

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

В.о. директора Інституту біохімії  
ім. О.В. Палладіна НАН України,  
академік НАН України,  
доктор біологічних наук, професор  
Сергій КОСТЕРІН



протокол № 2 від 18.06. 2024 р.

## ВИСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне  
значення результатів дисертації

Дар'ї КРАСНИЦЬКОЇ

«Експресія генів родини *Hemeobox* у клітинах гліоми за умов гіпоксії та  
пригнічення IRE1»,

поданої на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії  
в галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія

**1. Актуальність теми дисертаційної роботи.** Гліобластома є найбільш злоякісною первинною пухлиною головного мозку з агресивною поведінкою, яка важко піддається терапії та характеризується короткою тривалістю життя пацієнтів. Саме тому, пошук нових підходів до розкриття молекулярних основ патогенезу цих злоякісних пухлин є вкрай необхідним для покращення існуючих і створення нових перспективних стратегій протипухлинної терапії. Оскільки стрес ендоплазматичного ретикулума та гіпоксія є надзвичайно важливими факторами інтенсивного росту злоякісних пухлин шляхом перепрограмування геному для ангиогенезу, посиленого забезпечення пухлини поживними речовинами, резистентності пухлинних клітин до різних токсичних речовин, у тому числі і до токсичних ефектів гіпоксії, то детальне вивчення регуляторних механізмів, що лежать в основі цих ефектів буде сприяти пошуку нових підходів боротьби зі злоякісних пухлин ними. У цьому плані важливу роль відіграють транскрипційні фактори родини *Hemeobox*, більшість із яких задіяні у рості пухлин і є мішенями для боротьби зі злоякісним ростом.

**2. Мета та завдання дисертації.** Метою роботи було дослідити вплив гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози на експресію генів транскрипційних факторів родини *Hemeobox* у клітинах гліобластоми U87MG в залежності від функціональної активності IRE1.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні завдання:

1. Дослідити вплив пригнічення IRE1 у клітинах гліобластоми на рівень експресії генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3.
2. Вивчити рівень експресії генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3 у клітинах гліобластоми за умов гіпоксії в залежності від пригнічення сигнального протеїну IRE1.
3. Дослідити вплив дефіциту глутаміну на експресію генів родини Nfe2b3 у клітинах гліобластоми в залежності від пригнічення сигнального протеїну IRE1.
4. Вивчити вплив пригнічення IRE1 на експресію генів родини Nfe2b3 у клітинах гліобластоми за умов дефіциту глюкози.
5. Провести біоінформаційний аналіз промоторних ділянок генів родини Nfe2b3 на сайти зв'язування HIF і XBP1s та 3'-нетранслюємих ділянок мРНК цих транскрипційних факторів на наявність сайтів зв'язування мікроРНК, а також дослідити вплив пригнічення IRE1 на експресію мікроРНК.

**3. Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше було встановлено, що пригнічення IRE1/ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума, гено-специфічно змінює рівень експресії транскрипційних факторів родини Nfe2b3 у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG різними механізмами: через ендорибонуклеазну активність ERN1 або його протеїнкіназну активність. Показано, що саме протеїнкіназна активність 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. Також вперше показано, що експресія більшості генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3 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 ERN1 нокдаун змінює чутливість більшості генів родини Nfe2b3 до гіпоксії і це свідчить про стрес-залежний контроль гіпоксичної регуляції експресії більшості досліджених нами генів цих важливих транскрипційних факторів. Отримані результати є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулума. Принципово нові результати були отримані при вивченні гіпоксичної регуляції про-онкогенного Nfe2b3 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 Nfe2b3 є чутливою до дефіциту як глутаміну, так і глюкози, і що ця чутливість має ERN1-залежний характер.

**4. Теоретичне значення одержаних результатів.** Теоретичні положення, сформульовані за результатами проведених досліджень та опрацювання інших теоретичних даних, розширюють існуючі уявлення про роль протеїнкінази ERN1 в регуляції експресії генів транскрипційних факторів родини Nucleobox, що є важливим при використанні ERN1 в якості гена-мішені.

**5. Практичне значення одержаних результатів.** Практичне значення результатів цієї роботи полягає у виявленні ролі протеїнкіназної активності 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.

**6. Особистий внесок здобувача.** Представлена дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, яке було здійснене авторкою відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2020 – 2024 рр. Дисертанткою було самостійно здійснено аналіз даних літератури за темою роботи, виконано експериментальні дослідження по вивченню рівня експресії генів транскрипційних факторів родини Nucleobox у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG за умов пригнічення IRE1/ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума, і його залежності від типу нокдауну ERN1. Авторкою були проведені дослідження по виявленню можливої ролі ERN1 сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума у дії гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну на експресію генів родини Nucleobox, а також здійснено статистичну обробку отриманих результатів та їх узагальнення. Окремі дослідження по визначення рівня експресії певних генів проводилися за участі студентів Мирослави Слюсар, Анастасії Чередниченко, Наталії Оксіом, Софії Гоян, Юлії Куліш, к.м.н. Дмитра Мінченка та доктора філософії Олени Хіти. Планування роботи, розробка методології, аналіз та обговорення результатів проведено за участі наукового керівника, д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України Олександра Мінченка.

**7. Публікації результатів роботи, їх обговорення.** Основні результати дисертації знайшли відображення у 4-ох друкованих статтях, 3 з яких опубліковані у періодичних наукових виданнях, віднесених до першого-третього квантилів (Q1-Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal and

Country Rank або Journal Citation Report. Аналіз внеску авторки у публікації з питань, висвітлених у дисертації, показав, що внесок Дар'ї КРАСНИЦЬКОЇ є вирішальним, зокрема у працях:

1. **Krasnytska D.A.**, Khita O.O., Tsymbal D.O., Luzina O.Y., Cherednychenko A.A., Kozynkevych H.E., Bezrodny V.H., Minchenko D.O. The impact of glutamine deprivation on the expression of *MEIS3*, *SPAG4*, *LHX1*, *LHX2*, and *LHX6* genes in ERN1 knockdown U87 glioma cells. *Endocr Reg.* 2022, 56 (1): 38-47. doi:10.2478/enr-2022-0005. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів MEIS3, SPAG4, LHX1 та LHX6, обробка даних та участь у написанні статті*). Анастасія Чередниченко і Олена Хіта допомагали у вивченні експресії гена *MEIS3*. Інші співавтори приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus i PubMed**

2. **Krasnytska D.A.**, Viletska Y.M., Minchenko D.O., Khita O.O., Tsymbal D.O., Cherednychenko A.A., Kozynkevych H.E., Oksiom N.S., Minchenko O.H. ERN1 dependent impact of glucose and glutamine deprivations on *PBX3*, *PBXIP1*, *PAX6*, *MEIS1*, and *MEIS2* gene expressions in U87 glioma cells. *Endocr Reg.* 2023, 57 (1): 37-47. doi:10.2478/enr-2023-0005. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів MEIS1, TBXIP1, TBX3, PAX6 і MEIS2, обробка даних та участь у написанні статті*). Анастасія Чередниченко, Наталія Оксіом і Олена Хіта допомагали у вивченні експресії гена *MEIS2*. Інші співавтори приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus i PubMed**

3. Minchenko D.O., **Krasnytska D.A.**, Khita O.O., Viletska Y.M., Rudnytska O.V., Kozynkevych H.E., Hoian S.L., Minchenko O.H. Knockdown of ERN1 modifies the impact of glutamine deprivation on *TGIF1*, *ZEB2*, *NKX3-1*, *PRRX1*, and *SLC1A5* gene expressions in U87 glioblastoma cells. *J Endocr Diabetes Res, BioRes Scientia.* 2023, 1:1-10. doi:10.59657/jedr.brs.23.004. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів TGIF1, ZEB2, PRRX1 та SLC1A5, обробка даних та участь у написанні статті*). Софія Гоян і Дмитро Мінченко допомагали у вивченні експресії генів *NKX3-1*, *PRRX1* та *SLC1A5*. Інші співавтори приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку.

4. **Krasnytska D.A.**, Khita O.O., Viletska Y.M., Minchenko D.O., Halkin O.V., Rudnytska O.V., Hoian S.L., Minchenko O.H. ERN1 knockdown modifies the hypoxic regulation of homeobox gene expression in U87MG glioblastoma cells. *Endocr Reg.* 2024, 58(1): 47-56. doi:10.2478/enr-2024-0006. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів MEIS1, MEIS2, MEIS3, LHX6 і SPAG4, обробка даних та участь у написанні статті*). Софія Гоян і Дмитро Мінченко допомагали у вивченні експресії генів *MEIS3* та *LHX6*. Інші

співавтори приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus i PubMed**

**8. Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень були представлені на міжнародних конференціях та конгресі: FEBS-IUBMB-ENABLE 1<sup>st</sup> Int. Mol. Biosciences PhD and Postdoc Conference, 16-18 Nov, 2022, The Institute of Biomedicine of Seville, Spain; 4<sup>th</sup> RECOOP Int. Student and 17<sup>th</sup> RECOOP Bridges in Life Sci. Conf., April 6-9, 2022, Prague, Czech Republic; 6-та Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, Україна, 2022; 1-st International meeting of the Enlight Cancer network “Enlight Cancer Days”, September 28-29, 2023. BRIC, Bordeaux University; Talence, France; the Bukovinian International Medical Congress 2024, ВІМСО Journal, Chernivtsi, Україна.

**9. Інформація щодо проведення біоетичної експертизи дисертаційних досліджень.** Проведені в ході виконання дисертаційної роботи Дар’ї КРАСНИЦЬКОЇ дослідження на культурах клітин гліобластоми лінії U87MG відповідають нормам біобезпеки та біоетики відповідно згідно вказівкам та рекомендаціям Гельсінської декларації (1975) з доповненнями від 2000 та 2008 років для роботи з використанням людського матеріалу. Це затверджено на засіданні Комісії з біологічної безпеки та біоетики Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (протокол №3, від 5 червня 2024 року).

Таким чином, за результатами публічної презентації Дарією КРАСНИЦЬКОЮ наукових результатів дисертації «Експресія генів родини *Hmox* у клітинах гліоми за умов гіпоксії та пригнічення IRE1» та її обговорення на розширеному засіданні професорсько-викладацького складу Випускної кафедри ЗВО Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та наукового семінару «Актуальні проблеми сучасної біохімії» Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України ухвалили:

1. Вважати, що дисертація Дар’ї КРАСНИЦЬКОЇ на тему «Експресія генів родини *Hmox* у клітинах гліоми за умов гіпоксії та пригнічення IRE1» є завершеною науковою працею та відповідає спеціальності 091 «Біологія»

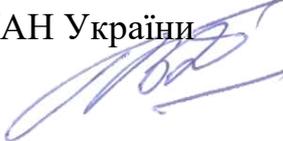
2. Вважати, що дисертація Дар’ї КРАСНИЦЬКОЇ відповідає «Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та

доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)», затвердженого постановою №261 Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 року та «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (пп. 6, 7, 8), затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №44 від 12 січня 2022 р.

3. Рекомендувати дисертацію Дар'ї КРАСНИЦЬКОЇ на тему «Експресія генів родини *Homeobox* у клітинах гліоми за умов гіпоксії та пригнічення IRE1» до захисту на засіданні разової спеціалізованої вченої ради за спеціальністю 091 «Біологія».

26.06. 2024 р.

Головуючий, завідувач відділу біохімії вітамінів і коензимів  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України  
д.б.н., професор



Микола ВЕЛИКИЙ

Завідувач Випускової кафедри  
ЗВО Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,  
д.б.н., с.н.с.



Лідія БАБІЧ

Секретар засідання, науковий співробітник  
відділу молекулярної біології  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна  
НАН України  
к.б.н.



Юлія ВІЛЕЦЬКА