

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор Інституту біохімії

ім. О. В. Палладіна НАН України

академік НАН України,

доктор біологічних наук, професор.

С. В. Комісаренко

12 червня 2021 р.



ВИСНОВОК

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
щодо дисертаційної роботи Лузіної Ольги Ярославівни на тему:
«Роль IRE1 в експресії NAMPT та залежних від нього протеїнів у клітинах
гліоми», поданої на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09
«Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

ВИТЯГ

з протоколу № 6 розширеного засідання відділу біохімії м'язів
із залученням співробітників відділу молекулярної біології,
а також співробітників інших відділів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
від 1 червня 2021 року

Присутні: Костерін С.О – акад., д. б. н., проф., зав. відділу, головуєчий,
Бабіч Л.Г. – д. б. н., пр. н. с., рецензент, секретар засідання, Векліч Т. О. – к. б.
н., с. н. с. рецензент; та інші співробітники відділу біохімії м'язів: Карахім С.О.
– с. н. с., к. х. н., Данилович Ю.В. – д. б. н., пр. н. с., Данилович Г. В. – к. б. н.,
с. н. с., Чуніхін О. Ю. – к. т. н., с. н. с.; співробітники інших відділів інституту:
молекулярної біології – Мінченко О. Г. – д. б. н., проф., член-кор. НАН
України, зав. відділу, Мінченко Д. О. – к. мед. н., м. н. с., Даніловський С. В. –
к. мед. н., н. с., Вілецька Ю. М. – к. б. н., н. с., Галкін О. В. – к.б.н., м. н. с.,
Кривдюк І. В. – к. б. н., м. н. с., Хіта О.О. – PhD, н. с., Гнатюк О. С. – аспірант,
пр. інж., Рудницька О. В. – аспірант, пр. інж., Слюсар М. Ю. – інж. I кат.,
Чередниченко А. А. – лабор.; співробітники відділу сигнальних механізмів
клітини: Дробот Л.Б – д. б. н., проф., зав. відділу; структури і функції білка:
Платонова Г. М – проф., д. б. н., пр. н. с.; біохімії вітамінів та коензимів:
Великий М. М. – проф., д. б. н., зав. відділу; а також Протасова З. С. – к. б. н.,
вчений секретар, Карлова Н. П. – к. б. н., вчений секретар спецради.

Тему дисертації було затверджено на засіданні вченої ради Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України від 20 жовтня 2020 р., протокол №9. Науковим керівником призначений д.б.н., проф., член-кор. Мінченко О.Г.

Дисертаційну роботу виконано протягом 2016–2020 рр. у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України 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.).

З доповіддю виступила молодший науковий співробітник відділу молекулярної біології Лузіна Ольга Ярославівна:

Вивчення міжгенних взаємодій в регуляції експресії генів є важливим і актуальним напрямком в галузі біохімії та молекулярної біології.

Для виживання та протидії стресовим чинникам в пухлинних клітинах активується мережа сигнальних каскадів, спрямована на перебудову тотального метаболізму, посилення процесів проліферації та ангиогенезу.

Оскільки таргетна терапія за участю онкопротеїнів мішеней не є наразі ефективною, сучасні підходи базуються на комплексному дослідженні взаємодії протеїнів мішеней з сигнальними каскадами.

Ми обрали в якості таргетного онкопротеніну поліфункціональний ензим фосфорибозилтрансферазу нікотинаміду NAMPT, рівень якого підвищується в пухлинах різного типу, а фармакологічне пригнічення чинить антипроліферативний і проапоптичний вплив. Для нас було важливим дослідити його роль в системі IRE1 сигнального шляху з метою глибшого розуміння механізмів пухлинного росту.

Пухлина, що активно росте, перебуває під постійним впливом стресових факторів, таких як депривація поживних речовин, гіпоксія, порушення метаболізму та кальцієвого гомеостазу. Це приводить до накопичення в люмені ER протеїни з неправильною конформацією та активації стресу, що реалізується трьома сенсорно-сигнальними протеїнами: ATF6, PERK та IRE1. Останній являється найбільш консервативним та ключовим шляхом стресу ER. Трансмембранна сенсорно - сигнальна молекула IRE1 володіє кіназною та ендорибонуклеазною активністю. Головна функція ендорибонуклеази полягає у розщепленні внаслідок альтернативного сплайсингу мРНК транскрипційного фактору XBP1, з подальшою трансляцією його в цитозолі та транслокацією в ядро, де ним регулюється експресія сотень генів причетних до виживання та відновлення гомеостазу в клітині.

Відомо, що IRE1 є модулятором пухлинного росту, а пригнічення функціональної активності даного протеїну чинить антипроліферативний ефект на пухлинні клітини, зокрема й на клітини гліоми.

NAMPT являється плейотропним протеїном, що відіграє важливу роль в енергетичному балансі клітини. Даний ензим гіперекспресується в пухлинах різного типу і виступає в якості онкогена, підвищує проліферацію та виживання пухлинних клітин та протидіє апоптозу. NAMPT являється ключовим регулятором рівня NAD – кофермента багатьох біохімічних реакцій, енергетичного метаболіта. Від концентрації NAD залежить тотальний енергетичний баланс клітини, перебіг ключових процесів метаболізму та репарації.

Нами були обрані пухлинозалежні гени, дерегуляція експресії яких зафіксована у багатьох типах пухлин, зокрема в гліомах. Важливо зазначити, що більшість протеїнів що кодуються даними генами, є поліфункціональними та відіграють важливу роль в онкогенезі. Умовно дані гени можна поділити на ті, що причетні до процесів проліферації, контролюють виживання та апоптоз, а також міграцію, інвазію та метастазування.

Отже, метою моєї роботи є виявлення міжгенних взаємодій у клітинах гліоми шляхом вивчення експресії генів за умов пригнічення функціональної активності IRE1, а також сайленсінгу мРНК NAMPT. Відповідно до мети були поставлені завдання, які більш детально будуть озвучені 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.

На початковому етапі наших досліджень завданням було виявити залежність експресії NAMPT від активності IRE1.

Було виявлено, що експресія даного гена за умов повного та часткового пригнічення IRE1/ERN1 значно знижується (майже у 17 разів) у порівнянні з контролем, що свідчить про опосередкованість саме ендорибонуклеази IRE1 в регуляції експресії *NAMPT*. За індукції стресу ЕР тунікаміцином ми спостерігали істотне зростання рівня мРНК *NAMPT*, що свідчить про причетність не лише IRE1 сигнального шляху, а й інших систем стресу ЕР (PERK, ATF6) в регуляції *NAMPT*. Данні вестерн-блот аналізу рівня протеїну *NAMPT* узгоджуються з даними отриманими за допомогою ПЛР.

З метою дослідити проміжні шляхи взаємодій між IRE1 - каскадом та *NAMPT* ми провели біоінформаційний аналіз 3'UTR послідовності мРНК *NAMPT*, на наявність сайтів зв'язування з мікроРНК. В ході аналізу було виявлено сайти зв'язування на послідовності мРНК *NAMPT* для багатьох *miRNA*, в тому числі і для *miR-182*. Відомо, що мікроРНК є потужними регуляторами експресії сотень генів, та відіграють провідну роль в онкогенезі.

Тому ми дослідили рівень експресії *miR-182* за умов змін функціональної активності IRE1. Ми виявили, що рівень експресії *miR-182* у гліобластомах (у порівнянні з умовно нормальною тканиною), а також у клітинах гліоми лінії U87 (у порівнянні з нормальними астроцитами людини)

є знижений. За умов пригнічення IRE1 ми виявили значне підвищення мікроРНК-182.

Отже, ми показали, що одним з можливих механізмів IRE1-опосередкованого зниження експресії NAMPT являється регуляція на пост-транскрипційному рівні за рахунок зміни активності miR-182.

Таким чином, за умов пригнічення активності IRE1 відбувається зниження експресії NAMPT, що може бути опосередковане підвищенням активності miR-182.

Наступним завданням було дослідити експресію генів з різною функціональною активністю, залучених у регуляції пухлинного росту, за умов блокади IRE1, а також за умови сайленсінгу NAMPT та порівняти ці зміни для глибшого розуміння пухлинного росту.

В ході дослідження нами показано, що трансфекція клітин гліоми лінії U87 специфічною до NAMPT siRNA істотно знижує рівень мРНК NAMPT (на 82%), через 48 годин після трансфекції у порівнянні з клітинами гліоми, трансфікованими контрольною (неспецифічною) siRNA.

В ході дослідження експресії маркерів проліферації за умов нокдауну NAMPT нами було показано зниження рівень експресії маркера проліферації *Ki-67* (MKI67) на 25% та гена *PCNA* (ядерний антиген проліферації клітин) *proliferating cell nuclear antigen*) демонструють пригнічення проліферативного потенціалу клітин гліоми U87 за даних умов.

Також ми показали значне підвищення експресії проапоптичного та антипроліферативного гена *IGFBP3*, що може бути одним з основних механізмів NAMPT-опосередкованого пригнічення проліферації клітин гліоми.

У ході дослідження експресії генів за умов блокади IRE1 було показано, що більшість генів є залежними від активності IRE1, а рівень їх мРНК знижується за даних умов, що узгоджується з даними про антипроліферативний ефект за умов пригнічення IRE1.

Проте ми бачимо різноспрямовані зміни в сублініях клітин з сайленсінгом NAMPT, при цьому експресія більшості досліджених онкогенів зростає, що свідчить про складність міжгенних взаємодій при порушенні функціональної цілісності геному.

Так було показано, що за умов пригнічення IRE1 та NAMPT, відбувається зниження експресії проонкогенних факторів ATF3 та DEK що узгоджується з даними про антипроліферативний ефект за даних умов.

Дослідження експресії мРНК двох сигнальних протеїнів *PERK* та *ATF6* показало, що сайленсінг NAMPT впливає на чутливість лише *PERK* (еукаріотичного фактору трансляції), тоді як за умов блокади IRE1 змінюється лише експресія мРНК транскрипційного фактору ATF6.

Отже були показані різноспрямовані зміни експресії генів, продукти яких асоційовані з процесами виживання та апоптозу як за умов сайленсінгу NAMPT, так і при блокаді IRE1. Зокрема в сублінії з пригніченим NAMPT,

рівень мРНК онкогена сурвівіну, що кодує антиапоптичний фактор істотно зростає.

Аналогічні зміни ми спостерегли в групі пухлинозалежних генів, регуляторів процесу інвазії, міграції та метастазування. За умов пригнічення IRE1 ми бачимо зниження мРНК усіх генів даної групи. Проте у сублінії з пригніченим NAMPT, експресія даних генів змінюється в протилежному напрямку, що можливо є наслідком компенсаторних механізмів та адаптації пухлинних клітин в умовах порушення цілісності геному.

Оскільки гіпоксія є важливим фактором пухлинного росту, сприяє процесам проліферації за рахунок активації багатьох факторів онкогенезу. Тому наступним завданням було дослідити вплив блокади IRE1 на гіпоксичну регуляцію експресії генів з різними функціями, у клітинах гліоми лінії U87. Так, було показано, як проонкогенний фактор, змінює експресію мРНК усіх досліджених генів, а блокада IRE1 модифікує вплив гіпоксії, може як підсилювати, так і пригнічувати гіпоксичний ефект на рівень експресії даних генів тим самим сприяє уповільненню росту гліоми.

Зокрема було показано, що блокада IRE1 послаблює гіпоксичну регуляцію експресії мРНК *PERK*, що кодує сигнальний протеїн стерсу ER та сприяє виживанню пухлинних клітин гліоми і може мати значення у IRE1-опосередкованому пригніченні проліферації клітин гліоми. Інгібування IRE1 модифікує ефект гіпоксії на експресію *ATF6*, а дані рівня протеїну збігають з отриманими нами результатами про рівнях мРНК даного транскрипційного фактору і вказують на складний механізм гіпоксичної регуляції, який може бути опосередкований IRE1 сигнальним каскадом стресу ER. Слід зазначити, що опосередкована IRE1 регуляція впливу гіпоксії на експресію генів протікає HIF-незалежним чином, так як рівень протеїну HIF при цьому в обох сублініях клітин за гіпоксичних умов є підвищеним. Отже було показано, що блокада IRE1 модифікує вплив гіпоксії на експресію більшості досліджених генів, а це є важливим фактором пухлинного росту.

Пухлинні клітини характеризуються швидкими темпами метаболізму та активно споживають глюкозу та глутамін для біосинтетичних потреб та підтримки процесів проліферації. Тому наступним завданням було визначити ефект дефіциту глутаміну на експресію досліджуваних генів за умов пригнічення функціональної активності IRE1. Ми показали, що дефіцит глутаміну впливає на рівень експресії більшості досліджених генів, а блокада IRE1 модифікує чутливість експресії генів до умов нестачі глутаміну.

Пригнічення функції сигнального ензиму IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 змінювало ефект дефіциту глутаміну на експресію генів: індукувало ефект дефіциту глутаміну на *GNPDA1*, зменшувало — на *COL6A1* і посилювало — на *ADGRE5*, *ATF6*, *DEK* та *BRCA1*. Було показано, що блокада IRE1 модифікує чутливість експресії транскрипційного фактору ATF6 до умов нестачі глутаміну, а саме посилює експресію його мРНК. За умов пригнічення функціональної активності IRE1 відбувається посилення ефекту дефіциту глутаміну на експресію проонкогенів *DEK* та *ADGRE5*. Таким чином, дефіцит глутаміну змінював рівень експресії більшості досліджених генів у

клітинах гліоми лінії U87 залежно від функціональної активності сигнального ензиму IRE1, а це є важливим механізмом IRE1-залежної регуляції метаболізму.

Висновки дозволять не зачитувати, вони були озвучені у ході доповіді. Як узагальнення хочу сказати, що дані представлені в роботі розкривають складні механізми міжгенних взаємодій та ролі пригнічення NAMPT в репрограмуванні геному. Ми побачили дерегуляцію більшості досліджених генів за умов сайленсінгу NAMPT, що може бути наслідком компенсаторних механізмів при порушенні цілісності геному, при цьому зводить під сумнів таргетну терапію та її доцільність у лікуванні пухлин.

За матеріалами кандидатської дисертації було опубліковано 5 статей у фахових виданнях та 10 тез доповідей у наукових журналах і матеріалах конференцій та з'їздів, що вийшли друком з 2016 по 2019 роки.

Дякую за увагу.

Із запитаннями виступили:

Костерін С.О. – завідувач відділу біохімії м'язів, академік, д. б. н., проф. – головуючий:

Ольго Ярославівно, в мене перше запитання. У вас в доповіді та в тезах є фраза “На теперішній час молекулярні механізми IRE1 – опосередкованого пригнічення пухлинного росту до кінця не з'ясовані”. Уточніть будь-ласка, що ви маєте на увазі? А друге запитання, чи можете лаконічно, двома словами сформулювати що виноситься на захист дисертації?

Лузіна О.Я.: IRE1 являється потужним регулятором пухлинного росту, та є підтвердженні дані про те, що пригнічення IRE1 знижує проліферативний потенціал в клітинах гліоми, проте оскільки даний шлях тісно пов'язаний з іншими сигнальними шляхами стресу ER, механізми міжгенної регуляції не з'ясовані і потребують детального дослідження. На захист виноситься: пригнічення функціональної активності IRE1, а також сайленсінгу NAMPT приводить до різноспрямованих змін експресії досліджених генів, блокада IRE1 модифікує вплив гіпоксії та дефіциту поживних речовин на експресію генів, що вказує на можливу їх участь у регуляції пухлинного росту.

Костерін С. О.: А що стосується наслідків таргетної терапії, що Ви можете сказати з цього приводу?

Лузіна О.Я.: Дані отримані нами і представлені в моїй роботі демонструють різноспрямовані зміни експресії більшості онкогенів за умов пригнічення IRE1, так і при РНК-інтерференції NAMPT. Наша робота розкриває глибше механізми регуляції експресії генів за умов таргетного втручання при порушенні цілісності геному.

Костерін С. О.: Біоінформаційний аналіз Ви робили самостійно?

Лузіна О.Я.: Так, біоінформаційний аналіз проводився мною особисто.

Мінченко Д. О. – м. н. с, к. мед. н. від. молекулярної біології:

Скажіть будь ласка, беручи до уваги дані, які ви представили, наступні кроки ваших досліджень?

Лузіна О.Я.: Наступним етапом є вивчення експресії генів, за умов дефіциту глюкози, а також дослідження інших пухлинозалежних генів за умов пригнічення IRE1, так і за умов сайленсінгу NAMPT та порівняти зміни в експресії даних генів,

Великий М. М.– проф., д. б. н., зав. від. біохімії вітамінів та коензимів:

Ви досліджуєте такий цікавий ензим як нікотинамід фосфорибозил трансферазу, який синтезує NAD, необхідний кофактор для гліколізу і пишете, що NAMPT є регулятором трансляції, транскрипції. Яким чином регулюється транскрипція і трансляція якщо посилюється чи послаблюється гліколіз, ЦТК?

Лузіна О.Я.: NAMPT являється плейотропним протеїном, та основна функція полягає в лімітуванні синтезу NAD, важливого коферменту, що задіяний в багатьох окисно - відновних реакціях, зокрема й ключовий регулятор гліколізу, так як зниження концентрації NAD може призводити до зупинки даного процесу. NAMPT опосередковано впливає на транскрипцію та регулює експресію генів перш за все через регуляцію пулу NAD в клітині.

Великий М. М.: Це дуже віддалена регуляція, а точніше регулювання, а моє запитання про безпосередню роль самого ензиму в регуляції транскрипції і трансляції. А як щодо репарації?

Лузіна О.Я.: Відомо, NAMPT бере участь в репарації також через модуляцію рівня NAD, який споживається NAD-залежними ензимами (сіртуїни, PARP) які беруть участь в процесах відновлення пошкодженої ДНК.

Великий М. М.: PARP також задіяний в процесах репарації?

Лузіна О.Я.: PARP каталізують полі-АДФ-рибозилування, один з видів посттрансляційної модифікації протеїнів, та беруть участь у процесах репарації.

Великий М. М.: У вас надзвичайно цікава модель дефіциту глутаміну. Було б цікаво почути від Вас про експресію генів які безпосередньо беруть участь в метаболізмі глутаміну, чи досліджували Ви саме такі гени?

Лузіна О.Я.: В моїй роботі не представлені гени, продукти яких безпосередньо залучені в регуляції метаболізму глутаміну.

Великий М. М.: Заключне моє питання про взаємодію гіпоксії та IRE1, як Ви вважаєте, чи вони діють синхронно, та взаємодоповнюють ці два фактори, чи функціонують абсолютно протилежним чином?

Лузіна О.Я.: Відомо, що активація IRE1 сигнального шляху сприяє адаптації пухлинних клітин до токсичних впливів гіпоксії. Гіпоксична регуляція за участю IRE1 відбувається як за рахунок активації ендорибонуклеазою даного ензиму транскрипційного фактора ХВР1, який регулює експресію генів залучених в активації гіпоксії. Стрес ЕР може з одного боку активувати гіпоксичні ефекти, а з іншого боку сама гіпоксія може викликати стрес ЕР.

Л.Б. Дробот – д. б. н., проф, зав. від. сигнальних механізмів клітини:

На скількох сублініях клітин проводили дослідження особливостей експресії в клітинах гліоми? В яких клітинах досліджували експресію за умов пригнічення мРНК та протеїну NAMPT?

Лузіна О.Я.: Дослідження проводились на сублініях клітин з повним та частковим пригніченням IRE1, а також на сублініях з сайленсінгом мРНК NAMPT, та відповідно на контрольних клітинах гліоми U87. Дослідження експресії за умов пригнічення мРНК та протеїну NAMPT проводились на немодифікованих клітинах лінії U87.

Костерін С. О.: Де були апробовані дані дисертаційної роботи?

Лузіна О.Я.: Результати досліджень було представлено на вітчизняних та міжнародних конгресах та конференціях, у тому числі на XI Парнасівській конференції та 12-тому українському біохімічному конгресі в Тернополі.

У обговоренні взяли участь:

О. Г. Мінченко – зав. відділу молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, д. б. н., член-кор., – науковий керівник:

Я вважаю, що дисертантка Ольга Ярославівна справила з такою непростю темою та складними підходами, які започатковані в нашому відділі. Що стосується фундаментального значення даної роботи, ключовим посилом є “Побічні ефекти таргетної терапії”. В цій роботі ми продемонстрували, що сайленсінг NAMPT підвищує експресію більшості досліджених онкогенів. Є роботи, які показують що хімічне пригнічення NAMPT змінює експресію близько 300 генів, проте на побічні ефекти від таргетної терапії ніхто не зосереджує увагу, тоді як на ефекти від лікарських засобів звертають увагу. Перш за все, під сумнів ставиться доцільність пошуку цих таргетних генів, так як при порушенні цілісності геному ми маємо побічні ефекти. Я хочу підкреслити, що основний пріоритет даного дослідження це виявлення побічних ефектів від таргетної терапії. Я вважаю, що Ольга Ярославівна справила з завданням та заслугоує представляти роботу на офіційному захисті.

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

Доброго дня! Це не перша робота, яку я рецензую та яка виконана під керівництвом Олександра Григоровича, і зазвичай всі роботи на цьому етапі передзахисту мають ідеальний вигляд, проте цього разу було трошки не так, нам довелось дещо попрацювати, але локдаун пішов на користь роботі, на разі вона виглядає значно краще. Я знов ж таки хочу звернути увагу на сторінки змісту, які мають відповідати сторінкам тексту. Проте це такі технічні питання, які можна вирішувати ще певний час, в мене немає жодних сумнівів що роботу треба подавати до офіційного захисту, вона є абсолютно актуальною і за темою, і за результатами.

Сьогодні я хотіла поговорити про ті питання, які в мене виникли та відповіді на які я б хотіла почути вже на захисті. Всім відомо, що онкотрансформація перепрограмує абсолютно все на генетичному, епігенетичному рівні, а також на рівні метаболізму. Всі добре розуміють, що кальцій в нас є універсальним регулятором метаболізму. Отже, не може бути так, що з йонами кальцію, з системами обміну кальцію нічого не сталося. Я дивилась літературу, є величезна кількість робіт де досліджуються абсолютно всі на сьогодні відомі учасники обміну кальцію в онкотрансформованих клітинах. Це має сенс робити, і ведуться пошуки речовин, які модулюють ці системи і на деяких з них ведуться клінічні випробування. Тобто ефектори обміну кальцію розглядаються як перспективні антипухлинні препарати. Звичайно це має сенс робити, якщо відомо, як експресовані ці системи в конкретному типі паталогій.

Отже, перше моє питання стосується експресії кальцій-транспортуючих систем в клітинах гліоми. Чому я так на цьому наголошую, тому що ми з вами поруч працюємо, і десь два тижні тому Тетяна Олександрівна доповідала результати своєї роботи, і наш відділ сьогодні має дуже потужні блокатори кальцієвої помпи плазматичної мембрани клітин гладеньких м'язів (ГМ). А для нормальних клітин, я маю на увазі астроцитів, вони дуже подібні за системами обміну кальцію в клітинах ГМ. Тому є сподівання, якщо кальцій транспортує системи, зокрема кальцієві помпи, надекспресовані в клітинах гліоми, то таке об'єднання зусиль, на мою думку, може бути досить результативним. Що в гліомах відбувається? Зменшується рівень кальцію в ЕР. Якщо він зменшується, то кудись він має подітись. В нормальних клітинах при цьому збільшується його концентрація в цитозолі. Проте, клітини гліоми пристосовуються, і вони якось зменшують рівень кальцію в цитозолі. За рахунок чого? Можливо одним з шляхів є підвищення експресії кальцієвої помпи плазматичної мембрани, яка відкачуватиме кальції з цитозолу? Отже перше питання це експресія систем обміну кальцію в клітинах гліоми та що відомо з літератури?

Друге питання. В дисертації написано, що пригнічення гліколізу стратегічний напрямок досліджень гліом. А я хочу вас запитати, чи є такі роботи, де навпаки збільшували концентрацію глюкози і до чого це приводило? Бо якщо ми збільшуємо концентрацію глюкози, то ми збільшуємо вміст АТФ у цитозолі, з цього приводу в нас також є певні міркування.

Третє питання: Мені дуже не подобається вислів "аеробний гліколіз". Ну не можу я з ним погодитись. Тому я Вас прошу дати відповідь мені на питання, що відбувається з піруватом в клітинах гліоми. Всі добре розуміють що гліколіз це анаеробний процес. Далі деякі автори пишуть, що в залежності від того, що відбувається з піруватом, або він іде до мітохондрій, або ж ні, це аеробний чи анаеробний шлях. Щодо інших онкотрансформованих клітин, не гліомних, доведено, що піруват не йде до мітохондрій. Він власне ендогенно перетворюється до молочної кислоти. Якщо це так в клітинах гліоми, то тут немає аеробного гліколізу, а є анаеробний гліколіз в умовах аеробних. Тому прошу дати мені відповідь, що відбувається з піруватом в клітинах гліоми.

Актуальність обраної теми. Дисертаційна робота Лузіної Ольги Ярославівни присвячена вивченню міжгенних взаємодій в клітинах гліоми, зокрема, ролі IRE1 в експресії нікотинамід фосфорибозилтрансферази (NAMPT). Експресія NAMPT є критичною для метаболізму та проліферації клітин гліоми. Дослідження механізмів, які забезпечують формування та ріст пухлин, є важливим для створення нових підходів антипухлинної терапії. Актуальність цього напрямку досліджень не викликає сумнівів.

Дисертаційна робота виконувалась протягом 2016–2020 рр. у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України 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.).

Дослідження рівня експресії генів протеїнів, що контролюють проліферацію, апоптоз та виживання клітин гліоми лінії U87, здійснювали за допомогою методу кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

Ольга Ярославівна вперше показала, що у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою активністю протеїнкінази та ендорибонуклеази або лише ендорибонуклеази IRE1 спостерігається зниження рівня експресії гена NAMPT у порівнянні з контрольними клітинами. Встановлено, що експресія більшості досліджених генів у клітинах гліоми лінії U87 залежить від функціональної активності сенсорно-сигнального протеїну IRE1.

Теоретичне значення отриманих результатів – подальше вивчення механізмів міжгенної взаємодії в процесі репрограмування геному за умов пригнічення активності IRE1 і NAMPT в пухлинних клітинах. Одержані у цій роботі результати є важливими як теоретична основа для подальшої розробки таргетної терапії гліом.

Дисертаційна робота викладена за класичним планом, складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів досліджень, їх обговорення, висновків та списку використаних джерел літератури, що включає 228 посилань.

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 робіт, із них 5 статей в іноземних та українських фахових наукових виданнях та 10 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конгресів і конференцій. Наукові результати дисертації висвітлені у 5 наукових публікаціях, які розкривають основний зміст дисертації.

Проте до роботи є деякі запитання:

1). На рівні завдань роботи (першого та третього) з'являються терміни «пухлино-асоційовані гени» та «пухлино-залежні». В тексті мають бути наведені тлумачення цих термінів до їх першого вживання.

2). Автор пише: «BiP є негативним регулятором трьох сенсорно-сигнальних ензимів ER та в нормі асоційований з ними. Дисоціація GRP78 відбувається тільки за появи в ER не згорнутих чи не правильно згорнутих протеїнів, забезпечуючи таким чином одночасну негативну регуляцію роботи всіх сигнальних шляхів UPR.» Проте добре відомо, що BiP є Ca^{2+} -залежним протеїном і саме зниження концентрації іонів Ca веде до порушення функціонування цього протеїну.

3). Автор пише: «NAMPT є стрес-залежним протеїном». Поясніть цей тезис.

4). Чи є протеїни, функція та експресія яких не змінюється у пухлинних клітинах якщо порівнювати з нормальними.

5). Автор пише: «В умовах нестачі кисню спостерігається підвищена активність шаперона GRP78/BiP». Про яку підвищену активність йдеться?

6). З розділу статистики видалити джерело літератури, перенести до списку цитованих джерел.

7). У підписах до Рис.3.1 немає пояснення щодо **. Аналогічні запитання до розрахунків статистичної достовірності до малюнків 3.5, 3.6, 3.11, 3.12-3.21.

8). Перевірити нумерацію рисунків у розділі 3.4.

9). Переглянути правила нумерації рисунків. Рисунки нумеруються всередині кожного розділу.

10). Рисунок 4.1 відсутній.

11). Відсутня анотація англійською мовою.

12). Перевірити відповідність сторінок змісту.

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

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

Т.О. Векліч – старший науковий співробітник відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, к. б. н. – рецензент:

Я розглянула дисертаційну роботу Ольги Ярославівни, і зараз коротенько її охарактеризую. Актуальність обраної теми. Дисертаційна робота Ольги Ярославівни є актуальним дослідженням, оскільки присвячена вивченню рівню експресії генів, що контролюють процеси проліферації у клітинах гліоми лінії U87. Відомо, що гліоми є найбільш поширеними первинними

пухлинами центральної нервової системи, а їхня стійкість до терапії та високоагресивна поведінка змушують розробляти нові стратегії протипухлинної терапії. Протеїн NAMPT відіграє ключову роль у підтримці метаболізму та проліферації пухлинних клітин, а фармакологічне пригнічення цього ензиму чинить антипухлинну дію. Проте відомі інгібітори NAMPT, такі як FK866, CHS-828 і GMX-1777, є високотоксичними. Тому необхідним є дослідження молекулярних механізмів взаємодії даного ензиму з різними сигнальними системами з метою пом'якшення побічних ефектів та підвищення ефективності комбінованої протипухлинної терапії. Все це свідчить про важливий і доцільний напрямок досліджень, обраний дисертанткою.

В огляді літератури наводяться дані стосовно сучасних уявлень про роль стресу ендоплазматичного ретикулума в рості злоякісних пухлин, значення NAMPT у регуляції процесів проліферації в пухлинах, значення гіпоксії в рості злоякісних пухлин і механізми регуляції експресії генів за гіпоксії та значення метаболізму глутаміну та глюкози в контролі процесів проліферації клітин гліоми.

Дисертаційна робота Ольги Ярославівни виконана на сучасному методичному рівні. В ній використовуються методи біохімії та молекулярної біології: культивування клітин, виділення РНК та екстрактів протеїнів з клітин, спектрофотометричне визначення концентрації і спектральних характеристик нуклеїнових кислот, синтез комплементарних ДНК методом зворотної транскрипції, методи полімеразної ланцюгової реакції, в тому числі кількісної, вестерн-блот аналіз протеїнів.

В роботі було досліджено експресію генів, що контролюють процеси проліферації, за умов сайленсінгу мРНК NAMPT та пригнічення функції сигнального протеїну IRE1 для з'ясування можливої ролі цих генів у пригніченні проліферації клітин гліоми, а також за гіпоксії і дефіциту глутаміну у середовищі. Було показано, що у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою активністю протеїнкінази та ендорибонуклеази сенсорно-сигнального протеїну IRE1 спостерігається зниження рівня експресії мРНК про-проліферативного гена *NAMPT* у порівнянні з контрольними клітинами. Встановлено, що дефіцит глутаміну впливає на рівень експресії більшості досліджених генів, що свідчить про залежну від IRE1 регуляцію метаболізму клітин гліоми і лежить в основі опосередкованого активністю IRE1 пригнічення проліферації пухлинних клітин.

Результати досліджень, які викладені в дисертації Лузіної О.Я. опубліковані у відкритому друку фахових видань у вигляді 5 статей і 10 тез доповідей на наукових конференціях.

Побудова і написання дисертації повністю відповідають вимогам ДАК. Основний науково-експериментальний матеріал викладено на 131 сторінках, ілюстровано 50 рисунками та 3 таблицями. Список цитованої літератури нараховує 228 посилань.

Слід зазначити, що дисертація написана дуже грамотно не лише з наукової, але й з орфографічної та стилістичної точки зору. При знайомстві з матеріалами дисертації виникають певні питання та побажання, які варто було б врахувати у майбутній експериментальній роботі.

1. Ви показали, що за умов пригнічення IRE1 у клітинах гліоми спостерігається різке зменшення рівня експресії NAMPT. Які молекулярні механізми цих змін?

2. За цих умов змінюється експресія багатьох інших генів. Чим можна пояснити порушення їх експресії?

3. У висновках Ви говорите про репрограмування геному. Як Ви розумієте це репрограмування?

4. Ви отримали цікаві результати по залежності гіпоксичної регуляції експресії генів від IRE1 сигнального шляху. Які молекулярні основи цієї залежності?

5. Чим можна пояснити різнонаправлений характер змін в експресії деяких генів за умов сайленсінгу NAMPT та пригнічення IRE1, хоча інтенсивність проліферації в обох випадках знижується?

6. Назву розділів не слід писати в кінці сторінки (2.4 на ст. 60, 3.4 на ст. 95). Підписи до рисунків мають іти за самим рисунком, а не на наступній сторінці (рис. 3.27, 3.44).

7. У схемах, наведених у огляді літератури, треба додати посилання на джерело.

Взагалі дисертація написана доброю науковою мовою, але потребує деякого виправлення. Деякі стилістичні та граматичні помилки відмічено у тексті. Зроблені зауваження ні в якому разі не знижують значення отриманих результатів і не впливають на загальну високу оцінку роботи. Дисертаційна робота Ольги Ярославівни є завершеним дослідженням, що має як теоретичне, так і практичне значення.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам.

Вважаю, що робота Ольги Ярославівни Лузіної “Роль IRE1 в експресії NAMPT та залежних від нього протейнів” 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.

Л.Б. Дробот – зав. від. сигнальних механізмів клітини – д. б. н., проф.:

На мою думку, до захисту потрібно добре продумати в доповіді порядок демонстрації отриманих даних. Цікаво, що в клітинах з пригніченою активністю IRE1 знижується експресія NAMPT. Наступний крок це вивчення експресії генів з пригніченою експресією NAMPT за допомогою сайленсінг-технологій. Але зазвичай, між окремими ключовими сигнальними

компонентами існує реципрокний регуляторний зв'язок. І тут варто подивитись, що ж відбувається з самим IRE1 за умов сайленсінгу NAMPT, та дослідити рівень експресії IRE1 на рівні мРНК та протеїну, ну і якщо існують такі тести, подивитись на рівні активності самого сигнального шляху, оскільки між ними існує ось такий регуляторний зв'язок. Ну і тоді використовуючи ці клітини з пригніченою експресією NAMPT, а ми гіпотетично розглядаємо, що там може бути і пригнічення сигнального шляху IRE1, дослідити рівень експресії генів, що кодують протеїни різного функціонального значення, і тоді ж вивчити, як модулюються відповіді гіпоксії та депривації глутаміну в середовищі. Я підтримую роботу.

Великий М. М. – проф., д. б. н., зав. від. біохімії вітамінів та коензимів:

Звичайно треба підтримати, зазвичай ми робимо те, що можемо в даних умовах. Але є аспект, як саме подається цей матеріал. Тут дуже важливо дисертанту розуміти даний процес. Я закликаю до того, що той, хто виходить сюди на трибуну, повинен інтерпретувати матеріал з чітких позицій. Я ще раз наголошую, що не може гліколіз чи ЦТК регулювати транскрипцію, трансляцію, клітинне сигналювання. Тобто, Ви повинні розуміти, які є молекулярні механізми регулювання транскрипції та трансляції. Треба звернути увагу, яким чином NAD регулює дані процеси, через які мішені (такі як сиртуїни, PARP, NAD – залежні транскрипційні фактори та ін.) і це треба знати. Ми неодноразово чули роботи з депривацією глутаміну, проте жодний з доповідачів не пояснив для чого глутамін і чому вивчається експресія генів саме за цих умов. От Ви кажете, NAD потрібен для гліколізу, а гліколіз регулює транскрипцію, відсутність глутаміну щось регулює. Між відсутністю глутаміну і що він регулює пуста, а потрібно наводити конкретні таргети регулювання. Я повністю підтримую роботу.

С.О. Костерін – завідувач відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, академік, д. б. н., проф. – головуючий:

Я хотів би сказати, що робота сподобалась, вона іде в руслі традиційного напрямку, над яким працює відділ Олександра Григоровича. Дисертантка має 15 робіт, з них 5 статей. Доповідь дисертантки є в цілому непоганою, проте хочу наголосити, що назва слайду повинна декларувати результат, який має науковий сенс. Незважаючи на це в нас є всі підстави підтримати цю роботу і рекомендувати її на остаточний захист.

ВИСНОВОК

**про наукову новизну, теоретичне та практичне значення
результатів дисертації Лузіної Ольги Ярославівни на тему:
«Роль IRE1 в експресії NAMPT та залежних
від нього протеїнів у клітинах гліоми»,
поданої на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії
за спеціальністю 091 «Біологія»**

1. Актуальність теми.

Дослідження молекулярних механізмів регуляції експресії генів є надзвичайно актуальним напрямком сьогодення. Гліоми є високоагресивними злоякісними пухлинами центральної нервової системи нейроепітеліального походження, що важко піддаються терапії. Швидкі темпи проліферації та активна інфільтрація клітин гліоми в оточуюче середовище ускладнюють лікування даного захворювання та робить терапію малоефективною.

В процесі злоякісної трансформації клітини перебувають під впливом стресових чинників, таких як дефіцит поживних речовин, порушення обміну кальцію, гіпоксія, оксидативний стрес. При цьому порушується протеом клітини і в люмені ендоплазматичного ретикулума накопичуються протеїни з неправильною конформацією та активується стрес ER. Це веде до запуску адаптивних внутрішньоклітинних реакцій, відомих під назвою «відповідь на неправильно згорнуті протеїни».

Стрес ER реалізується трьома сенсорно-сигнальними шляхами: IRE1, PERK та ATF6. Сенсорний протеїн IRE1 (inositol-requiring enzyme 1, ензим, залежний від інозитулу 1) активує найбільш консервативний та ключовий шлях стресу ER та володіє кіназною та ендорибонуклеазною активностями. Активація IRE1 запускає каскад реакцій, внаслідок чого активується експресія сотень генів, задіяних у відновленні гомеостазу клітини.

IRE1-залежна гілка трансдукції сигналу являється модулятором злоякісного росту, сприяє адаптації та виживанню пухлинних клітин в екстремальних умовах мікрооточення, а блокада IRE1-залежних сигнальних шляхів призводить до зниження проліферації клітин гліоми. Інгібітори протеїну IRE1 є на сьогодні потенційними протипухлинними препаратами, а молекулярні механізми, за якими IRE1 здійснює контроль над процесами проліферації потребують детального вивчення. Дослідження експресії генів, що контролюють процеси проліферації, виживання, міграції та метастазування за умов інгібування IRE1, а також за гіпоксії та дефіциту глутаміну, вкрай важливі для з'ясування молекулярних механізмів регуляції експресії даних генів та їх ролі у злоякісному рості, а також механізмів пригнічення канцерогенезу.

В багатьох типах пухлин спостерігається гіперекспресія протеїну NAMPT (фосфорибозилтрансфераза нікотинаміду), який відіграє важливу роль у процесах метаболізму, проліферації та апоптозу. Плейотропний ензим

NAMPT є одним з ключових факторів стабільності геному, контролює процеси репарації, метаболізму та енергетичного балансу клітини. NAMPT посилює ріст і виживання злоякісних пухлин, а фармакологічне пригнічення цього ензиму сповільнює проліферацію пухлин. Дослідження механізмів NAMPT – опосередкованого пригнічення росту пухлин важливі для оцінки і прогнозування наслідків таргетної терапії, а також ідентифікації потенційних мішеней для лікування та створення нових підходів боротьби з гліомами.

В даній роботі досліджувалась експресія пухлино-залежних генів, що кодуєть протеїни пов'язані з процесами проліферації, апоптозу, інвазії та метастазування та дерегуляція яких спостерігається в пухлинах багатьох типів. Вивчення експресії даних генів за умов пригнічення IRE1, а також за сайленсінгу NAMPT є надзвичайно актуальним для відкриття механізмів пухлинного росту гліом.

Мета і завдання роботи. Метою дисертаційної роботи було виявлення міжгенних взаємодій у клітинах гліоми шляхом дослідження експресії генів за умов пригнічення сигнального протеїну IRE1, а також за умов сайленсінгу мРНК NAMPT.

Для досягнення поставленої мети були сформовані наступні завдання:

1. Дослідити рівень експресії мРНК та протеїну NAMPT за умов повного та часткового пригнічення функції IRE1.
2. Визначити рівень експресії генів, що кодуєть пухлино-залежні протеїни за умови сайленсінгу мРНК NAMPT.
3. Вивчити рівень експресії генів *PERK*, *ATF6*, *DEK*, *BIRC5*, *GLO1*, *COL6A1*, *RAB5A* та *ATF3* у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченням кіназної та ендорибонуклеазної активностей IRE1.
4. Вивчити вплив гіпоксії на рівень експресії генів у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від функціональної активності сигнального протеїну IRE1.
5. Дослідити рівень експресії досліджених генів у клітинах гліоми за дефіциту глутаміну залежно від функції сигнального протеїну IRE1.

Об'єкт дослідження: експресія генів *NAMPT*, *PERK*, *ATF6*, *DEK*, *BRCA1*, *BIRC5*, *GLO1*, *COL6A1*, *RAB5A*, *ATF3*, *Ki-67*, *PCNA*, *PSAT1*, *TSPAN13*, *LIF*, *CLU*, *IGFBP3*, *IRS1*, *BNIP3*, *PER2*, *GADD45A*, *HK2*, *HOMER3*, *ADGRE5* та *GNPDA1*.

Предмет дослідження: рівень експресії генів, що контролюють процеси проліферації у клітинах гліоми лінії U87 за умов повного пригнічення функціональної активності IRE1, за умови зниження рівня мРНК і протеїну NAMPT за допомогою siRNA технології.

Методи дослідження: у даній роботі використовували методи культивування клітин, виділення РНК та екстрактів протеїнів з клітин, спектрофотометричне визначення концентрації і спектральних характеристик нуклеїнових кислот, синтез комплементарних ДНК методом зворотної транскрипції, методи полімеразної ланцюгової реакції, в тому числі кількісної,

вестерн-блот аналіз протеїнів (отримання цитозольних фракцій протеїнів з культури клітин, визначення концентрації протеїнів, електрофорез продуктів ампліфікації в агарозному гелі, протеїнів у поліакриламідному гелі, імуноблотинг), сайленсінг мРНК, методи статистичного аналізу.

2. Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше було показано, що у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою активністю протеїнкінази та ендорибонуклеази або лише ендорибонуклеази сенсорно-сигнального протеїну IRE1 спостерігається різке зниження рівня експресії про-проліферативного гена *NAMPT* у порівнянні з контрольними клітинами, що свідчить про опосередкованість цих змін саме ендорибонуклеазою IRE1.

Виявлено, що пригнічення IRE1 підвищує експресію *miR-182*, сайти зв'язування з якою були виявлені на 3'-кінцевій нетранслюючій послідовності мРНК *NAMPT*. Таким чином, IRE-залежна регуляція експресії мРНК *NAMPT* може здійснюватись на пост-транскрипційному рівні за рахунок активації мікроРНК *miR-182*.

Встановлено, що пригнічення функціональної активності сенсорно-сигнального протеїну IRE1 впливає на експресію більшості досліджених генів у клітинах гліоми лінії U87, а за сайленсінгу мРНК *NAMPT* зафіксовані протилежно спрямовані зміни експресії мРНК даних генів. Так показано, що у клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1 знижується експресія онкогенів *ATF6*, *BIRC5*, *GLO1*, *RAB5C*, *COL6A1* і *TGM2* тоді як за умов пригнічення *NAMPT* рівень експресії цих генів підвищується. Продемонстровано зниження експресії *ATF3* та *DEK* за умов пригнічення мРНК *NAMPT* та блокади функціональної активності IRE1, що свідчить про можливу причетність їх до активації анти-проліферативних механізмів в клітинах гліоми.

Продемонстровано, що сайленсінг мРНК *NAMPT* підвищує рівень експресії генів *PSAT1*, *TSPAN13*, *IGFBP3* і *IRS1* та знижується рівень експресії мРНК *Ki-67*, *PCNA*, *LIF*, *CLU*, *BNIP3* та *PER2*. Зниження рівня експресії маркера проліферації *Ki-67* та *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen) за даних умов свідчить про послаблення проліферативного потенціалу клітин гліоми.

Показано, що пригнічення функціональної активності IRE1 по-різному модифікує чутливість експресії більшості досліджених генів до умов гіпоксії, а це є важливим фактором пухлинного росту.

Виявлено, що блокада активності IRE1 модифікує вплив дефіциту глутаміну на рівень експресії більшості досліджених генів, що є одним з механізмів IRE-опосередкованого пригнічення проліферації клітин гліоми.

3. Практичне значення отриманих результатів полягає у з'ясуванні ролі NAMPT і сенсорно-сигнального протеїну IRE1 у репрограмуванні геному клітин гліоми, а також регуляції експресії пухлино-залежних генів, що кодують протеїни причетні до проліферації, апоптозу, інвазії та метастазування. Розуміння механізмів міжгенної взаємодії в процесі репрограмування геному за умов зміни рівня експресії NAMPT чи активності IRE1 у гліомах є необхідним для оцінки та прогнозування наслідків таргетної терапії та дозволяє ідентифікувати потенційні мішені для подальших досліджень та розробки нових протипухлинних препаратів.

4. Особистий внесок здобувача.

Дисертаційна робота – завершене дослідження, яке було здійснене автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2016 – 2020 р.р. Дисертанткою було самостійно здійснено аналіз літератури за темою роботи, виконано експериментальні дослідження з вивчення експресії пухлинозалежних генів за умов інгібування функціональної активності сенсорно-сигнального протеїну IRE1, в умовах гіпоксії і нестачі глутаміну, а також дослідження експресії за умови сайленсінгу мРНК NAMPT у клітинах гліоми U87. Також виконано статистичний аналіз отриманих результатів та їх узагальнення. Окремі дослідження по визначенню експресії певних генів проводились за участі наукових співробітників Мінченка Д. О., Цимбал Д.О., та Хіта О. О.; планування роботи, розробка методології, аналіз та обговорення результатів проведено за участі наукового керівника, д.б.н., проф., член-кор. НАН України Мінченка О. Г.

5. Апробація результатів дисертації.

Результати досліджень було представлено на вітчизняних та міжнародних конгресах та конференціях: International V ASTRAN/3rd Swedish-Ukrainian conference on cancer diseases, Stockholm, Sweden, 2017; Joint meeting of the 25th 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; Integrative Biology & Medicine, 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; Materials of symposium and summer school “Fundamental Principles of Cancer Biotherapy”, Kyiv, 2018, XI Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology

for Innovative Medicine», Kyiv, 2018; Young scientists conference «Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2019», Kyiv, 2019, 12-ий Український Біохімічний конгрес, Тернопіль, 2019, та «Current Problems biochemistry, cell biology and physiology», Dnipro, 2020.

6. Публікації.

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 робіт, із них 5 статей в іноземних та українських фахових наукових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, і 10 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конгресах і конференцій.

Список опублікованих праць за темою дисертації

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

1. Kharkova A.P., Garmash Y.A., Hnatiuk O.S., **Luzina O.Y.**, Danilovsky S.V., Kuznetsova A.Y., Minchenko O.H. Glutamine deprivation effect on DEK, TPD52, BRCA1, ADGRE5, LIF, GNPDA1, and COL6A1 gene expressions in IRE1 knockdown U87 glioma cells. *Biotechnol. Acta*, 2017, 10(6): 19-27. doi: 10.15407/biotech10.06.019. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів BRCA1, ADGRE5, COL6A1, обробка даних, участь в написанні статті).*

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

2. Minchenko O.H., Kharkova A.P., Hnatiuk O.S., **Luzina O.Y.**, Kryvdiuk I.V., Kuznetsova A.Y. ERN1 modifies effect of glutamine deprivation on tumor growth related factors expression in U87 glioma cells. *Ukr. Biochem. J.*, 2018, 90 (3): 49-61. doi.org/10.15407/ubj90.03.049. **Scopus** *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена PERK, ATF6, BIRC5, обробка даних).*

3. Minchenko O.H., **Luzina O.Y.**, Hnatiuk O.S., Minchenko D.O., Garmash I.A., Ratushna O.O. Expression of tumor growth related genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells: effect of hypoxia. *Ukr. Biochem. J.*, 2017, 89 (5): 40-51. doi.org/10.15407/ubj89.05.040. **Scopus** *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів COL6A1, TPD52, DEK, обробка даних, оформлення статті до публікації).*

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

4. Minchenko D.O., Tsymbal D.O., **Luzina O.Y.**, Riabovol O.O., Danilovskyi SV, Minchenko O.H. Silencing of NAMPT leads to up-regulation of insulin receptor substrate 1 gene expression in U87 glioma cells. *Endocr. Reg.*, 2020, 54 (1): 31-42. doi: 10.2478/enr-2020-0005. **Scopus** (Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів *NAMPT, IGFBP3, IRS1, PCNA, Ki-67* обробка даних та участь у написанні статті).

5. Tsymbal D.O., Minchenko D.O., Hnatiuk O.S., **Luzina O.Y.**, Garmash I.A., Minchenko O.H. Effect of hypoxia on the expression of subset proliferation related genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells. *Adv. Biol. Chem.*, 2017, 7: 195-210. doi: 10.4236/abc.2017.76014 (Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів *EIF2AK3, ATF6, CLU, TGM2, TSPAN13* обробка даних участь у написанні статті).

Тези наукових доповідей:

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

2. **Luzina O.Y.**, Hnatiuk O.S., Halkin O.V., Karbovskyi L.L. Hypoxic regulation of the expression of a subset of proliferation related genes in U87 glioma cells: effect of IRE1 inhibition. Joint Meeting 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” & 2nd 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, 89(3): 87.

3. **Luzina O.**, Minchenko D., Hnatiuk O., Riabovol O., Garmash I. Inhibition of IRE1 modifies the hypoxic regulation of proliferation related genes. *Integrative Biology & Medicine*, October 2-7, 2017, Kyiv, 2017: 47.

4. Мінченко О.Г., Ратушна О.О., Рябовол О.О., Мінченко Д.О., **Лузіна О.Я.** Молекулярні основи репрограмування метаболізму за онкологічних та метаболічних захворювань. 4-та Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, 5-6 жовтня 2017 року, Дніпро, 2017: 70-72.

5. **Luzina O.Y.**, Hnatiuk O.S., Garmash Y.A., Kharkova A.P. Effect of glutamine deprivation on the expression of *DEK, TPD52, BRCA1, ADGRE5, LIF, GNPDA1*, and *COL6A1* genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells. Young scientists conference “Modern aspects of biochemistry and biotechnology - 2018”, May 23-25, Kyiv. *Ukr. Biochem. J.*, 2018; 90(3): 124.

6. Hnatiuk O., **Luzina O.**, Minchenko D., Garmash I., Minchenko O. IRE1 inhibition modifies the expression of tumor growth related genes in glioma cells. Materials of symposium and summer school “Fundamental Principles of Cancer Biotherapy”. May 21-23, 2018, Kyiv, Ukraine. Experimental Oncology, 2018, 40(2): Conference Reports: 13.

7. **Luzina O.Y.**, Minchenko D.O., Hnatiuk O.S., Kuznetsova A.Y. Hypoxic regulation of endoplasmic reticulum stress responsive gene expressions in IRE1 knockdown glioma cells. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”, Kyiv, 2018: Ukr. Biochem. J. 2018, 90 (Special Issue): 136.

8. **Luzina O.Y.**, Tsymbal D.O., Minchenko D.O., Lebid-Biletska K.M. The effect of IRE1 knockdown and silencing of NAMPT on the expression of a subset of proliferation related genes in U87 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, 91(2): 84.

9. **Лузіна О.Я.**, Цимбал Д.О., Мінченко Д.О., Лагановська Ю.О., Мінченко О.Г. IRE1-залежний характер гіпоксичної регуляції експресії пропроліферативних генів у клітинах гліоми. 12-й Укр. біохім. конгрес, 2019. Медична та клінічна хімія, 2019, 21(3, додаток): 111-112.

10. Sliusar M.Y., Minchenko D.O., **Luzina O.Y.**, Khita O.O., Minchenko O.H. Molecular mechanisms of interaction of hypoxia with *endoplasmic reticulum stress signaling pathways*. The 5th Int. Sci. Conf. “Current Problems Biochem., Cell Biol. Physiol”, Dnipro, 1-2 October, 2020: 39-40.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертаційна робота викладена на 154 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 228 посилань. Робота містить 50 рисунків та 3 таблиці.

Характеристика особистості здобувача.

Лузіна Ольга Ярославівна, 1989 р.н., закінчила ННЦ «Інститут Біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у 2012 р., де одержала звання “магістра” за спеціальністю “біохімія”. З 2016 р Лузіна О. Я. є співробітником Інституту, а з 2016 року по 2020 являлась аспірантом відділу молекулярної біології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. Вона є працьовитим, здібним, доброзичливим, добросовісним, комунікабельним науковцем, постійно вдосконалює свій науковий рівень, користується авторитетом та повагою своїх колег.

Оцінка мови та стилю дисертації.

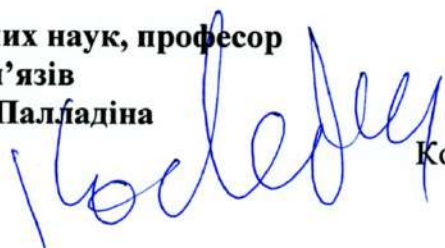
Дисертацію написано грамотною українською мовою, стиль викладення матеріалу відповідає прийнятому в науковій літературі.

Відомості щодо проведення біоетичної експертизи.

Дисертація виконана з дотриманням всіх біоетичних вимог.

Голова засідання:

**академік, доктор біологічних наук, професор
завідувач відділу біохімії м'язів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України**



Костерін С. О.

Рецензенти:

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



Бабіч Л. Г.

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



Векліч Т.О.



Підписи *Костеріна С.О., Бабіч Л.Г., Векліч Т.О.*
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
Національної академії наук України
06 2021 р.