4. Як Ви думаєте, які молекулярні механізми гіпоксичної регуляції?

5. Чим можна пояснити залежність гіпоксичної регуляції експресії генів від активності сигнального протеїну IRE1?

6. Ви показали, що дефіцит глутаміну істотно впливає на рівень експресії багатьох досліджених генів і що цей вплив залежить від активності IRE1. То яку ж роль відіграє глутамін у рості гліом і як це залежить від стресу ендоплазматичного ретикулула? Яка Ваша думка?

Вищенаведені зауваження, питання і побажання не знижують наукової цінності дисертаційної роботи, адже вони стосуються переважно інтерпретації її результатів та оформлення роботи.

Висновок. Дисертаційна робота Лузіної Ольги Ярославівни «Роль IRE1 в експресії NAMPT та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми» є завершеною науковою працею, що розкриває молекулярні особливості стрес-залежної регуляції експресії ключових генів контролю процесів проліферації та апоптозу за злоякісного росту. Актуальність теми, новизна дослідження, теоретичне і практичне значення результатів, представлених у

роботі, а також високий методичний рівень проведених досліджень, свідчать про високий науковий рівень здобувачки, а дисертаційна робота Лузіної Ольги Ярославівни «Роль IRE1 в експресії NAMPT та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми» повністю відповідає вимогам пп. 10, 11 Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 06.03.2019 №167 (у редакції постанови КМУ від 09.06.2021 № 608). Тому вважаю, що здобувачка заслуговує на присудження їй ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент:

д.б.н., старший дослідник,
провідний науковий співробітник
Інституту молекулярної біології і
генетики НАН України

Г.В. Геращенко

