

ВИСНОВОК

наукового керівника Олександра МІНЧЕНКА,
д.б.н., професора, член-кор. НАН України, завідувача відділу
молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
на дисертаційну роботу Дар'ї КРАСНИЦЬКОЇ
“Експресія генів родини Nucleobox у клітинах гліоми за умов гіпоксії та
пригнічення IRE1”,
що подається на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09
Біологія, за спеціальністю 091 Біологія

1. Особливості проходження підготовки в аспірантурі та виконання освітньо-наукової програми підготовки доктора філософії

Дар'я КРАСНИЦЬКА зарахована до аспірантури з відривом від виробництва зі спеціальності «091 Біологія» Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (Інституту) з 01 листопада 2020 року (Наказ № 8-а від 21.10.2020 р.) для виконання освітньо-наукової програми (ОНП) підготовки за навчальним планом освітньої складової (36 кредитів ЄКТС) для здобуття вищої освіти ступеня доктора філософії. Рішенням Вченої ради Інституту від 04.02.2021 р. (Протокол №2) затверджений індивідуальний план наукової роботи та тема дисертації “Експресія генів родини Nucleobox у клітинах гліоми за умов гіпоксії та пригнічення IRE1”. Звітування щодо виконання індивідуального плану ОНП підготовки доктора філософії подавалося щороку згідно строків (1-й рік – 25.11.2021 р.; 2-й рік – 13.10.2022 р.; 3-й рік – 31.10.2023 р.). Всі блоки ОНП, обов'язкові дисципліни та дисципліни за вибором здобувача і вибором Інституту, Дар'єю КРАСНИЦЬКОЮ освоєні успішно та у повному обсязі. Протягом 2020-2024 рр. нею повністю завершено експериментальну роботу, рукопис дисертації і опубліковано статті в фахових журналах з висвітленням матеріалів дисертації. Всю документацію для звітування здобувач оформлювала та надавала вчасно.

2. Особливості формування індивідуальної освітньої траєкторії та виконання індивідуального плану здобувача

За час навчання в аспірантурі Дар'я КРАСНИЦЬКА набула рівня компетентності, що відповідає вимогам підготовки доктора філософії, який складається з трьох основних блоків. Загально-науковий блок охоплював

засвоєння знань і досягнення результатів навчання з обов'язкових навчальних дисциплін, а також за вибором Інституту та вільного вибору аспіранта. До універсальних навичок дослідника відносилося оприлюднення власних результатів дослідження у фахових наукових виданнях та їх апробація на наукових конференціях і конгресах. Спеціальні навички охоплювали здатність до продукування нових ідей та розв'язання комплексних проблем у галузі професійної і/або дослідницько-інноваційної діяльності, а також до застосування сучасних методологій, методів та інструментів педагогічної і наукової (творчої) діяльності за фахом.

Обов'язкові навчальні дисципліни, а саме філософія науки та культури, іноземна мова за професійним спрямуванням, організація підготовки дисертації, педагогіка вищої школи, асистентська педагогічна практика були успішно завершені та складені на «відмінно» (90-96 балів за шкалою закладу освіти), а комплексний іспит зі спеціальності на «добре» (84 бали). Також на «відмінно» були складені дисципліни вибору Інституту (92-93 балів) і дисципліни вільного вибору аспіранта (90-99 балів). У ході проходження асистентської педагогічної практики були підготовлені освітні матеріали та проведено 2 лекційних, 5 семінарських і 5 практичних занять для студентів, що виконували курсові і дипломні роботи у відділі молекулярної біології, а також здійснювалася кураторська робота над проходженням виробничої практики закріплених за здобувачкою студенток 4-го курсу, яка полягала у консультуванні та контролі його самостійної роботи за темою кваліфікаційної роботи бакалавра.

Універсальні навички здобувача були закріплені та підтверджені у ході написання статей і тез за матеріалами дисертаційної роботи. Зокрема, було опубліковано 9 робіт, з них 4 статті в іноземних фахових наукових виданнях, три із яких представлені в базах Scopus та PubMed, і 5 тез доповідей у матеріалах міжнародних наукових конференцій.

Спеціальні навички для забезпечення здатності до продукування нових ідей і розв'язання комплексних проблем у галузі біохімії та молекулярної біології були здобуті шляхом детального аналізу і обговорення статей,

опублікованих у престижних міжнародних журналах, з подальшим висуненням аспіранткою ідей про нові шляхи вирішення ключових проблем біохімії та молекулярної біології. Частина ідей була реалізована у ході пошукових досліджень із застосуванням сучасних методів молекулярної біології. Використання методів біоінформатики також збагатило навички аспірантки до продукування нових ідей і розв'язання комплексних проблем регуляції експресії генів, зокрема на пост-транскрипційному рівні. Ідея про роль транскрипційних факторів у механізмах контролю експресії генів була збагачена аналізом промоторних ділянок генів на наявність сайтів зв'язування цих факторів. Дар'я Красницька розробила свої педагогічні підходи у роботі із студентами, виконанні кваліфікаційної роботи та її презентації. Її наукова діяльність за фахом також була насичена новими ідеями про молекулярні механізми регуляції експресії генів за гіпоксії та дефіциту глутаміну в залежності від IRE1, про роль протеїнкінази IRE1 у контролі експресії генів.

3. Успіхи у набутті компетентностей наукового пошуку

Дар'я КРАСНИЦЬКА у 2020 році закінчила Одеський національний університет імені І.І. Мечникова за спеціальністю «Біохімія» і за час навчання в аспірантурі за ОНП підготовки доктора філософії в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна вона досягла значних теоретичних і практичних успіхів у галузі біохімії та молекулярної біології.

Згідно з сучасною класифікацією компетентностей вказаних у методичних рекомендаціях щодо стандартів вищої освіти (згідно наказу Міністерства освіти і науки України від 01.06.2017 р. № 600 (у редакції наказу Міністерства освіти і науки України від 30.04.2020 р. № 584)) здобувачем досягнені наступні результати у ході проходження програми підготовки для здобуття наукового ступеня доктора філософії:

Знання: Дар'я КРАСНИЦЬКА детально ознайомила із сучасними досягненнями у вивченні молекулярних механізмів розвитку і росту злоякісних пухлин клітини і ролі гіпоксії та стресу ендоплазматичного ретикулума, що знайшло відображення в розділі дисертаційної роботи «Огляд літератури». Вона також ознайомила із методологією досліджень та статистичного аналізу

результатів дослідження, успішно використала набуті знання при плануванні роботи, що відображено у розділі «Матеріали і методи» її дисертації.

Уміння 1: Дар'я КРАСНИЦЬКА успішно освоїла сучасні методи біохімії та молекулярної біології, які вважала необхідними для виконання конкретних завдань своєї дисертаційної роботи, а у процесі роботи висувувала нові ідеї і деякі із них успішно втілювала у життя.

Уміння 2: Вона започаткувала свою роботу з постановки конкретних завдань, виконання яких повинно було сприяти досягненню поставленої мети, коригування послідовності їх виконання і аналізу отриманих результатів, їхньої достовірності.

Уміння 3: Дар'я КРАСНИЦЬКА постійно аналізувала отримані результати, синтезувала нові ідеї і намагалася їх реалізувати. Особливо це стосувалося аналізу змін в експресії тих чи інших генів, на що вони вказують та як їх трактувати, чи можуть вони допомогти розшифрувати механізми пригнічення проліферації клітин за нокдауну IRE1.

Комунікація 1: Дар'я КРАСНИЦЬКА вільно спілкується з питань механізмів дії наночастинок на клітини і організми, їх генотоксичності та біобезпеки, можливих негативних наслідків використання наночастинок у біомедицині, неодноразово представляла результати своїх досліджень на міжнародних наукових форумах, у тому числі і на Українському біохімічному конгресі.

Комунікація 2: Свої доповіді вона робила як академічною українською мовою, так і англійською. У професійній діяльності та дослідженнях використовує академічну українську мову і за необхідності – англійську.

Відповідальність та автономія 1: Дар'я КРАСНИЦЬКА користується повагою і авторитетом серед колег, здатна самостійно ставити та виконувати наукові задачі. Для неї характерна доброчесність, послідовна відданість створенню нових ідей у своїй професійній діяльності і їх розвитку.

Відповідальність та автономія 2: Вона постійно вдосконалює та поглиблює свої знання, для неї характерним є самовдосконалення і навчання цьому інших.

4. Актуальність теми дисертаційної роботи

Як зазначалося вище, тема дисертаційної роботи Дар'ї КРАСНИЦЬКОЇ сформульована наступним чином: «Експресія генів родини Nucleobox у клітинах гліоми за умов гіпоксії та пригнічення IRE1». Численні наукові публікації присвячені дослідженню злоякісних новоутворень свідчать про особливу важкість лікування пухлин головного мозку, зокрема таких як гліобластоми. Наявні методи лікування мають недоліки, зокрема, відсутність специфічності, полі-резистентність до лікарських препаратів та гіпоксії. Ріст злоякісних пухлин пов'язаний з перепрограмуванням геному і саме тому, з'ясування молекулярних механізмів цього перепрограмування, вивчення ролі ключових транскрипційних регуляторів і механізмів їх контролю сигнальними шляхами стресу ендоплазматичного ретикулума та гіпоксії є дуже важливим і перспективним напрямком пошуку нових підходів до лікування гліобластом. Деякі із досліджених у цій роботі транскрипційних факторів і мікроРНК можуть бути використані і як мішені для розробки нових методів лікування злоякісних новоутворень.

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

Дисертаційну роботу виконано протягом 2020–2024 рр. у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: «Молекулярні механізми взаємодії сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума та гіпоксії в репрограмуванні геному клітин гліоми», № ДР 0121U100662 (2021–2025 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.).

6. Наукова новизна отриманих результатів.

Вперше були виявлені виражені зміни рівня експресії генів транскрипційних факторів родини гомеобокс у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG за умов пригнічення IRE1/ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума, і що виявлені зміни в експресії

досліджених генів були гено-специфічними і залежали від типу нокдауну ERN1. Отримані результати продемонстрували важливу роль ендорибонуклеази ERN1 в регуляції експресії генів *ZEB2* та *TGIF1*, оскільки як у клітинах гліоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1, так і у клітинах без обох ензиматичних активностей ERN1 рівень експресії цих генів істотно не відрізнявся за величиною. Це переконливо свідчить про опосередкованість виявлених змін в експресії цих генів саме ендорибонуклеазною, а не протеїнкіназною активністю ERN1. Вперше також показано, що саме протеїнкіназа ERN1 є ключовим регулятором експресії генів *PBX3*, *PRRX1*, *PAX6* і *PBXIP1*, оскільки пригнічення лише ендорибонуклеазної активності сигнального протеїну ERN1 не впливало на рівень їх експресії.

Вперше також показано, що експресія більшості генів транскрипційних факторів родини Homeobox є чутливою до гіпоксії, причому рівень експресії цих генів змінюється по-різному як за величиною ефекту, так і за напрямком змін у контрольних, трансфікованих порожнім вектором, клітинах гліобластоми. Встановлено також, що пригнічення ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей сигнального протеїну ERN1 змінює чутливість переважної більшості генів родини Homeobox до гіпоксії, а це свідчить про залежний від ERN1 контроль гіпоксичної регуляції рівня експресії більшості досліджених нами генів цих транскрипційних факторів. Ці результати є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулула.

Принципово нові результати були отримані при вивченні гіпоксичної регуляції про-онкогенного гомеобокс гена *SPAG4* у клітинах гліобластоми, які продемонстрували різке зниження його чутливості до гіпоксії за умов пригнічення ERN1 і які вказують на можливу участь транскрипційного фактора *SPAG4* у зниженні інтенсивності проліферації цих клітин за умов нокдауну ERN1. Показано, що експресія більшості досліджених генів родини гомеобокс є чутливою до дефіциту як глютаміну, так і глюкози, і що пригнічення сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулула ERN1 переважно

модифікує їх ефекти. Ці результати вказують на ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до забезпечення їх глюкозою та глютаміном.

7. Наукове та практичне значення дослідження

Отримані результати мають важливе наукове значення оскільки спрямовані на вирішення актуальної наукової проблеми щодо молекулярних механізмів гіпоксичної регуляції експресії генів транскрипційних факторів родини гомеобокс за умов виключення активності сигнального протеїну IRE1 і обумовлене цим пригнічення проліферації клітин гліобластоми. Практичне значення полягає у виявленні ролі протеїнкінази ERN1 у регуляції експресії генів, пригнічення якої може бути причетним до посиленої інвазивності клітин гліоми шляхом індукції експресії генів *PBX3*, *PRRX1*, *PAX6* і *PBXIP1*, а також в ідентифікації мікроРНК, які контролюють експресію мРНК ZEB2 і PAX6 на пост-трансляційному рівні і можуть бути потенційними мішенями для пригнічення проліферації клітин гліобластоми. Виявлений нами ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до гіпоксії є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулума, що важливо для розробки нових підходів до терапії злоякісних пухлин.

8. Повнота викладення матеріалу дисертації в наукових публікаціях

Результати, представлені у дисертації висвітлені у 4 наукових статтях іноземних фахових видань, три із яких представлені у наукових базах Scopus і PubMed, та 5 тезах доповідей у матеріалах міжнародних наукових конференцій і конгресі.

9. Структура та зміст дисертації, її завершеність і відповідність установленим вимогам щодо оформлення

Структура та зміст дисертації відповідають вимогам щодо оформлення цих рукописів згідно Наказу МОН №40 від 12.01.2017 р. Дисертація містить всі структурні елементи, такі як титульний аркуш, анотація (українською та англійською мовами), зміст, перелік умовних скорочень, основна частина, список використаних джерел і додаток. Дисертаційна робота викладена на 153 сторінках друкованого тексту, основна частина складається із вступу, чотирьох

розділів (огляд літератури, матеріали та методи, результати досліджень і обговорення результатів) та висновків. Робота містить 47 рисунків і 6 таблиць, список використаних літературних джерел включає 165 посилань. Робота є завершеною та відповідає всім установленим вимогам щодо оформлення.

10. Дотримання принципів академічної доброчесності

Дисертаційна робота здобувача Дар'ї КРАСНИЦЬКОЇ повністю відповідає п.12 Постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12 січня 2022 р., №44 щодо вимог доброчесності, оскільки не містить плагіату, самоплагіату, фальсифікації і фабрикації, містить результати, отримані особисто, у всіх інших випадках наводяться посилання на співавторів наукових публікацій та відповідні джерела.

11. Дискусійні положення та зауваження до дисертації

На даний момент зауважень до дисертації не маю, оскільки всі зауваження, що виникали за час виконання і написання дисертаційної роботи були повністю враховані авторкою дисертації. Ця робота є фундаментальною працею, що ініціює появу принципово нових ідей і низку дискусійних положень. Саме в цьому я бачу головну цінність цієї дисертаційної роботи. Одним із найважливіших дискусійних положень є «Важливість пригнічення стресу ендоплазматичного ретикулума для боротьби з пухлинним ростом», оскільки в її наукових публікаціях чітко продемонстровані зміни в експресії мРНК і мікроРНК у клітинах під впливом різних форм пригнічення IRE1, гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози в залежності від IRE1.

12. Загальний висновок

Дисертаційна робота Дар'ї КРАСНИЦЬКОЇ “Експресія генів родини Nucleobox у клітинах гліоми за умов гіпоксії та пригнічення IRE1” за актуальністю, науково-теоретичним рівнем, новизною постановки і розв’язанням проблем, практичним значенням відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня

доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12 січня 2022 р., № 44, а здобувачка заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 - Біологія.

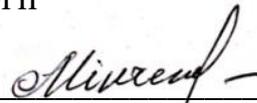
Науковий керівник:

д.б.н., професор, член-кор. НАН України,

завідувач відділу молекулярної біології

Інституту біохімії

ім. О.В. Палладіна НАН України



Олександр МІНЧЕНКО

(підпис)

24 травня 2024 р

Підпис *Олександра Мінченка*
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"24" 05 2024 р.

