

## ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертаційну роботу Цимбал Дарія Олександрівна  
«Роль сигнального ензиму IRE1 у регуляції експресії про- та анти-  
проліферативних генів у клітинах гліоми», що представлена до захисту на  
здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю  
03.00.04 – біохімія

Актуальність теми дисертаційної роботи Дарії Олександрівни обумовлена величезним значенням сигналів, що поступають від ендоплазматичного ретикулу до генетичного апарату клітини - транскрипційні фактори, що утворюються за участі ферменту Endoplasmic Reticulum to Nucleus Signaling 1 (ERN1) регулюють експресію великої кількості генів, що мають значення у багатьох процесах, в тому числі, в регуляції проліферації. З огляду на останнє, роль системи відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулу у пухлинному процесі, в обмеженні проліферації трансформованих клітин виглядає дуже важливим. Гліоми (у роботі використана лінія U87) є досить розповсюдженими пухлинами, ефективність лікування яких, недостатньо висока. Це також є аргументом щодо актуальності обраної теми. Із застосування дефектних варіантів ключового ферменту ERN1 автору вдалося отримати нові дані про зміни експресії мРНК двох десятків генів, що мають відношення до стимуляції проліферації або її пригнічення. Застосувавши в роботі пухлинні клітини, що автор намагався із застосуванням додаткових факторів (гіпоксії, депривації глютаміну, глюкози) зменшити проліферативний потенціал клітин гліоми та вгамувати темпи поділу. Це надає роботі практичного значення, бо відкриває нові шляхи протипухлинної терапії.



**Наукова новизна отриманих результатів.** В останні роки детально вивчаються молекулярні механізми пригнічення росту гліоми із клітин із порушенням сенсорно-сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулула, але генетичні механізми реалізації цього процесу вивчені недостатньо.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Отримані наукові положення і висновки обґрунтовані достатнім обсягом молекулярно-генетичних та цитологічних досліджень. Висновки роботи є логічними, аргументованими та базуються на отриманих результатах.

**Якість використаних для дослідження методів, репрезентативність отриманих результатів.** Робота виконана на сучасному методичному рівні: досліди проводили на культурах клітин гліоми лінії U87, які були отримані із American Type Culture Collection (США), використані також дві сублінії клітин гліоми. Одну з них було отримано шляхом селекції клонів, стабільно трансфєкованих вектором рсDNA3.1, який був використаний для створення домінант-негативних конструкцій, що містили кДНК сенсорно-сигнального ензиму ERN1 без кіназного та ендорибонуклеазного доменів (dnERN1). Для отримання другої сублінії було використано домінант-негативну конструкцію на основі вектора рсDNA3.1, що містила кДНК ERN1 з мутацією в каталітичній частині ендорибонуклеази (dnrERN1). Достатній об'єм проаналізованого матеріалу дозволили вирішити поставлені задачі, зробити логічні висновки, що витікають із проведеного дослідження.

**Практичне значення** одержаних результатів полягає в тому, що вони сприяють виявленню нових перспективних мішеней для розробки принципово інших стратегій пригнічення росту злоякісних пухлин, що передбачають вплив на активність роботи білків, стресу ендоплазматичного ретикулума .

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

Дисертаційну роботу виконано у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України протягом 2014-2016 років у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: «Молекулярні основи взаємодії генів в механізмах регуляції їх експресії», № ДР 0111U002234 (2011-2015 р.р.) та «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій», № ДР 0112U002624 (2012-2016 р.р.) та "Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у функціональній перебудові геному і пошук генів-мішеней для пригнічення росту гліом" (№ держ. реєстр. 0116U001027, 2016-2020р.).

**Загальна характеристика роботи.** Дисертаційна робота викладена на 167 сторінках друкованого тексту та складається із "Вступу", "Огляду літератури" (7 підрозділів), експериментальної частини, до якої входять розділи „Матеріали та методи досліджень” (3 підрозділи), „Результати досліджень” (5 підрозділів), „Обговорення результатів”, “Заключення” та “Висновки”. Робота ілюстрована 69 рисунками та містить 3 таблиці. Закінчується списком використаних літературних джерел, що включає 209 посилань.

Розділ “Огляд літератури” охоплює велику кількість літературних даних по темі дисертаційної роботи із детальний аналізом механізмів роботи ферментів, що відповідають на стрес ендоплазматичного ретикулу, зокрема при злоякісній трансформації.

У розділі «Матеріали та методи» описано методи роботи із клітинами гліоми, виділення РНК із цих клітин, виділення плазмідних та рекомбінантних ДНК, спектрофотометричні методи визначення кількості РНК та ДНК, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, метод синтезу комплементарних ДНК, методи зворотної транскрипції і полімеразної ланцюгової реакції, аналіз HSE-залежної транскрипції методом люциферазного репортера, а також Вестерн-блот аналіз протеїнів та статистичний аналіз результатів.

У розділі „Результати досліджень” наведено результати дослідженнями експресії 20 генів у клітинах гліоми лінії U87, що залежать від функціональної активності ERN1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу. Далі наводяться дані про вплив тунікаміцину, гіпоксії, глютамінової чи глюкозної депривації клітин на вказані параметри експресії генів та білків, що узагальнено в обговоренні в таблицях.

Розділ «Аналіз та узагальнення результатів» дозволяє автору зібрати разом велику кількість фактичного матеріалу, наведеного у попередніх розділах та зробити логічні висновки, що безпосередньо впливають із результатів роботи.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та у авторефераті.** Наукові положення дисертаційної роботи зроблені ним висновки та рекомендації, що чітко сформульовані в дисертації, досить повно

відображені в опублікованих 16 наукових працях, із яких 8 статей, що опубліковані у фахових вітчизняних та міжнародних наукових виданнях, та 8 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових з'їздів та конференцій. Основні положення дисертації знайшли ґрунтовне і логічне відображення в авторефераті, який повністю відповідає змісту дисертації.

### **ЗАУВАЖЕННЯ.**

1. В роботі відсутні дані про проліферативну активність клітин, що не дає можливості оцінити кінцевий результат впливу різноманітних чинників на пухлинні клітини. Безсумнівно, що молекулярно-генетичні методи дуже важливі і точні, однак результуючим вектором в роботі з онкологічної тематики має бути саме інтенсивність поділу, здатність клітин до проліферації.

2. Залишається відкритим питанням, чи спостерігалися функціональні та морфологічні наслідки застосованих молекулярно-генетичних маніпуляцій, в тому числі, індукції стресу ендоплазматичного ретикулуму, впливу гіпоксії чи дефіциту глютаміну та глюкози.

3. У висновку 2 автор стверджує, що у «клітинах гліоми з пригніченням ензиму IRE1 спостерігається зростання експресії транскрипційних факторів TCF3, TCF8, SNAI2, що може відображати один з механізмів підвищення міграційного потенціалу даних клітин за умов виключення IRE1». При цьому очевидно, що рівень мРНК прямо не може впливати на міграційну активність клітин, навіть, рівень цих білків не гарантує цей ефект! Більш того, досліджень міграційної активності в роботі не проводилося і наводити такі сміливі припущення у висновках неприпустимо.

## ЗАКЛЮЧЕННЯ.

Дисертаційна робота Цимбал Дарії Олександрівни „Роль сигнального ензиму IRE1 у регуляції експресії про- та анти-проліферативних генів у клітинах гліоми”, подана до спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, за своєю актуальністю, науковим і практичним значенням, глибиною і обсягом досліджень, змістом та оформленням повністю відповідає вимогам ДАК України про присудження наукових ступенів стосовно дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а її виконавець – Цимбал Дарія Олександрівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Завідувач відділу загальної та молекулярної  
патофізіології Інституту фізіології  
ім. О.О.Богомольця НАН України,  
доктор медичних наук, професор

В.Є.Досенко



*Досенко*  
*проф. В.Є. Досенко*  
*відділення*  
*Дар. Цимбал* *В.Є. Досенко*