

## **ВІДЗИВ**

офіційного опонента на дисертаційну роботу Даніловського Сергія Вікторовича «Регуляція експресії TP53 та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми лінії U87», що представлена до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

**Актуальність теми** дисертаційної роботи Даніловського Сергія Вікторовича обумовлена величезним значенням білка p53 у захисті геному клітин та порушенням роботи цього транскрипційного фактору у пухлинних клітинах. Гліоми (у роботі використана лінія U87) є досить розповсюдженими пухлинами, ефективність лікування яких, недостатньо висока. Це також є аргументом щодо актуальності обраної теми. Основним механізмом регуляції експресії гену, що кодує p53, автор вважає сигналінг від ендоплазматичного ретикулума до ядра за участі ферменту Endoplasmic Reticulum to Nucleus Signaling 1 (ERN1). Із застосування дефектних варіантів цього ферменту вдалося отримати нові дані про зміни експресії мРНК та білка як самого p53, так і його «білків-компаньйонів» та білків, що виконують антагоністичні функції. Саме співвідношення цих протеїнів і визначає долю будь-якої клітини – або вона помре апоптозом, або продовжить існування та поділ. Коли йдеться про пухлинні клітини, зрозуміло, що автор намагався із застосуванням додаткових факторів (гіпоксії, депрівациї глютаміну, глюкози) зсунути рівновагу в бік апоптозу та створити умови для самогубства пухлинних клітин.

**Наукова новизна отриманих результатів.** В останні роки детально вивчаються молекулярні механізми пригнічення росту гліоми із клітин із

порушенням сенсорно-сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума, але зв'язок із протеїном p53 та залежних від нього білків практично не вивчена.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Отримані наукові положення і висновки обґрунтовані достатнім обсягом молекулярно-генетичних та цитологічних досліджень. Висновки роботи є логічними, аргументованими та базуються на отриманих результатах.

**Якість використаних для дослідження методів, репрезентативність отриманих результатів.** Робота виконана на сучасному методичному рівні: досліди проводили на культурах клітин гліоми лінії U87, які були отримані із American Type Culture Collection (США), використані також дві сублінії клітин гліоми. Одну з них було отримано шляхом селекції клонів, стабільно трансфекованих вектором pcDNA3.1, який був використаний для створення домінант-негативних конструкцій, що містили қДНК сенсорно-сигнального ензimu ERN1 без кіназного та ендорибонуклеазного доменів (dnERN1). Для отримання другої сублінії було використано домінант-негативну конструкцію на основі вектора pcDNA3.1, що містила қДНК ERN1 з мутацією в каталітичній частині ендорибонуклеази (dnrERN1). Достатній об'єм проаналізованого матеріалу дозволили вирішити поставлені задачі, зробити логічні висновки, що витікають із проведеного дослідження.

**Практичне значення** одержаних результатів полягає в тому, що вони сприяють виявленню нових перспективних мішеней для розробки принципово інших стратегій пригнічення росту злюкісних пухлин, що

передбачають вплив на активність роботи білків, стресу ендоплазматичного ретикулума.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційну роботу виконано у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України протягом 2011-2015 років у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: «Молекулярні основи взаємодії генів в механізмах регуляції їх експресії», № ДР 0111U002234 (2011-2015 р.р.) та «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій», № ДР 0112U002624 (2012-2016 р.р.).

**Загальна характеристика роботи.** Дисертаційна робота викладена на 151 сторінці друкованого тексту та складається із “Вступу”, “Огляду літератури” (5 підрозділів), експериментальної частини, до якої входять розділи „Матеріали та методи досліджень” (3 підрозділи), „Результати досліджень” (6 підрозділів), „Обговорення результатів”, “Заключення” та “Висновки”. Робота ілюстрована 52 рисунками і закінчується списком використаних літературних джерел, що включає 251 посилання (5 кирилицею та 246 латиницею).

Розділ “Огляд літератури” охоплює велику кількість літературних даних по темі дисертаційної роботи із детальним аналізом механізмів роботи ферментів, що відповідають на стрес ендоплазматичного ретикулуму, зокрема при зложісній трансформації.

У розділі «Матеріали та методи» описано методи роботи із клітинами гліоми, виділення РНК із цих клітин, виділення плазмідних та рекомбінантних ДНК, спектрофотометричні методи визначення кількості

РНК та ДНК, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, метод синтезу комплементарних ДНК, методи зворотної транскрипції і полімеразної ланцюгової реакції, а також Вестерн-блот аналіз протеїнів та статистичний аналіз результатів.

У розділі „Результати досліджень” наведено результати дослідженнями експресії 11 генів: *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2* у клітинах глюоми лінії U87, що залежать від функціональної активності ERN1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума. Виявлені зміни в експресії досліджених генів мають корелювати зі зменшенням інтенсивності проліферації клітин із пригніченою активністю ERN1. Далі наводяться дані про вплив гіпоксії, глутаміну та глюкози на вказані параметри експресії генів та білків, що узагальнено у досить інформативних схемах.

Розділ «Аналіз та узагальнення результатів» дозволяє автору зібрати разом велику кількість фактичного матеріалу, наведеного у попередніх розділах та зробити логічні висновки, що безпосередньо випливають із результатів роботи.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та у авторефераті.** Наукові положення дисертаційної роботи зроблені ним висновки та рекомендації, що чітко сформульовані в дисертації, досить повно відображені в опублікованих ним 12 наукових працях, із яких 6 статей, що опубліковані у фахових вітчизняних та міжнародних наукових виданнях, та 6 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових з'їздів та конференцій. Основні положення дисертації знайшли ґрунтовне і логічне відображення в авторефераті, який повністю відповідає змісту дисертації.

## ЗАУВАЖЕННЯ.

1. Інтенсивність проліферації клітин визначалася, як зазначено у розділі «Матеріали та методи», за допомогою «лічильника клітин». «Число клітин вимірювали в трьох примірниках після 3 днів росту клітин». Досить дивний метод обраний автором... Не зазначено фірму виробника цього лічильника та принцип визначення кількості клітин. Дані про проліферативну активність при цьому чомусь відсутні в авторефераті. Безсумнівно, що молекулярно-генетичні методи дуже важливі і точні, однак результиручим вектором в роботі з онкологічної тематики має бути саме інтенсивність поділу, здатність клітин до проліферації.

2. Добре відомо, що p53 є індуктором апоптозу, активує транскрипцію генів, що забезпечують цей процес. Незрозуміло, чому автор роботи не вказує, які саме із досліджених генів є генами-мішенями p53? Аналіз експресії саме таких генів і був би прямим підтвердженням активної роботи цього протеїну, або, навпаки, вимкнення цього транскрипційного фактору.

3. Цитологічним результатом роботи білка p53 є розвиток апоптозу, однак в роботі немає жодних даних про кількість апоптотичних клітин, невідомо, чи вплинули генетичні модифікації Endoplasmic Reticulum to Nucleus Signaling 1 (ERN1) та розвиток цього виду запrogramованої клітинної смерті? Взагалі залишається відкритим питанням, чи спостерігалися функціональні та морфологічні наслідки цих молекулярно-генетичних маніпуляцій, в тому числі самого стресу ендоплазматичного ретикулуму?

4. Ще більш актуальним стає питання про проліферативну активність клітин, коли йдеться про спроби вплинути на ріст клітин гліоми в культурі за використання гіпоксії або глутамінової та глюкозної депривації. Це ж можливі терапевтичні засоби чи ні? Якщо так, то визначення проліферативної активності клітин мало б бути в фокусі дослідника.

## ЗАКЛЮЧЕННЯ.

Дисертаційна робота Даніловського Сергія Вікторовича „Регуляція експресії TP53 та залежних від нього протеїнів у клітинах глюоми лінії U87”, подана до спеціалізованої вченої ради Д.26.551.01 в Державній установі "Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАН України", за свою актуальністю, науковим і практичним значенням, глибиною і обсягом досліджень, змістом та оформленням повністю відповідає вимогам ДАК України про присудження наукових ступенів стосовно дисертаций на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а її виконавець – Даніловський Сергій Вікторович заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Завідувач відділу загальної та молекулярної  
патофізіології Інституту фізіології  
ім. О.О.Богомольця НАН України,  
доктор медичних наук, професор



В.С.Досенко

