

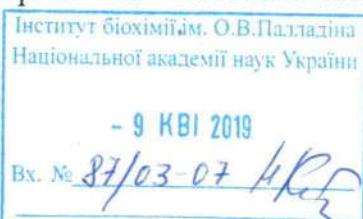
ВІДГУК

на дисертаційну роботу **Галкіна Олега Валерійовича**

“Експресія генів протеаз у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення IRE1” на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Актуальність вибраної теми дисертації. Відомо, що гліоми є найбільш агресивними пухлинами центральної нервової системи, які тяжко піддаються лікуванню. Тема дисертаційної роботи Галкіна Олега Валерійовича присвячена вивченю механізмів регуляції експресії генів протеаз, зокрема катепсинів, специфічних до убіквітину протеаз, HTRA1 та STC2, за умов виключення сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1, що, як відомо, супроводжується пригніченням проліферації пухлинних клітин та росту гліом. Більш того, в роботі уточнюються більш специфічні особливості IRE1-залежної експресії протеаз за пухлинного росту гліом, зокрема в умовах гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну. Враховуючи те, що ідентифікація генів, які можуть бути потенційними мішенями для пошуку нових шляхів пригнічення пухлинного росту залишається однією з актуальних проблем біохімічних і молекулярних досліджень механізмів росту злокісних пухлин, представлена робота є актуальною.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Дисертаційна робота виконана протягом 2015–2018 рр. у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України у рамках проведення планових досліджень за 4-ма бюджетними темами: «Молекулярні основи взаємодії генів в механізмах регуляції їх експресії», № ДР 0111U002234 (2011–2015 рр.), «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій», № ДР 0112U002624 (2012–2016 рр.), «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 № 0117U004344 (2017-2021 рр.).



Мета і задачі дослідження. Мета дисертаційної роботи сформульована чітко: вивчити рівень експресії генів протеаз у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченням функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1 за умов гіпоксії, дефіциту глюкози та глутаміну для з'ясування їх ролі в опосередкованому IRE1 контролі процесів проліферації клітин гліоми. А конкретні завдання, поставлені в роботі, в повній мірі відповідають меті.

Робота виконана сучасними методами біохімії та молекулярної біології.

Наукова новизна одержаних результатів. Олег Валерійович вперше продемонстрував, що рівень експресії генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22*, *USP25*, *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO*, *CTSS*, *HTRA1* та *STC2* у клітинах гліоми лінії U87 залежить від функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1, що узгоджується з даними літератури про зниження рівня проліферації пухлинних клітин без функціонально активного сигнального ензиму IRE1. Він показав, що гіпоксія знижує рівень експресії генів *USP1*, *USP10*, *USP14*, *CTSC*, *CTSL*, *CTSO* та *CTSS* у контрольних клітинах гліоми, тоді як інших генів – підвищує і що пригнічення функції сигнального ензиму IRE1 у цих клітинах змінювало ефект гіпоксії на експресію досліджуваних генів. Ним також встановлено, що дефіцит глутаміну та глюкози впливає на рівень експресії генів досліджених *USP* та *CTS*, а також гена *HTRA1* у клітинах гліоми лінії U87 і що цей вплив також залежить від функціональної активності IRE1. Отримані дані розкривають деякі молекулярні механізми IRE1-опосередкованої регуляції проліферації пухлинних клітин через зміни в експресії генів досліджених протеаз за умов пригнічення IRE1, а також через модулюючу роль цього сигнального ензиму в регуляції їх експресії за гіпоксії, дефіциту глюкози та глутаміну.

Практичне значення роботи полягає у з'ясуванні можливих молекулярних механізмів пригнічення проліферації клітин гліоми за умов пригнічення IRE1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума, і росту із них пухлин, які необхідні для розробки принципово нових підходів до створення анти-пухлинних препаратів на основі виявлених

нами змін в експресії генів ключових катепсинів та специфічних до убіквітину протеаз за умов пригнічення IRE1, а також за гіпоксії, дефіциту глукози і глутаміну в залежності від активності цього сигнального ензиму. Також результати дисертаційного дослідження були використані для підготовки лекційного матеріалу по спецкурсам «Конструювання генів» та «Сучасні біотехнології».

Структура та обсяг дисертації. Ця дисертаційна робота викладена на 149 сторінках друкованого тексту і складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел (187 найменувань). Робота містить 9 таблиць і 51 рисунок.

В літературному огляді Олег Валерійович проаналізував досить велику кількість нових публікацій, переважно закордонних, які мають безпосереднє відношення до теми дисертації і віддзеркалюють сучасний стан проблеми. В кінці кожного підрозділу наведений абзац узагальнення щодо актуальності та необхідності проведення дисертаційних досліджень.

Результати досліджень викладені логічно, добре систематизовані, опрацьовані статистично. Варто відмітити, що в дисертаційній роботі Галкіна О.В. педантично наведені результати численних досліджень експресії генів протеаз, які вибірково підтвердженні даними вестерн-блот аналізу. Також зроблена спроба, за допомогою біоінформатичного аналізу, пояснити молекулярні механізми вибіркової регуляторної ролі IRE1 на протеази. У розділі «Обговорення результатів» зроблений детальний аналіз отриманих результатів, а також проведено їх співставлення з літературними даними для обґрунтування біологічної релевантності змін експресії генів в контексті механізмів пухлинного росту.

У висновках чітко повністю відображені основні результати його дисертаційної роботи.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. За результатами дисертації опубліковано 13 робіт, з них 7 статей у вітчизняних та іноземних фахових наукових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, причому 3 із них реферуються БД

Scopus (Endocr. Reg. та Ukr. Biochem. J.), 1 – БД Web of Science (Endoplasm. Reticul. Stress Dis.), і 6 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових форумів.

Дисертаційна робота Олега Валерійовича заслуговує на позитивну оцінку, але в процесі роботи над дисертацією виникли деякі зауваження та дискусійні питання та побажання:

Зокрема:

1. Пп. 2.3.5 - 4 сторінки присвячені переліку застосованих праймерів, що важко сприймається, краще було б навести їх у вигляді таблиці.
2. Слід зауважити, що таблиці і рисунки повинні бути пронумеровані наскрізно в межах розділу і мати подвійний код, а не потрійний, як застосовано дисертантом. Це стосується всіх розділів дисертації і відповідає п.9 Вимог до оформлення дисертацій (Наказ МОН 12.01.2017 № 40) «При нумерації формул і рисунків за наявності посилань на них у тексті дисертації проставляються через крапку номер розділу та номер формули (рисунка). Формула, що нумерується, наводиться посередині нового рядка (нумерація - з правого боку в дужках). Номер та назва рисунка наводяться знизу/з правого боку рисунка».
3. Робота виграла б, у біологічному сенсі, якщо б були наведені дані щодо проліферації клітин гліоми лінії U87 з негативним та контрольним вектором IRE1, в умовах гіпоксії, дефіциту глюкози та глутаміну.
4. В розділі «Обговорення результатів» наводиться таблиця 4.4.1. в які останній стовпчик описує дані щодо рівня експресії UPS генів, за дії IRE1-міРНК. Ці результати не наведені в розділі власних дисертаційних досліджень, якщо це порівняння з літературними даними це потрібно описати і обґрунтувати.
5. Також в роботі є невдалі вирази та граматичні помилки, які не впливають на загальний зміст роботи.

В якості дискусії хотілося почути відповіді на наступні запитання:

1. Яка особливість дії тунікаміцину відповідальна за ініціацію стресу ендоплазматичного ретикулума?
2. В чому полягає різниця в дії гіпоксії на нормальні та пухлинні клітини?

3. Чи можете Ви поміркувати, базуючись на власних спостереженнях та літературних даних, щодо зв'язувальної молекулярної ланки між активністю IRE1 та досліджуваними генами в умовах гіпоксії чи дефіциту глюкози і глутаміну? Адже не всі гени, експресія яких залежала від IRE1, однонаправлено змінювалися при дії модуляторів.
4. Чи можете Ви назвати 1-2 гени, базуючись на власних дослідженнях, які абсолютно залежали від активності IRE1, при застосування модуляторів (гіпоксія, дефіцит глюкози чи глутаміну)?

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

Загальний висновок. Зважаючи на актуальність теми, наукову новизну одержаних результатів, теоретичне і практичне їх значення, передусім, з'ясування особливостей експресії генів, які кодують специфічні до убіквітину пептидази і катепсини, за умов пригнічення функціональної активності основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1, а також за умов гіпоксії та дефіциту поживних речовин (глюкози і глутаміну), для встановлення можливої ролі цих генів в опосередкованому IRE1 контролі проліферації клітин гліоми; високий методичний рівень проведених досліджень та інші позитивні якості дисертаційної роботи Галкіна Олега Валерійовича, вважаю, що вона відповідає вимогам п.п. 11, 12, 13 “Порядку присудження наукових ступенів”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р., № 567 (зі змінами), і може бути рекомендована для представлення до Спеціалізованої вченової ради по захистам дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук зі спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Начальник науково-дослідної частини,
професор Інституту високих технологій
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка, д.б.н., с.н.с.



Толстанова Г.М.