



“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор Інституту біохімії

ім. О. В. Палладіна НАН України

академік НАН України

доктор біологічних наук, професор

С. В. Комісаренко

2020 р.

### ВИСНОВОК

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України  
щодо дисертації Хіти Олени Олександрівни на тему:  
«Механізми регуляції експресії генів мітохондріальних протеїнів у  
клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1»,  
поданої на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань  
091 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

### ВИТЯГ

з протоколу № 2 фахового семінару на базі відділу сигнальних  
механізмів клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України від  
17 лютого 2020 р.

**Присутні:** Комісаренко С. В. – д. б. н., проф., акад. НАНУ, директор ІБХ,  
Дробот Л. Б. – д. б. н., проф., зав. від. сигнальних механізмів клітини – голова  
засідання, Скатерна Т.Д. – к. б. н., н. с., секретар засідання, і співробітники  
цього відділу – Кішко Т.О. – к. б. н., н. с., Латишко Н. В. – к. б. н., н. с.,  
Худякова О. В. – к. б. н., н. с., Зайцева О. В. – к. б. н., н. с., Горак І. Р. – к. б. н.,  
н. с., Нартіков О. В. – м. н. с., Токарчук К. О. – к. б. н., м. н. с., М’ясникова  
М. П. – гол. інж.-дослідник, Гудкова О. О. – м. н. с., Крисюк І. П. – м. н. с.,  
Попова Н. М. – пров. інж., Юрлов Г. Г. – пров. інж.; Коворотна В. М. –  
інж. I кат., Грищенко О. В. – лабор.; рецензенти: Бабіч Л.Г. – д. б. н., пр. н. с., і  
Данилович Ю. В. – д. б. н., пр. н. с., а також Протасова З. С. – к. б. н., вчений  
секретар, Карлова Н. П. – к. б. н., вчений секретар спецради ІБХ, та  
співробітники інших відділів інституту: молекулярної біології – Мінченко О. Г.  
– д. б. н., проф., член-кор. НАН України, зав. відділу, Ратушна О.О., к. б. н., с.  
н. с., Даніловський С. В. – к. мед. н., н. с., Вілецька Ю. М. – к. б. н., м. н. с.,  
Гнатюк О. С. – аспірант, інж. I кат., Лузіна О. Я. – аспірант, інж. I кат.,  
Рудницька О. В., аспірант, лабор., Слюсар М. Ю. – лабор.; відділу ліпідів –  
Косякова Г.В. – к. б. н., в. о. зав. від., Мегедь О.Ф. – к. б. н., н. сп., Горідько  
Т.М. – к. б. н., ст. н. с.; біохімії м’язів – Костерін С. О. – д. б. н., проф., акад.  
НАНУ, зав. від., Векліч Т. О. – к. б. н., с. н. с., Данилович Г. В. – к. б. н., с. н. с.,  
Шкрабак О. А. – к. б. н., н. с.; хімії та біохімії ферментів – Тихомиров А. О. –  
к. б. н., т. в. о. зав. від., Корса В. В. – пров. інж.

Тему дисертації було затверджено на засіданні Вченої ради Інституту  
біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України від 28 лютого 2017 р., протокол № 3.  
Науковим керівником призначений д. б. н., проф., член-кор. НАН України

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”.

**З доповіддю виступила аспірантка відділу молекулярної біології Хіта Олена Олександрівна:**

Онкопатологія займає друге місце за рівнем захворюваності та смертності в світі. Найбільш поширеними пухлинами головного мозку є гліоми, що характеризуються високоагресивною поведінкою та важко піддаються терапії. Вживання і проліферація пухлинних клітин тісно пов'язана із стресом ендоплазматичного ретикулума, зокрема із ензимом IRE1. Останнім часом, увага багатьох дослідників зосереджена на ролі мітохондрій у злоякісному рості, тому вивчення механізмів транскрипційного репрограмування цих органел за пухлинного росту є надзвичайно актуальним та може бути корисним для розробки нових анти-пухлинних терапевтичних стратегій.

Пухлина, що активно росте, перебуває під постійним впливом стресових факторів, таких як гіпоксія, дефіцит поживних речовин, порушення кальцієвого гомеостазу та оксидативний стрес. За даних умов відбувається порушення фолдингу протеїнів та накопичення незгорнутих або неправильно згорнутих протеїнів у люмені ендоплазматичного ретикулума, що призводить до активації стресу ER та запуску каскаду адаптивних реакцій, відомих під назвою «відповідь на неправильно згорнуті протеїни». Дані реакції представлені трьома сенсорно-сигнальними молекулами: ATF6, PERK та IRE1, що запускає найбільш консервативний шлях стресу ER. Трансмембранна сенсорно-сигнальна молекула IRE1 володіє кіназною та ендорибонуклеазною активністю та є залученою у регуляцію експресії сотень генів, залучених до процесів фолдингу і трансляції протеїнів, проліферації, апоптозу та функції мітохондрій.

Функціональна активність мітохондрій регулюється протеомом цих органел. Із більш, ніж 1500 протеїнів мітохондріону, лише 13 кодуються ДНК цих органел. Таким чином, більше 99% протеїнів мітохондрій кодуються ядром і синтезуються на цитоплазматичних рибосомах. Для наших досліджень було обрано три групи генів: ензими циклу трикарбонових кислот, протеїни, що регулюють функцію геному мітохондрій та біоенергетику цих органел, а також фактори, залучені в різноманітні шляхи апоптозу. Важливо зазначити, що більшість із цих протеїнів є поліфункціональними та відіграють важливу роль в онкогенезі, проліферації та виживанні пухлинних клітин, клітинній диференціації та захисті від оксидативного стресу не лише в мітохондріях, але і поза ними, що може свідчити про ймовірну роль цих генів у пригніченні проліферації клітин гліоми за умови пригнічення IRE1.

Таким чином, метою моєї роботи було вивчення експресії генів протеїнів мітохондріону у клітинах гліоми за умови пригнічення ензиму IRE1, а також в залежності від гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну. Відповідно до мети було поставлено шість завдань, на яких я буду зупинятись у ході доповіді.

В даній роботі було використано низку сучасних методів біохімії та молекулярної біології, а дослідження проводилися на кількох сублініях клітин гліоми лінії U87.

Завдання 1. Визначити рівень експресії генів ензимів трикарбонового циклу мітохондрій у клітинах гліоми лінії U87 із повним пригніченням ензиматичних активностей сенсорно-сигнального ензиму IRE1. За умови повного пригнічення функції IRE1, спостерігали зниження рівня експресії усіх генів ензимів циклу Кребса, що свідчить про пригнічення даного процесу в мітохондріях. В той же час, рівень експресії мРНК ізоцитратдегідрогенази 2 зростає майже втричі у порівнянні із контрольними клітинами гліоми, що свідчить на користь полі-функціональності даного ензиму, оскільки відомо, що IDH2 пригнічує активність онкогенів та є залученою у клітинну диференціацію та антиоксидантний захист.

Одним із механізмів IRE1-залежної регуляції експресії генів є утворення транскрипційно активної форми фактору XBP1 шляхом його альтернативного сплайсингу ендорибонуклеазою IRE1. Тому ми провели біоінформаційний аналіз промоторних ділянок генів ензимів трикарбонового циклу на наявність специфічних елементів, що розпізнаються транскрипційним фактором XBP1. Такі специфічні послідовності були виявлені для зазначених генів, що вказує на можливу роль XBP1 у транскрипційній регуляції експресії досліджених генів.

Крім того, був проведений біоінформаційний аналіз 3'-кінцевої некодуєчої ділянки мРНК генів протеїнів мітохондріону на наявність сайтів зв'язування із мікроРНК та виявлено сайт для мікроРНК miR-182 в мРНК, що кодує малік-ензим ME2. Виявлено, що рівень цієї мікроРНК зростає за умови виключення активності IRE1, що свідчить про можливість регуляції експресії гена ME2 і на пост-транскрипційному рівні, оскільки зменшення рівня експресії мРНК даного ензиму супроводжується посиленням рівня експресії miR-182.

Наступним завданням було дослідити експресію генів факторів, залучених у регуляцію геному мітохондрій та контролюють біоенергетику цих органел за умови повного пригнічення IRE1. Показано, що експресія даної групи генів є залежною від активності IRE1, причому гено-специфічно. Зокрема, виявлено зниження рівня експресії генів протеїнів, які регулюють транскрипцію і трансляцію в мітохондріях, а також гена Lon-пептидази, що є важливим регулятором протеому мітохондрій, тоді як експресія про-апоптичної ендонуклеази ENDOG та глюкокортикоїдного рецептора і пов'язаного із ним протеїну NNT, навпаки, зростає за умови пригнічення IRE1.

Результати змін в експресії мРНК ENDOG та NNT, отримані за допомогою ПЛР, цілком узгоджуються із даними вестерн-блот аналізу рівнів відповідних протеїнів в клітинах гліоми за відповідних експериментальних умов

Біоінформаційний аналіз промоторних ділянок даної групи генів виявив специфічні сайти, що розпізнаються транскрипційним фактором XBP1, що знаходилися як в напрямку від 5' – 3', так і в зворотному. Такі результати свідчать на користь регуляції експресії генів, залучених у контроль геному мітохондрій, фактором XBP1.

Наступним завданням було визначити рівень експресії ядерних генів, що кодують протеїни, залучені у різноманітні шляхи апоптозу у клітинах гліоми із

виключенням обох ензиматичних активностей IRE1. Спостерігали зниження рівня експресії генів AIFM1, TRADD, ATG7 та різке посилення експресії NIF-та екстроген-залежного фактору FAM162A у клітинах гліоми із пригніченням IRE1. Дані по експресії мРНК ATG7 узгоджуються із рівнями кодованого ним протеїну в клітинах гліоми лінії U87 за досліджуваних умов. Спостережені різноспрямовані зміни експресії вказують на транскрипційне репрограмування мітохондрій за умови інгібування функції IRE1.

Отже, встановлено, що за умов пригнічення функції IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 рівень експресії ядерних генів, що кодують ключові ензими мітохондрій та фактори, які контролюють мітохондріальний геном і процеси апоптозу, знижується у клітинах гліоми, тоді як експресія генів *IDH2*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* та *FAM162A* – зростає.

Відомо, що сигнальний ензим IRE1 сприяє розвитку пухлин як через кіназну, так і через ендорибонуклеазну активність. Тому для більш детального вивчення механізмів IRE1-залежної регуляції клітинного гомеостазу, ми дослідили експресію ядерних генів протеїнів мітохондрій у клітинах гліоми із частковим (лише ендорибонуклеази) пригніченням IRE1.

Виявлено, що експресія більшої частини генів протеїнів мітохондрій є залежною від протеїнкінази IRE1, оскільки виключення ендорибонуклеазної активності IRE1 не змінювало рівень експресії даних генів. В той же час, експресія генів *SDHD*, *MTIF2* та *ATG7* змінювалась схожим чином як у клітинах із повною блокадою IRE1, так і в клітинах сублінії із виключеною ендорибонуклеазою, що свідчить про важливу роль ендорибонуклеази IRE1 у регуляцію експресії цих генів. У випадку генів *GOT2*, *NNT*, *FAM162A* і *TRADD*, напрямок змін експресії мРНК був протилежним у сублініях клітин гліоми із повним та частковим пригніченням IRE1, що свідчить про існування більш складних механізмів регуляції експресії цих генів, що опосередковуються як кіназою, так і ендорибонуклеазою IRE1.

Для перевірки можливості залучення інших сигнальних шляхів стресу ER у регуляцію експресії, ми дослідили експресію цих генів у клітинах гліоми із виключеною ендорибонуклеазною активністю IRE1 за умови індукції стресу ER тунікаміцином. Отримані результати свідчать про можливу участь інших систем стресу ER у регуляцію експресії деяких генів.

Таким чином, були виявлені різні молекулярні механізми стрес-залежної регуляції експресії ядерних генів протеїнів мітохондрій, що опосередковуються як кіназою, так і ендорибонуклеазою IRE1, а у випадку генів *GOT2*, *TRADD*, *FAM162A* та *NNT* – обома ензиматичними активностями IRE1, що вказує на залежність функціональної активності мітохондрій від стресу ендоплазматичного ретикулаума, зокрема сигнального ензиму IRE1.

Оскільки гіпоксія є важливим фактором пухлинного росту, а IRE1-залежний шлях стресу ER сприяє адаптації пухлинних клітин до умов гіпоксії через активацію фактору XBP1, наступним завданням було дослідити вплив IRE1 на гіпоксичну регуляцію експресії генів функціонально різних протеїнів мітохондрій.

Показано, що експресія усіх досліджених генів, окрім *IDH2*, була залежною від гіпоксії у контрольних клітинах гліоми, а виключення функціональної активності IRE1 по-різному модифікувало вплив гіпоксії на

експресію цих генів: усувала гіпоксичну регуляцію генів *MDH2*, *SHDD*, *MTIF2*, *TSMF* і *LONP1* та індукувала чутливість експресії гена *IDH2* до умов гіпоксії, а також послаблювала або посилювала вплив гіпоксії на експресію низки генів. Зокрема, пригнічення *IRE1* не лише удвічі посилювало експресію про-апоптичного протеїну *ENDO*, але й значно збільшувало чутливість його експресії до гіпоксії, що може мати значення у *IRE1*-залежному пригніченні проліферації клітин гліоми.

За умов гіпоксії на рівні протеїну також було показано зростання кількості *ENDO* та *NNT* та зниження *-ATG7* як у контрольних клітинах гліоми, так і в клітинах із пригніченням активності ензиму *IRE1*, що корелює із даними, отриманими за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Транскрипційний фактор *HIF* є ключовим регулятором клітинної відповіді на гіпоксію, контролюючи експресію великої групи генів, що містять специфічні послідовності, чутливі до гіпоксії. Методом біоінформаційного аналізу виявлено такі регуляторні елементи, що розпізнаються транскрипційним фактором *HIF* у промоторних ділянках більшості ядерних генів протеїнів мітохондріону, причому частина таких сайтів одночасно містила у своїй структурі сайти зв'язування *XBP1*. Такі результати частково пояснюють залежність гіпоксичної регуляції від функціональної активності *IRE1*, а також демонструють механізм кооперативної регуляції експресії частини ядерних генів, що кодують полі-функціональні протеїни мітохондрій, шляхом розпізнавання специфічних сайтів зв'язування різними транскрипційними факторами.

Таким чином, було встановлено, що дефіцит кисню в середовищі змінює рівень експресії більшості ядерних генів, що кодують протеїни мітохондрій, а пригнічення функціональної активності *IRE1* модифікує вплив гіпоксії на експресію цих досліджуваних генів.

Характерними рисами пухлинних клітин є активний катаболізм глутаміну та підвищене споживання глюкози, що забезпечує швидку проліферацію ракових клітин та їх агресивну поведінку. В той же час, абнормальна васкуляризація пухлинного мікрооточення призводить до порушення кровопостачання пухлини, що є головною причиною розвитку тривалої гіпоксії та дефіциту ключових поживних речовин – глюкози і глутаміну. Такі екстремальні умови мікрооточення призводять до метаболічного репрограмування пухлинних клітин, що забезпечує їх виживання та адаптацію до цих несприятливих умов.

Тому наступним завданням було дослідити вплив дефіциту глюкози та глутаміну на експресію ядерних генів протеїнів мітохондрій в залежності від активності *IRE1*. Зупинимось детальніше на результатах, отриманих для генів *IDH2*, *ENDO*, *NR3C1* та *NNT*, які пропонуються нами в якості перспективних мішеней анти-пухлинної терапії. Встановлено, що дефіцит глюкози у середовищі призводив до незначного пригнічення рівня експресії мРНК *IDH2* та посилення експресії гена *NNT* у контрольних клітинах гліоми, тоді як виключення *IRE1* знімало чутливість експресії гена *NNT* до цих експериментальних умов та не впливало на експресію гена *IDH2*. Водночас, експресія генів *ENDO* і *NR3C1* була резистентною до умов нестачі глюкози в обох типах пухлин гліоми.



Крім того, було показано, що експресія даних генів була залежною від умов нестачі глутаміну в середовищі, а інгібування функції IRE1 модифікувало ефект дефіциту глутаміну на експресію цих генів: посилювало вплив нестачі глутаміну на експресію мРНК IDH2, послаблювало – у випадку генів ENDOG та NNT, а також модифікувало напрямок змін експресії гена NR3C1.

Показано, що блокада активності IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 модифікує вплив дефіциту глюкози та глутаміну на експресію більшості досліджених генів, що свідчить про IRE1-опосередковану регуляцію метаболізму клітин і що лежить в основі анти-проліферативного ефекту пригнічення IRE1.

Висновки дозволять не зачитувати, оскільки вони пролунали в ході доповіді. У якості узагальнення хочу сказати, що спостережені різнонапрямлені зміни в експресії досліджених генів переконливо свідчать про IRE1-залежне репрограмування функціонального стану мітохондрій, за якого спостерігається пригнічення транскрипції, трансляції та циклу трикарбонових кислот з одночасною активацією різних шляхів апоптозу та пригніченням активності онкогенів., що вказує на можливу участь даних генів у пригніченні проліферації пухлинних клітин, опосередкованому активністю IRE1.

За матеріалами кандидатської дисертації було опубліковано 13 статей у фахових виданнях та 16 тез доповідей у наукових журналах і матеріалах конференцій та з'їздів, що вийшли друком з 2016 по 2019 роки.

#### **Із запитаннями виступили:**

Костерін С. О. – д. б. н., член-кор. НАН України

Олено, в мене таке перше запитання. Ви ж розумієте, що присутні фахівці різних галузей і не всі займаються цим питанням. В мене таке питання до вас – в низці онкопатологій гліома займає яке місце, якщо є такі дані, у світі і Україні?

Хіта О.О.

Гліоми є найбільш поширеними пухлинами центральної нервової системи, складаючи біля 80 % усіх злоякісних пухлин головного мозку у дорослих та близько 2 % від усіх злоякісних новоутворень.

Костерін С. О. – д. б. н., член-кор. НАН України

На теперішній час, на жаль, якщо так сталося, перспективи для такої людини дуже сумнівні чи є шляхи вирішення?

Хіта О.О.

На даний час, середня тривалість виживання пацієнтів із діагнозом гліобластоми складає 12-18 місяців, лише 10 % пацієнтів із таким діагнозом живуть більше трьох років. А терапія, яка пропонується наразі – це хірургічне видалення пухлини з подальшою променевою та хемотерапією. Але такі підходи не дозволяють знищити всі інфільтруючі клітини та уникнути рецидивів, а також значно погіршують якість життя пацієнта.

Костерін С. О. – д. б. н., член-кор. НАН України

У вас така схема багатофункціональна, узагальнююча, чудова, але я б прохав вас і це я роблю як голова спецради, на якій ви, я сподіваюсь, будете захищатись. Ви можете сформулювати дуже лаконічно, не перераховуючи висновки, яке головне положення ви виносите на захист, тобто, що ви декларуєте з трибуни, головне «Ми стверджуємо, що...»?

Хіта О.О.

Ми стверджуємо, що пригнічення сигнального ензиму IRE1 призводить до репрограмування функціонального стану мітохондрій шляхом різноспрямованих змін експресії генів протеому мітохондріону, а також модифікує вплив гіпоксії, дефіциту глутаміну і глюкози на їх експресію, що вказує на опосередковану стресом ER участь цих генів у пухлинному рості.

Косякова Г.В. – к.б.н.

Виходячи із накопиченого Вами отриманого великого матеріалу чи могли би визначити якісь нові напрямки у терапії пухлин, зокрема гліом? Чи можна зробити якийсь висновок щодо можливого практичного значення?

Хіта О.О.

Практичне значення моєї роботи полягає у пошуку потенційних генів-мішеней, що можуть бути використані для анти-пухлинної терапії. В цілому, я думаю, що терапія гліом має бути комплексною та поєднувати використання хемотерапевтичних сполук, зокрема інгібіторів про-проліферативних факторів із спеціальною дієтою, наприклад, із зниженим вмістом глюкози.

Косякова Г.В. – к.б.н.

А чи можна сьогодні це реалізувати?

Хіта О.О.

З даних літератури, на сьогоднішній час використовуються інгібітори сигнального ензиму IRE1, зокрема як ендорибонуклеази. Одним із найвідоміших інгібіторів є 4μ8C – це саліцилальдегідне похідне. Даний інгібітор уже пройшов випробування на культурах клітин та експериментальних тваринах. Щодо наших результатів – потрібно ще багато подальших досліджень.

Данилович Ю.В. – д.б.н.

В мене продовження попереднього запитання Галини Василівни. Тут виникає одразу кілька питань щодо модуляції IRE1. Наскільки ці речовини, які є інгібіторами ендорибонуклеазної активності, впливають на функціонування організму в цілому? Грубо кажучи, здається, що вони є дуже небезпечними і в мене немає впевненості, що дані сполуки можна застосувати практично для лікування. І пов'язане із цим питання щодо основного цього ензиму. Судячи з того, що я чув на наших доповідях, в тому числі вашого відділу, складається враження, що цей ензим є дуже універсальним. Зокрема, під його контролем знаходиться вся клітинна енергетика, як за норми, так і за патологічних станів. Якщо це так, то впливаючи на активність цього ензиму, чи не зробимо ми гірше?

Хіта О.О.

Звичайно, що виключення систем стресу ендоплазматичного ретикулума призведе до порушення роботи ендокринних залоз, робота яких побудована на періодичній активації стресу ендоплазматичного ретикулума. Але я думаю, що коли брати до уваги пацієнтів із гліомами, середня тривалість виживання яких складає всього рік, то ризик застосування таких препаратів може бути виправданим.

Дробот Л. Б. – д.б.н.

Отримані клітини із мутантом, який стабільно експресується, це є інструмент для дослідження певних механізмів, яких ви торкнулися. Але за фізіологічних умов, очевидно, ці активності строго регулюються, як кіназна, так і ендорибонуклеаза. Чи описані в літературі дані, що посилюється активність кінази, рибонуклеази за таких патологічних станів, якими є онкологічні захворювання, я не кажу обов'язково гліоми, можливо іншого тканинного походження. Чи описані такі дані?

Хіта О.О.

Було показано, що хронічна активація систем стресу ендоплазматичного ретикулума, зокрема сигнального ензиму IRE1, тісно пов'язана із процесами злоякісної трансформації та агресивним ростом пухлин, забезпечуючи виживання клітин пухлини навіть в агресивних умовах мікрооточення. Саме тому було запропоновано використовувати інгібітори сигнального ензиму IRE1, як кінази, так і ендорибонуклеази, в якості стратегії зниження проліферації пухлинних клітин.

Дробот Л.Б. – д.б.н.

Тобто, є публікація, де пригнічення функціональної активності IRE1 призводить до пригнічення проліферації, але я знову веду мову про баланс кіназної і ендорибонуклеазної активності. Розумієте, коли ми робимо пригнічення, ми повинні думати, що якщо посилюється проліферація за умов онкологічного процесу, то очевидно і змінюються оці дві активності.

Хіта О.О.

Роботами О.Г. Мінченка і співробітників вперше виявлена надзвичайно важлива роль кінази IRE1 в регуляції експресії генів і тому наші дані є пріоритетними. Це питання ще потребує подальшого вивчення з використанням нових моделей, які ми розробляємо.

Дробот Л.Б. – д.б.н.

І ще одне питання, яке стосується сучасних уявлень у галузі онкогенезу, ролі ракових стовбурових клітин у метастатичному процесі. Це вже абсолютно встановлені дані, що функціонування ракових стовбурових клітин пов'язане із, як кажуть, зниженою проліферативною активністю, і це дозволяє виживати цим клітинам, захищати свою життєздатність в агресивному оточенні. Ось тут пропонується такий підхід експериментальний, як пригнічення IRE1 для пригнічення проліферативної активності. Тому питання, чи не зможе це призвести до протилежно очікуваних результатів, коли зниження проліферативної активності може бути стимулом до розвитку фенотипу ракових стовбурових клітин.



Хіта О.О.

Було показано, що пригнічення кінази і ендорибонуклеази впливало на інвазійний потенціал клітин гліоми, тоді як виключення лише ендорибонуклеази призводило до зниження інвазії клітин гліоми, тому саме на цій активності зосереджена найбільша увага дослідників і зібрано найбільше інформації про механізми регуляції клітинного гомеостазу, опосередковані ендорибонуклеазою IRE1. Щодо ракових стовбурових клітин. Нещодавні дослідження на культурі клітин показали, що інгібування PERK або IRE1 шляху за умов індукції стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином або цисплатином призводило до активації шляхів апоптозу у ракових стовбурових клітинах.

Костерін С. О. – д. б. н., член-кор. НАН України

До речі, хто робив біоінформатику? Ви володієте навичками?

Хіта О.О.

Так, біоінформаційним аналізом займалася я особисто.

**У обговоренні взяли участь:**

Мінченко О. Г. – д. б. н., член-кор. НАН України

Я би хотів кілька слів сказати за дисертантку: скромна, чемна, розумна, настирлива, допитлива і пунктуальна у всіх відношеннях. Я вважаю, що це взірць справжнього науковця. Вона і зі студентами працює, і допомагає всім, ніхто не має ніяких претензій до неї. А що стосується науки – було питання за глюкозу. Так от, ще 12 років тому, професор Есумі, який очолював Національний онкологічний центр Японії отримав найвищу нагороду Японії за нові стратегії в боротьбі із онкологічними захворюваннями. І ця стратегія полягала якраз в тому, що зменшення глюкози дає можливість лікарським препаратам вбивати пухлинні клітини. Нагорода отримана, але як підійти до пацієнтів, щоб зменшити вживання цукру чи ще щось? Надто тяжко, тому вимагати від аспіранта ще якихось рекомендацій, коли від головного онколога такої великої країни як Японія ідея залишилася не реалізованою. Відносно слів Людмили Борисівни щодо пригнічення IRE1. Суть у тому, що коли пригнічувати кіназну і ендорибонуклеазну активність, то інвазійний потенціал не зменшується, а якщо РНКазу блокувати – то інвазії практично немає. Тому зусилля більшості вчених зосереджуються на пригніченні РНКаз. Але тут знову цей зворотній зв'язок – є механізми, дуже важливі в організмі, які контролюються стресом, і пригнічувати їх не дуже добре, тому ми шукаємо інші мішені для того, щоб якось вийти із цього стану. Але все одно, впевнено і настирливо проводяться дослідження пошуків таких інгібіторів. Я говорив із дуже відомим американцем три роки тому на конференції по стресу, де він виступав. Вони розробляють препарат для покращення пам'яті у дітей, який є інгібітором PERK-шляху. Я йому натякнув, що це ж може пошкодити ендокринні регуляції, але він заперечив, сказав, що все перевірено фармацевтичними компаніями і можна давати дітям. Але що буде потім – нікого не цікавить. Тому все це – дискусійні питання. До практики – далеко, спочатку ми маємо розібратися в механізмах та наслідках і лише потім уже

ставити питання про неможливість чи можливість того чи іншого напрямку боротьби. Те, що активується стрес за пухлинного росту – це не має сумнівів і публікацій таких дуже багато. Раз активується стрес, то активуються і сигнальні шляхи, і звичайно кіназа та РНКаза IRE1. Але за кіназу до наших досліджень було відомо лише те, що вона активує РНКазу, а про те, що вона активує велику кількість генів і якими саме шляхами не було нічого відомо. За ендорибонуклеазу – відомо вже більше: і через транскрипцію, і через мікроРНК і через макроРНК, через специфічну деградацію мРНК. А наші піонерські роботи показали, що вона причетна не тільки до активації IRE1. У нас є зараз спеціальні конструкції, які зробила Даша Цимбал і ми будемо продовжувати ці роботи. Але кіназа активна і без активації самої молекули, вона експресується плазмідною і частково автофосфорилується. Я думаю, що ще багато робіт буде зроблено для того, щоб розібратися в окремих питаннях щодо цієї теми. Але в світі працює багато дослідників у цій галузі стресу ER, проводяться щорічні конференції і ця проблема буде вирішуватися – така моя думка.

Л. Г. Бабіч – провідний науковий співробітник відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, д. б. н. – рецензент

Актуальність обраної теми. Злоякісні пухлини головного мозку нейроепітеліального походження мають широке розповсюдження, але тяжко піддаються лікуванню. Головна причина такого стану – недостатність знань стосовно механізмів формування та розвитку пухлин. Дисертаційна робота Хіти Олени Олександрівни присвячена дослідженню експресії генів у клітинах гліоми лінії U87, що кодують локалізовані у мітохондріях ключові ензими циклу трикарбонових кислот та фактори, що контролюють процеси транскрипції і трансляції у мітохондріях, а також регулюють біоенергетику, проліферацію та апоптоз.

Дисертаційна робота Хіта О.О. виконана у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України протягом 2016–2019 рр. у рамках проведення планових досліджень за 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”.

Мета роботи полягала у вивченні рівня експресії генів ключових ензимів циклу трикарбонових кислот та факторів, що контролюють процеси транскрипції і трансляції у мітохондріях. Експресія цих генів визначалась у клітинах гліоми лінії U87 за умов повного та часткового пригнічення функціональної активності IRE1 а також за гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну. Поставлені в роботі конкретні наукові завдання відповідають меті і повністю виконані.

Робота виконана на сучасному методичному рівні з використанням методів біохімії та молекулярної біології.

Олена Олександрівна вперше показала гено-специфічний характер залежності експресії досліджених ядерних генів протеїнів мітохондрій у клітинах гліоми від функціонування IRE1. Доведено, що регуляція цих генів може опосередковуватись як протеїнказною, так і ендорибонуклеазною активностями IRE1. Показано, що пригнічення функціональної активності IRE1 модифікує чутливість експресії більшості досліджених генів до умов гіпоксії, дефіциту глюкози або глутаміну. Виявлено диференційний характер змін експресії ядерних генів, які кодують локалізовані у мітохондріях фактори та ензими, у клітинах гліоми з пригніченою активністю IRE1.

Практичне значення отриманих Хіта О.О. результатів полягає у з'ясуванні молекулярних механізмів зниження інтенсивності проліферації клітин гліоми, опосередкованого пригніченням сигнального ензиму IRE1. Ці знання є передумовою створення нових протипухлинних препаратів системної терапії гліом.

Дисертаційна робота викладена на 168 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 255 посилань. Робота містить 50 рисунків та 8 таблиць. В огляді літератури Олена Олександрівна проаналізувала публікації, які мають безпосереднє відношення до теми дисертації. Результати досліджень добре систематизовані, викладені логічно, опрацьовані статистично. Отримані результати детально проаналізовані й проведено їх обговорення в розділі «Обговорення результатів». Зроблені автором висновки повністю відображають основні результати дисертаційної роботи.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях. За матеріалами дисертації опубліковано 29 роботи, із них 13 статей у іноземних та вітчизняних наукових фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, і 16 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних конференцій і конгресів, включаючи IUBMB, FEBS та Parnas Conference.

Дисертаційна робота Олени Олександрівни заслуговує на позитивну оцінку, проте є деякі дискусійні питання та побажання:

1) Стр.39. За умов низьких концентрацій кисню активується фактор диференціації клітин Notch1, що в свою чергу індукує експресію TRPC6 (канали транз'єнтного рецепторного потенціалу, transient receptor potential 6) у первинних пухлинах та клітинних лініях з гліобластоми, що призводить до активації транскрипційного фактору NFAT (ядерний фактор активованих Т-клітин, nuclear factor of activated T-cells) і веде до посиленої клітинної проліферації та пухлинного росту 154. Запитання: Як індукція експресії TRPC6 веде до активації транскрипційного фактора NFAT, механізм?

2) Стр.40. Посилення аеробного гліколізу - гліколіз, за визначенням, є анаеробний процес. Гліколіз – основний шлях метаболізму глюкози, в процесі якого утворений піруват може конвертуватись до лактату в якості кінцевого продукту для позаклітинної секреції або надходити до мітохондрій і включатись у цикл трикарбонових кислот та окислювальне фосфорилування. – це Ваш текст, то чому Ви називаєте гліколіз аеробним процесом?

3) Стр.56 Для моделювання умов дефіциту глюкози та глутаміну клітини промивали фосфатно-сольовим буфером (Thermo Fisher Scientific, США), додавали середовище DMEM (Gibco, США) без глюкози або глутаміну та інкубували протягом 16 годин. Чому саме 16 годин?

4) Для індукції стресу ендоплазматичного ретикулума у поживне середовище, в якому культивували клітини гліоми лінії U87, додавали тунікаміцин (0,01 мг/мл) та витримували протягом 2 годин. З якою метою додавали тунікаміцин до клітин, що вже мають стрес ендоплазматичного ретикулума?

5) Стр. 64 3.1. Експресія ядерних генів ензимів трикарбонового циклу мітохондрій у клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму IRE1. У цьому розділі наведені результати на трьох лініях, чому у назві розділу вказана лише одна?

6) Стр. 64...ми дослідили у клітинах гліоми лінії U87 експресію ядерних генів ME2, MDH2, GOT2, IDH2, SDHB та SDHD, що кодують ключові ензими циклу трикарбонових кислот. Як функція цих ензимів може впливати на пригнічення росту пухлин?

7) Стр.73. Гіпоксія – це умова росту пухлин. З якою метою штучно створювали гіпоксію?

Наведені вище запитання і побажання не знижують наукової цінності дисертаційної роботи, оскільки вони мають дискусійний характер і стосуються переважно інтерпретації отриманих автором результатів.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам. Дисертаційна робота Хіти Олени Олександрівни відповідає вимогам ДАК України і може бути рекомендована до захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю – 091 «Біологія».

Данилович Ю.В. - провідний науковий співробітник відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, д. б. н. – рецензент

Актуальність обраної теми. У дисертаційній роботі Хіти Олени Олександрівни представлені результати досліджень, спрямованих на з'ясування молекулярних механізмів регуляції генів у клітинах гліоми, їх опосередкованості стресом ендоплазматичного ретикулума, зокрема IRE1 сигнальним шляхом. Тема роботи є актуальною, оскільки кількість людей з гліомами невпинно зростає, а ефективних способів лікування так і немає, як немає і чітких уявлень про молекулярні механізми їх виникнення, росту та метастазування. А тому пошуки шляхів і з'ясування механізмів пригнічення росту злоякісних пухлин, особливо гліом, які вражають центральну нервову систему та важко піддаються лікуванню, займають важливе місце в сучасних біохімічних і молекулярно-біологічних студіях.

Мета роботи. Проведені Оленою Олександрівною дослідження були спрямовані на розкриття закономірностей регуляції генів мітохондріальних протеїнів, які є ключовими в контролі енергетики клітини, метаболізму, процесів проліферації та запуску апоптозу і можуть бути потенційними мішенями терапевтичних впливів.

Поставлені в роботі конкретні наукові завдання повністю відповідають її меті, сформульовані коректно й успішно виконані. Слід особливо відмітити високий методичний рівень представленої дисертації: в ній використані не лише сучасні методи біохімії і молекулярної біології, а й біоінформатики.

Отримані Оленою Олександрівною результати є принципово новими і, без сумніву, мають важливе як наукове, так і практичне значення. Нею вперше показано, що за умови пригнічення сигнального шляху IRE1 модулюється рівень експресії великої групи генів, які кодують протеїни мітохондрій, а виявлені ефекти вказують на репрограмування геному сигнальними шляхами, пов'язаними зі стресом ендоплазматичного ретикулума, а також на суттєві зміни функціональної активності мітохондрій. Дисертанткою встановлено, що відмінності в рівні експресії однієї групи генів обумовлені зміною ендорибонуклеазної активності IRE1, а інших - протеїнкіназою досліджуваного сигнального білку або взаємодією шляхів трансдукції сигналу, які знаходяться під контролем цього мультифункціонального протеїну.

Важливим результатом представленої роботи є виявлення залежності гіпоксичної регуляції більшості досліджених генів від сигнального шляху IRE1. Біоінформаційними методами в промоторних ділянках проаналізованих генів виявлені сайти зв'язування транскрипційних факторів HIF та XBP1, що вказує на можливість залежності ефектів гіпоксії на експресію генів на транскрипційному рівні від IRE1-сигналювання, опосередкованого XBP1. Більше того, в 3'-ділянках деяких із досліджених мРНК виявлені сайти зв'язування мікроРНК, а проведене визначення рівня експресії мікроРНК переконливо свідчить про можливість регуляції експресії досліджених мРНК й на пост-транскрипційному рівні.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях. Зроблені Оленою Олександрівною висновки повністю відображають основні результати її дисертаційної роботи, які опубліковані у відкритому друці в 13 статтях (10 із них є в базі даних Scopus, PubMed та Web of Science) і були представлені на численних престижних вітчизняних і міжнародних наукових форумах, включаючи IUBMB, FEBS та Parnas Conference.

При розгляді дисертаційної роботи виникли окремі зауваження.

1. З моєї точки зору, формулювання мети дисертації можна зробити більш лаконічним.

2. Не зовсім вдалим, хоча і поширеним у профільній науковій літературі, є термін «анаеробний гліколіз».

3. В кінці розділу «Огляд літератури» бажано виділити окремий підрозділ, де були б чітко сформульовані невирішені питання, з'ясуванню яких присвячена дисертаційна робота.

4. В тексті рукопису зустрічаються невдалі вирази на кшталт «сенсорно-сигнальні шляхи стресу ендоплазматичного ретикулума».

5. В матеріалах і методах, як на мене, недостатньо посилань на літературні джерела.

6. Рисунок 3.26 є скоріше таблицею.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам. Втім, відмічені зауваження не знижують високу науково-практичну цінність представленої дисертації. Враховуючи актуальність теми, наукову новизну

отриманих результатів, їх наукове і практичне значення, а також високий методичний рівень проведених досліджень, вважаю, що робота Олени Олександрівни Хіти “Механізми регуляції експресії генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1” відповідає всім вимогам ДАК МОН України до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091-Біологія і може бути рекомендована до офіційного захисту.

Дробот Л.Б. – д.б.н.

Я виступаю на семінарах, і можливо, часом задаю якісь каверзні питання, але я намагаюся, щоб ці питання сприяли поступу до досягнення істини. Про ці дискусійні моменти говорив і сам Олександр Григорович, він це також сприймає і оцінює, тому я завжди намагаюся побажати, щоб у наступних дисертаційних роботах були використані не один інструмент, а ще якісь додаткові, які б дозволили, дійсно, з'ясувати механізми, які запускаються за уасті IRE1. Дійсно, є транскрипційні фактори, утворення яких є залежним від IRE1 і звичайно, такі транскрипційні фактори зумовлюють системні відповіді клітин, це стосується як пухлинних клітин, так і нормальних, тому очевидно, що мають бути якісь додаткові механізми, які діють в системі, виявлення яких дозволить вирішити, на що впливати. Дійсно, проблема є складною і все, що тут було викладено, відповідає вимогам до кандидатських дисертацій.

Косякова Г.В. – к.б.н.

Шановні колеги, я також хочу підтримати цю роботу. Звичайно, тема є надзвичайно актуальною, а лікування онкологічних захворювань і визначення нових напрямків та стратегій лікування неможливе без ретельного дослідження біології пухлин, чому, власне кажучи, і присвячена ця робота. Робота виконана на високому науково-методичному рівні із застосуванням сучасних методів. І зрештою, я бажаю вам, щоб ваші результати стали хоча б невеликою частиною в обранні наступних стратегій лікування гліом. Я впевнена, що якісь гени із палітри ваших досліджень, як кажуть «вистрілять». А робота, як і більшість робіт, що виходять з відділу молекулярної біології, звичайно, висококваліфікована і заслуговує бути представленою на офіційному захисті.

Костерін С. О. – д. б. н., член-кор. НАН України

Ви знаєте, напевно чи є необхідність повторювати те, що було сказано за фундаментальний, прикладний і науковий аспект, це все дуже важливо, особливо за патологій. Але я хотів би відзначити декілька речей. Стосовно того, що казала Лідія Григорівна, мені дійсно здається, що дуже цікавим було би подивитися речі, пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулула та з трансмембранним обміном кальцію, із функціонуванням SERCA-помпи, тапсигаргін-чутливої, що відбувається за цих умов. Але що стосується безпосередньо щодо Олени та її доповіді, мені здається, що ми дійсно можемо стверджувати, що Олена добре володіє матеріалом, принаймні вона дуже невимушено доповідала, володіє ситуацією. Я б відзначив і культуру подання фактажу, тобто слайди – наочні, зрозумілі цілком. І мені подобається, хоча ми не вимагаємо – я вже неодноразово казав і на офіційних захистах – від



кандидатських дисертацій якихось, знаєте, таких інтелектуальних узагальнень та концептуальних схем. Взагалі, це фактичні результати ідуть в кандидатських, часто-густо, але є схема – універсальна і це дуже добре, що вона замислюється над такими узагальненнями. Методичне забезпечення дуже добре, ну і робота добре опробована. Особисто я і мої колеги тут не одноразово слухали Олену на вчених радах, коли вона звітувала на молодіжних конкурсах і таке інше. Тому, мені здається, у нас є всі підстави морально підтримати її, наразі, і орієнтуватись вже вам на захист офіційний. Це були погляди наші і виступаючих.

## **ВИСНОВОК**

**про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації Хіти Олени Олександрівни на тему: «Механізми регуляції експресії генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1», поданої на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії в за спеціальністю 091 «Біологія»**

**1. Актуальність теми.** Вивчення біохімічних та молекулярних механізмів регуляції патологічних станів організму на рівні експресії генів є надзвичайно важливим напрямком сьогодення. Онкопатологія посідає друге місце за рівнем захворюваності і смертності в світі, причому ці показники постійно зростають, а ефективного лікування практично немає.

Найбільш злоякісними пухлинами є гліоми, що охоплюють групу пухлин головного мозку нейроепітеліального походження. Саме гліобластома є найбільш поширеною первинною пухлиною головного мозку з високоагресивною поведінкою, що важко піддається терапії та характеризується короткою тривалістю виживання пацієнтів.

Характерною рисою пухлинних клітин, в тому числі і гліомних, є тотальне репрограмування метаболізму, спрямоване на забезпечення біоенергетичних та біосинтетичних потреб. Більше того, клітини пухлин перебувають під постійним впливом внутрішньоклітинних (нестабільність геному, підвищене метаболічне навантаження або експресія онкогенів) та позаклітинних стресових чинників (гіпоксія, оксидативний стрес або дефіцит поживних речовин), що призводить до порушення протеостазу. Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) є спеціалізованим компартментом, що контролює біогенез секреторних і трансмембранних протеїнів та є особливо чутливим до змін клітинного гомеостазу. Накопичення незгорнутих або неправильно згорнутих протеїнів у люмені ендоплазматичного ретикулума призводить до активації систем стресу ЕР та запуску адаптивних внутрішньоклітинних реакцій, відомих під назвою «відповідь на неправильно згорнуті протеїни».

Разом із гіпоксією, стрес ЕР є ключовим модулятором злоякісного росту, оскільки індукує ангиогенез та сприяє розвитку резистентності до апоптозу, що є необхідними умовами для посиленої проліферації і виживання пухлинних клітин навіть в жорстких умовах мікрооточення. Сенсорний протеїн IRE1 (inositol-requiring enzyme 1, ензим, залежний від інозитулу 1) володіє кіназною та ендорибонуклеазною активностями і запускає найбільш консервативний сигнальний шлях стресу ЕР. Оскільки конститутивна активація сенсорно-сигнальних шляхів стресу ЕР є облігатним фактором виживання пухлинних клітин, а пригнічення IRE1-залежних сигнальних каскадів призводить до зниження проліферації клітин гліоми, то на сьогоднішній день інгібітори сенсорно-сигнального ензиму IRE1 розглядаються як потенційні протипухлинні препарати, а молекулярні механізми, за якими IRE1 здійснює контроль над процесами проліферації клітин гліоми привертають особливу увагу.

Мітохондрії виступають центральною ланкою багатьох метаболічних та сигнальних шляхів, що зазнають ремоделювання у пухлинах та є вирішальними для виживання або загибелі клітини. Геномні, функціональні та структурні порушення мітохондрій нерозривно пов'язані із розвитком злоякісних новоутворень, тому не дивно, що ці органели розглядають в якості фармакологічних мішеней для протипухлинної терапії. Функціональна активність цих органел перебуває під контролем біля 1500 протеїнів, що кодуються ядром, причому більшість із цих ензимів та факторів є мультифункціональними і залучені у контроль проліферації та апоптозу. Численні гени, що кодують мітохондріальні протеїни, також є цільовими мішенями для IRE1-опосередкованого транскрипційного репрограмування, що вказує на участь мітохондрій у відповіді на стрес ER.

У зв'язку з цим, дуже актуальною проблемою сьогодення є вивчення ролі IRE1 у регулюванні експресії генів, що кодують ключові протеїни мітохондрій і забезпечують протікання основних функцій цих органел, у клітинах гліоми. Дослідження експресії цих генів за умов інгібування IRE1, а також за гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну, необхідні для з'ясування молекулярних механізмів регуляції експресії даних генів та їх ролі у злоякісному рості. Це може бути важливим підґрунтям для подальших досліджень у пошуку потенційних генів-мішеней і розробки нових підходів до боротьби з пухлинами центральної нервової системи, зокрема гліобластомами.

**2. Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше було встановлено, що у клітинах гліоми лінії U87 експресія ядерних генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SHDB*, *SDHD*, *POLG*, *MTIF2*, *TSFM*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT*, *FAM162A*, *LONP1*, *AIFM1*, *TRADD* та *ATG7*, які кодують функціонально різні протеїни мітохондрій, є залежною від стресу ендоплазматичного ретикулума, а саме від функціонування сенсорно-сигнального ензиму IRE1, ключового медіатора відповіді на не згорнуті протеїни, причому ця залежність має гено-специфічний характер. Показано, що стрес-залежна регуляція цих генів може здійснюватися як через протеїнказну, так і ендорибонуклеазну активність IRE1, а у деяких випадках за участі й інших систем стресу ендоплазматичного ретикулума. Виявлено, що експресія більшості досліджених генів є залежною від гіпоксії, а пригнічення функціональної активності IRE1 переважно модифікує ефект гіпоксії на експресію цих генів. Продемонстровано наявність різної чутливості експресії досліджених генів мітохондріальних протеїнів до умов дефіциту глюкози або глутаміну у клітинах гліоми, а також її залежність від функціональної активності IRE1-залежного шляху стресу ендоплазматичного ретикулума. Встановлено диференційний характер змін експресії ядерних генів, які кодують мітохондріальні фактори та ензими, у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою активністю IRE1, що свідчить про функціональне репрограмування мітохондрій за цих експериментальних умов.

**3. Практичне значення отриманих результатів** полягає у з'ясуванні молекулярних механізмів, що лежать в основі зниження інтенсивності проліферації клітин гліоми, опосередкованого пригніченням сигнального ензиму IRE1, ключового медіатора відповіді на неправильно згорнуті протеїни і що необхідно для створення нових протипухлинних препаратів системної терапії гліом, зокрема на основі ідентифікованих нами потенційних генів-

мішеней *IDH2*, *ENDOG*, *NR3C1* та *NNT*, з урахуванням чутливості експресії цих генів до важливих факторів пухлинного мікрооточення: гіпоксії, дефіциту глюкози та глутаміну. Отримані результати були використані у лекціях по спецкурсу “Конструювання генів” для магістрів КНУ імені Тараса Шевченка, а також в курсі лекцій для аспірантів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

**4. Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота – завершене дослідження, яке було здійснене автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2016 – 2019 р.р. Дисертантом було самостійно проведено аналіз літературних даних за темою роботи та виконано експериментальні дослідження по вивченню у клітинах гліоми експресії ядерних генів мітохондріальних ензимів та факторів, залучених у регуляцію важливих клітинних процесів (біоенергетику, проліферацію та апоптоз), за умов пригнічення функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також гіпоксії, дефіциту глюкози або глутаміну у середовищі. Автором було виконано статистичну обробку отриманих результатів та їх узагальнення. Окремі дослідження по визначенню експресії певних генів проводились за участі наукових співробітників Харькової А. П., Мінченка Д. О. і Ратушної О. О. Планування роботи, розробка методології, аналіз та обговорення результатів проведено за участі наукового керівника, д.б.н., проф., члена-кор. НАН України Мінченка О. Г.

**5. Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень було представлено на вітчизняних та міжнародних конгресах та конференціях: XIV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна: біологія», Київ, 2016; Конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016», Київ, 2016; FEBS Advanced Lecture Course on Oncometabolism, From Conceptual Knowledge to Clinical Applications, Figueira da Foz, Portugal, 2017; International VASTRAIN/3rd Swedish-Ukrainian conference on cancer diseases, Stockholm, Sweden, 2017; XV Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances», Київ, 2017; Joint meeting of the 25<sup>th</sup> annual conference «Modern aspects of biochemistry and biotechnology» & 2nd conference for young scientists of the division of biochemistry, physiology and molecular biology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017; Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, Дніпро, 2017; Young scientists conference «Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2018», Kyiv, 2018; Young Scientist Program, IUBMB, Seoul, Korea, 2018; XI Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine», Kyiv, 2018; Конференція молодих вчених “Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією”, Київ, 2019; Young scientists conference «Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2019», Kyiv, 2019 та 12-му біохімічному конгресі, Тернопіль, 2019.

За матеріалами дисертації опубліковано 29 робіт, із них 13 статей у іноземних та вітчизняних наукових фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, і 16 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних конференцій і конгресів, включаючи IUBMB, FEBS та Parnas

Conference. 10 із опублікованих статей представлені в базах даних Scopus, PubMed і Web of Science.

**6. Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 29 робіт, із них 13 статей у іноземних та вітчизняних наукових фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, і 16 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних конференцій і конгресів, включаючи IUBMB, FEBS та Parnas Conference. 10 із опублікованих статей представлені в базах даних Scopus, PubMed і Web of Science.

### Список опублікованих праць за темою дисертації

#### *Статті у наукових фахових виданнях України, що входять до переліку, затвердженого ДАК України:*

1. IRE1 knockdown modifies glucose and glutamine deprivation effects on the expression of proliferation related genes in U87 glioma cells / Tsymbal D. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Ratushna O. O., Minchenko O. H. // *Biotechnologia Acta.* – 2016. – Vol. 9, № 1. – P. 26 – 37. *(Особистий внесок здобувача – проведено дослідження експресії генів ENDOG, POLG, MTIF та TSFM, обробка даних та участь в оформленні статті).*

2. IRE1 knockdown modifies the glutamine and glucose deprivation effect on the expression level of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells / **Riabovol O. O.**, Tsymbal D. O., Minchenko D. O., Ratushna O. O., Minchenko O. H. // *Biotechnologia Acta.* – 2016. – Vol. 9, № 2. – P. 37 – 47. *(Особистий внесок здобувача – проведено дослідження експресії генів ME2, MDH2, GOT2, IDH2, SDHB та SDHD, обробку даних та оформлення статті).*

3. IRE1 knockdown modifies the effect of glutamine deprivation on the expression of a subset of proteases in U87 glioma cells / Halkin O. V., **Riabovol O. O.**, Minchenko D. O., Kuznetsova A. Y., Ratushna O. O., Minchenko O. H. // *Biotechnologia Acta.* – 2017. – Vol. 10, № 4. – P. 34 – 43. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена LONP1 та обробка даних).*

#### *Статті у наукових фахових виданнях України, які входять до міжнародних наукометричних баз даних:*

4. Hypoxic regulation of the expressions of proliferation related genes in U87 glioma cells upon inhibition of IRE1 signaling / Minchenko O. H., Tsymbal D. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Ratushna O. O. // *Ukr. Biochem. J.* – 2016. – Vol. 88, № 1. – P. 11 – 21. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів ENDOG, POLG, MTIF і TSFM, обробка даних та участь в оформленні статті).* **Scopus і PubMed**

5. Inhibition of IRE1 modifies the hypoxic regulation of GADD family gene expressions in U87 glioma cells / Minchenko O. H., Kryvdiuk I. V., **Riabovol O. O.**, Minchenko D. O., Danilovskyi S. V., Ratushna O. O. // *Ukr.*

Biochem. J. – 2016. – Vol. 88, № 2. – P. 25 – 34. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена AIFM1, обробка даних*). **Scopus i PubMed**

6. Effect of hypoxia on the expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells / Minchenko O. H., **Riabovol O. O.**, Tsymbal D. O., Minchenko D. O., Ratushna O. O. // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88, № 3. – P. 54 – 65. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів ME2, MDH2, GOT2, IDH2, SDHB та SDHD, обробка даних та оформлення статті*). **Scopus i PubMed**

7. ERN1-knockdown modifies hypoxic regulation of cathepsins and LONP1 genes expression in U87 glioma cells / Minchenko O. H., **Riabovol O. O.**, Halkin O. V., Minchenko D. O., Ratushna O. O. // Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, № 2. – P. 55 – 69. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена LONP1, обробка даних та участь у написанні статті*). **Scopus**

8. Expression of ubiquitin specific peptidase and ATG7 genes in U87 glioma cells upon glutamine deprivation / Halkin O. V., Minchenko D. O., Riabovol O. O., Telychko V. V., Ratushna O. O., Minchenko O. H. // Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, №5. – P. 52 – 61. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена ATG7, обробка даних та участь у написанні статті*). **Scopus**

**Статті у наукових виданнях інших держав, які входять до міжнародних наукометричних баз даних:**

9. Inhibition of IRE1 affects the expression of genes encoded glucocorticoid receptor and some related factors and their hypoxic regulation in U87 glioma cells / Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Tsymbal D. O., Ratushna O. O., Minchenko O. H. // Endocr. Regul. – 2016. – Vol. 50, Issue 3. – P. 127 – 136. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів NR3C1 та NNT, обробка даних та оформлення статті*). **Scopus i PubMed**

10. Inhibition of IRE1 signaling affects expression of a subset genes encoding for TNF-related factors and receptors and modifies their hypoxic regulation in U87 glioma cells / Minchenko O. H., Kryvdiuk I. V., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Halkin O. V. // Endoplasm. Reticul. Stress Dis. – 2016. – Vol. 3, Issue 1. – P. 1 – 15.. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена TRADD, обробка даних та участь у написанні статті*). **Web of Science**

11. IRE-1 $\alpha$  regulates expression of ubiquitin specific peptidases during hypoxic response in U87 glioma cells / Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Halkin O. V., Ratushna O. O., Tsymbal D. O., Minchenko O. H. // Endoplasm. Reticul. Stress Dis. – 2016. – Vol. 3. – P. 50 – 62. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена ATG7, обробка даних*). **Web of Science**

12. Hypoxic regulation of the expression of genes encoded estrogen related proteins in U87 glioma cells: effect of IRE1 inhibition / Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Ratushna O. O., Minchenko O. H. // Endocr. Regul. – 2017. Vol. 51, Issue 1. – P. 8 – 19. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена FAM162A, обробка даних і участь у написанні статті*). **Scopus i PubMed**



13. Effect of glucose deprivation on the expression of genes encoding glucocorticoid receptor and some related factors in ERN1-knockdown U87 glioma cells / **Riabovol O. O.**, Tsybal D. O., Minchenko D. O., Lebid-Biletska K. M., Sliusar M. Y., Rudnytska O. V., Minchenko O. H. // *Endocr. Regul.* – 2019. Vol. 53, Issue 4. – P. 237-249. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів NR3C1 та NNT за умов дефіциту глюкози та обробка даних*). **Scopus**

#### **Тези наукових доповідей:**

14. Експресія ядерних генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми за умов пригнічення сигнального ензиму IRE1 / **Рябовол О. О.**, Галкін О. В., Ратушна О. О. // *Актуальні проблеми біохімії та біотехнології* – 2016. Тези доповідей конференції-конкурсу молодих учених, 26-27 травня 2016 р., Київ, Україна – *Ukr. Biochem. J.* – 2016. – Vol. 88, № 4. – P.116.

15. Гіпоксична регуляція експресії генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 / **Рябовол О. О.**, Галкін О. В., Ратушна О. О. // «Шевченківська весна: Біологія – 2016». Матеріали XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених КНУ ім. Тараса Шевченка. – Київ. – 2016. – С. 172-173.

16. IRE1-dependent endoplasmic reticulum stress pathway as an important factor of glioma growth / Tsybal D. O., **Riabovol O. O.** // *Актуальні проблеми біохімії та біотехнології* – 2016. Тези доповідей конференції-конкурсу молодих учених, 26-27 травня 2016 р., Київ, Україна – *Ukr. Biochem. J.* – 2016. – Vol. 88, №5. – P. 123.

17. Endoplasmic reticulum stress as a key factor of genome reprogramming in cancer cells / Ratushna O. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Luzina O. Y., Minchenko O. H. // *International VACTRAIN/3<sup>rd</sup> Swedish-Ukrainian conference on cancer diseases. Karolinska Institutet, Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC), January 16-17, 2017, Stockholm, Sweden.* – P. 5.

18. Експресія ядерних генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченням IRE1 за умов дефіциту глюкози / **Рябовол О. О.**, Ратушна О. О., Мінченко О. Г. // “Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances”. Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених. – Київ, Україна – Паливода А.В.– 2017. – С. 77-78.

19. IRE1 mediated regulation of the expression of a subset of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells / **Riabovol O. O.**, Minchenko D. O., Ratushna O. O. // *Joint Meeting 25<sup>th</sup> Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” & 2<sup>nd</sup> Conference of Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine, 6-9 June 2017, Kyiv* – *Ukr. Biochem. J.* – 2017. – Vol. 89, № 4. – P. 89.

20. Inhibition of IRE1 signaling affects the expression of genes encoding glucocorticoid receptor and some related proteins in U87 glioma cells / Ratushna O. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Minchenko O. H. // *Materials of a mini-symposium “New trends in cancer research and innovative tumor vaccines”*

held on May 11, 2017 during the VACTRAIN summer school in Kyiv, Ukraine – Exp Oncol. – 2017. – Vol. 39, № 2. – P. 7.

21. Involvement of ubiquitin specific peptidases as well as IGFBP4, STC2, and GSA7/ATG7 proteins in IRE1 mediated control of glioma cell proliferation / Ratushna O. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Tsymbal D. O., Minchenko O. H. // FEBS Advanced Lecture Course on Oncometabolism, From Conceptual Knowledge to Clinical Applications, 18-24 June 2017, Figueira da Foz, Portugal – Book of Abstracts. Figueira da Foz, Portugal. – 2017. – P. 67.

22. Молекулярні основи репрограмування метаболізму за онкологічних та метаболічних захворювань / Мінченко О. Г., Ратушна О. О., **Рябовол О. О.**, Мінченко Д. О., Лузіна О. Я. // IV Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, 5-6 жовтня 2017: Збірник тез. – Дніпро. – 2017. – С. 70-72.

23. Inhibition of IRE1-dependent endoplasmic reticulum stress signalling reprograms gene expressions in cancer cells / Ratushna O. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Minchenko O. H. // IUBMB SEOUL 2018, Young Scientist Program, June 2-4, Yonsei University, Seoul, Korea. Book of abstracts. – Seoul. – 2018. P. 19. 006.

24. IRE1 knockdown leads to suppression of glioblastoma growth / Ratushna O. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.** // FEBS3+ Meeting - XI<sup>th</sup> Parnas Conference – Yong Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”, 3-5 September 2018, Kyiv, Ukraine – Ukr. Biochem. J. – 2018. – Vol. 90, Special Issue. – P. 144.

25. Metabolic reprogramming of mitochondria in IRE1 knockdown U87 glioma cells / **Riabovol O. O.**, Tsymbal D. O., Minchenko O. H. // FEBS3+ Meeting - XI<sup>th</sup> Parnas Conference – Yong Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”, 3-5 September 2018, Kyiv, Ukraine – Ukr. Biochem. J. – 2018. – Vol. 90, Special Issue. – P. 145.

26. **Riabovol O. O.**, Minchenko O. H. Mitochondrion as an important component of integral reprogramming cancer cells metabolism and surviving. Young Scientists Conference “Fundamental Medicine: Integrated Approaches to Cancer Therapy. Kyiv, February 4 – 5, 2019. Oncology. – 2019.- V. 21, N 1. – P. 80.

27. Sliusar M.Y., **Riabovol O.O.**, Minchenko O.H. Molecular mechanisms of hypoxic regulation of proliferation related gene expressions in glioma cells. Young Scientists Conference “Fundamental Medicine: Integrated Approaches to Cancer Therapy. Kyiv, February 4 – 5, 2019. Oncology. – 2019.- V. 21, N 1. – P. 81.

28. Sliusar M.Y., **Riabovol O.O.**, Minchenko O.H. Molecular mechanisms of hypoxic regulation of proliferation related gene expressions in glioma cells. Young scientists conference: Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2019. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, 21-22 March, 2019, Kyiv, Ukraine. Ukr. Biochem. J. – 2019. – V. 91, N 2. – P. 86.

29. Sliusar M.Y., **Riabovol O.O.**, Lebid-Biletska K.M., Minchenko D.O. Molecular mechanisms of dependence of hypoxic regulation on endoplasmic reticulum stress. 12-й Укр. біохім. конгрес, 2019. Медична та клінічна хімія, 2019, 21(3, додаток): 134.

**7. Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 168 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 255 посилань. Робота містить 53 рисунки та 8 таблиць.

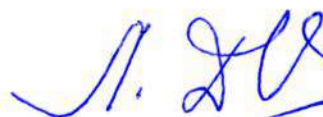
**8. Оцінка мови та стилю дисертації.** Дисертацію написано грамотною українською мовою, стиль викладення матеріалу відповідає прийнятому в науковій літературі.

**9. Відомості щодо проведення біоетичної експертизи.** Дисертація виконана з дотриманням всіх біоетичних вимог (протокол №3 засідання комісії з біоетики і біобезпеки Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України від 14 січня 2020 р.)

**10. Рекомендація дисертації до захисту.** Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 091 «Біологія» аспірантки Хіти Олени Олександрівни «Механізми регуляції експресії генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1» є завершеною науковою працею, що виконана здобувачем особисто, а також має наукову новизну, теоретичне та практичне значення.

Робота Хіти О. О. відповідає вимогам п. 10 постанови «Про проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії», затвердженої Кабінетом Міністрів України від 6 березня 2019 р. №167 і може бути рекомендована до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

**Голова засідання,  
Доктор біологічних наук,  
професор, завідувач відділу  
сигнальних механізмів клітини  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна**

 Дробот Л. Б.

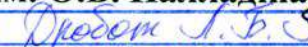
**Рецензенти:**

**Доктор біологічних наук,  
провідний науковий співробітник  
відділу біохімії м'язів  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна  
НАН України**

 Бабіч Л. Г.

**Доктор біологічних наук,  
провідний науковий співробітник  
відділу біохімії м'язів  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна  
НАН України**



Підпис  Данилович Ю.В.  
**ЗАСВІДЧУЮ**  
Зав. канцелярією  
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна  
національної академії наук України  
"18" жовтня 2020 р.