

13 ЛИС 2018

Вх. №

43/03-07



ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

ГАРМАШ ЯНИ АНАТОЛІЇВНИ

**“РОЛЬ СИГНАЛЬНОГО ШЛЯХУ ERN1 В РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ, ЩО
КОДУЮТЬ СИНТЕЗ ЕНЗИМІВ ГЛІКОЛІЗУ ТА ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО
ШУНТА”, що представлена до захисту на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук за спеціальністю**

03.00.04 – біохімія

Актуальність теми дисертації. Дисертаційна робота Яни Анатоліївни Гармаш присвячена вивченню молекулярних основ регуляції проліферації клітин гліоми на рівні експресії генів, що кодують синтез ферментів метаболізму глюкози. Гліоми є найбільш поширеними новоутвореннями мозку, частота цього захворювання складає 60% випадків серед всіх пухлин головного мозку. Ці пухлини є дуже агресивними, вони тяжко піддаються лікуванню, характеризуються несприятливим прогнозом та високим рівнем смертності. Існуючі на сьогодні методи лікування гліом мають низьку ефективність, тому напрям досліджень, що заплановані цією роботою, є дуже актуальним і перспективним у розробці сучасних підходів до лікування цих новоутворень та засобів запобігання їх розвитку.

Яною Анатоліївною проведено глибоке дослідження для з'ясування ролі ERN1-опосередкованому контролю експресії генів основних метаболічних шляхів обміну вуглеводів – гліколізу та пентозофосфатного циклу за умов розвитку гліом. Активація реакцій стресу ендоплазматичного ретикулума у пухлинних клітинах, що характеризується швидким поділом та підвищеним рівнем метаболічних процесів, є ознакою їх адаптації до умов гіпоксії, нестачі поживних речовин, а також 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 не до кінця з'ясовані. У зв'язку з вище зазначеним, тема дисертаційної роботи є безсумнівно актуальною як з фундаментальної, так і з прикладної точки зору.

Наукова новизна одержаних у роботі результатів полягає у наступному:

1. Вперше було доведено, що зниження інтенсивності проліферації клітин гліоми за умов пригнічення ERN1, який опосередковує основний сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума, супроводжується змінами рівня експресії генів ензимів гліколізу та пентозофосфатного циклу обміну глюкози, а також ензимів синтезу нуклеотидів та глікозаміногліканів.
2. Показано, що зміни рівня експресії досліджуваних генів опосередковані як ендорибонуклеазною, так і протеїнкіназною активностями ERN1.
3. Доведено, що відсутність глютаміну або глюкози у середовищі змінює рівень експресії більшості генів, що кодують синтез ензимів гліколізу, пентозофосфатного шунта та пов'язаних з ними ензимів, у клітинах гліоми, причому ці зміни переважно залежать від функціональної активності сигнального шляху ERN1 і це узгоджується зі зниженим проліферативним потенціалом клітин гліоми з пригніченою активністю ERN1.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані Яною Анатоліївною результати можуть бути основою для розробки принципово нових підходів до створення анти-пухлинних препаратів для боротьби з гліомами на основі виявлених генів-мішеней серед ензимів, що здійснюють процеси гліколізу та синтезу пуринових нуклеотидів в умовах гіпоксії, а також дефіциту глюкози і глютаміну.

Характеристика розділів, оцінка змісту дисертації та її завершеності:

Дисертаційна робота Гармаш Яни Анатоліївни викладена на 152 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів досліджень, їх обговорення, висновків та списку використаних літературних джерел, що включає 217 посилань. Робота містить 51 рисунок та 8 таблиць.

У **вступній частині** чітко обгрунтована 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, Яна Анатоліївна провела не лише детальний аналіз наявних в літературі даних стосовно обраного напрямку наукових досліджень, але провела їх узагальнення. Вона проаналізувала роль стресу ендоплазматичного ретикулула, гіпоксії та дефіциту глутаміну в рості злоякісних пухлин, дала характеристику основних ензимів, що приймають участь у процесі анаеробного розпаду глюкози, пентозофосфатному циклі та синтезі нуклеотидів. Особлива увага була приділена фактору, що індукується гіпоксією (HIF) і опосередковує транскрипційну адаптацію при гіпоксичному стресі у злоякісних пухлинах. В цьому розділі чітко сформульовані питання, що ще не знайшли вирішення на даний момент і обгрунтована необхідність проведення відповідних наукових досліджень за темою дисертаційної роботи.

Другий розділ дисертаційної роботи містить опис методів досліджень, що були використані для виконання даної роботи. Детально описано методи культивування клітин та виділення із них РНК, спектрофотометричні методи визначення кількості РНК, електрофоретичного аналізу нуклеїнових кислот, а також синтезу комплементарних ДНК, методи полімеразної ланцюгової

реакції, вестерн-блот аналізу та інші. Варто відмітити, що всі застосовані методи є сучасними за рівнем і адекватні поставленим задачам.

У розділі „Результати досліджень” Яна Анатоліївна описує результати великого за об’ємом експериментального матеріалу. В ході досліджень вона продемонструвала, що рівень експресії досліджуваних генів ПФШ переважно залежить від функції сигнального ензиму ERN1 і що в ERN1-залежній регуляції експресії генів цього шляху метаболізму глюкози приймає участь як протейніназа, так і/або ендорибонуклеаза ERN1. Крім цього, рівень експресії більшості генів ПФШ контролюється також і іншими сигнальними системами стресу ER. Було також доведено залежність експресії більшості генів від гіпоксії, що кодують синтез ензимів пентозофосфатного шляху, і показано, що повне пригнічення обох ензиматичних активностей сенсорно-сигнального шляху ERN1 істотно модифікує гіпоксичну регуляцію майже всіх ензимів пентозофосфатного шляху на рівні експресії генів. Характеризуючи отримані результати автор підкреслює різноспрямований характер змін експресії мРНК досліджених генів пентозофосфатного шляху та окремих ферментів синтезу нуклеотидів до відсутності глутаміну або глюкози у культуральному середовищі та наголошує на їх залежності від активності ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума.

При дослідженні рівня експресії генів, що забезпечують гліколітичне розщеплення глюкози, дисертантом була встановлена залежність рівня експресії гліколітичних генів *GPI*, *GNPDA1*, *ALDOA*, *ALDOC*, *ENO1* та *ENO2* від гіпоксії: рівень експресії всіх цих генів, за винятком *GNPDA1*, істотно посилюється за зазначених умов. Найбільш виражені зміни показані для генів *GPI*, *ALDOC* та *ENO2*, причому пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 істотно змінювало вираженість гіпоксичної регуляції експресії більшості досліджених генів. Гени гліколітичних ензимів *GPI*, *GNPDA1*, *ALDOA*, *ALDOC*, *ENO1*, *ENO2* проявляли різну чутливість до дефіциту глутаміну і глюкози у культуральному середовищі і залежали від

функціональної активності ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума.

У **четвертому розділі** Яна Анатоліївна проводить детальний аналіз отриманих нею результатів з урахуванням літературних даних та обґрунтуванням молекулярних механізмів відповідних сигнальних шляхів, що включені у регуляцію експресії генів, відповідальних за синтез ензимів гліколізу та ПФШ, у клітинах гліоми. Узагальнюючі наведені у 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 Яною Анатоліївною, аналіз отриманих результатів та їх співставлення з літературними даними дозволили зробити важливі висновки та висунути гіпотезу, згідно якої у клітинах гліобластоми існує метаболічний перемикач з ПФШ на гліколіз, що залежить від гіпоксії та оксигенації, і що гіпоксія, яка зазвичай сприяє росту пухлини, впливає на експресію практично усіх досліджених генів. Дуже важливим висновком роботи є те, що інгібування активностей ERN1 може як підсилювати, так і пригнічувати вплив гіпоксії на рівень експресії цих генів геноспецифічно і тим самим сприяє уповільненню росту гліоми.

Наукові положення дисертаційної роботи Яни Анатоліївни та зроблені нею висновки чітко сформульовані у дисертації і повністю відображені в 15 наукових працях, із них 8 експериментальних статей, які опубліковані у фахових вітчизняних та міжнародних наукових виданнях, та 7 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференцій та з'їздів.

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

та критично проаналізовані, 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 Яни Анатоліївни немає. **У порядку дискусії хотілось би почути від автора роботи відповідь на наступні питання:**

1) Наскільки вірним є поняття «аеробний гліколіз»? Адже під гліколізом у класичній біохімії розуміють розпад глюкози до лактату (анаеробний розпад), або перетворення глюкози на ПВК, що не залежить від постачання кисню і може протікати за наявності кисню.

2) У роботі встановлено зміни експресії генів, що кодують синтез нерегуляторних ферментів гліколізу. А що можна сказати про експресію регуляторних ензимів – ФФК1 та ПВК-кінази? Як, на думку автора, чи є якась кореляція між цими показниками?

3) Наскільки обґрунтованим є використання для статистичного аналізу t-тесту, якій зазвичай використовують для аналізу великих вибірок, а в роботі аналізували результати лише 3-4 вимірювань?

4) Застосований в роботі метод приготування цитозольної та ядерної фракцій не зовсім відповідає класичним методам. Чи використовували якісь індикаторні маркери для підтвердження ефективності розділення?

Поставлені вище запитання не впливають на загальну високу оцінку роботи Яни Анатоліївни, 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 гліколізу та пентозофосфатного шляху перетворення глюкози і відкривають нові перспективи у розробці сучасних терапевтичних заходів, спрямованих на пригнічення злоякісного росту.

Висновок.

Вважаю, що дисертаційна робота Гармаш Яни Анатоліївни “Роль сигнального шляху ERN1 в регуляції експресії генів, що кодують синтез ензимів гліколізу та пентозофосфатного шунта” 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 Гармаш Яна Анатоліївна 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 МОЗ України”
доктор біологічних наук, професор

Шевцова А.І.

