

ВІДГУК

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

Дисертаційна робота Даніловського Сергія Вікторовича є закінченим науковим дослідженням, присвяченим вивченню регуляції експресії пухлинного супресора TP53 та низки залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 з виключеними ензиматичними активностями ERN1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума, та зниженою проліферацією цих клітин. Тема дисертаційної роботи Сергія Вікторовича є актуальною як з фундаментальної, так і з прикладної точки зору, оскільки на даний момент ще не з'ясовані повністю молекулярні механізми, які лежать в основі високо-агресивної поведінки клітин гліоми, і немає ефективних шляхів боротьби із гліомами.

Виясненню молекулярних механізмів, що лежать в основі порушень контролю проліферативних процесів за злоякісного росту приділяється велика увага у всьому світі. Відомо, що стрес ендоплазматичного ретикулума та гіпоксія є важливими факторами росту гліом. У зв'язку з цим, детально вивчаються можливі механізми зниження інтенсивності росту пухлин із клітин за умов пригнічення стресу ендоплазматичного ретикулума, зокрема за рахунок виключення сенсорно-сигнального ензиму ERN1. Було показано зниження процесів ангіогенезу і процесів проліферації шляхом змін в експресії низки ключових генів, що відповідають за ці процеси. Разом із тим, значення пухлинного супресора TP53, а також протеїнів, що контролюють його стабільність і функціональну активність, у цих процесах залишалася не дослідженою. Транскрипційний фактор TP53 є важливим фактором, що контролює функцію геному, змінюючи рівень експресії великої кількості генів, і його інактивація призводить до канцерогенезу.

TP53 контролює рівень експресії великої кількості генів. Стабільність TP53 та його функціональна активність залежить від багатьох факторів, які стали об'єктом дослідження Сергія Вікторовича.

Дисертаційна робота Даніловського Сергія Вікторовича написана за стандартною схемою і має 151 сторінку друкованого тексту. Вона включає в себе вступну частину, де обґрунтована актуальність цих досліджень та їх зв'язок із плановими дослідженнями відділу молекулярної біології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України, визначена мета роботи та конкретні задачі, а також наукова новизна одержаних автором результатів і їх практичне значення. У дисертації є розділ, присвячений огляду літератури, який включає 5 підрозділів, у якому Сергій Вікторович провів детальний аналіз великої кількості наявних у літературі даних по обраному напрямку наукових досліджень. Ним опрацьовано більше 250 літературних джерел, у тому числі 246 англійських. Більше того, ним чітко сформульовані ще не вирішені на даний момент питання і обґрунтована необхідність виконання своєї дисертаційної роботи.

Декілька розділів цієї дисертаційної роботи присвячені експериментальним дослідженням, зокрема „Матеріали та методи досліджень” (3 підрозділи), „Результати досліджень” (6 підрозділів), „Обговорення результатів”, “Заключення” та “Висновки”, причому робота ілюстрована 52 рисунками.

У цій дисертаційній роботі були використані сучасні біохімічні та молекулярно-біологічні методи досліджень, що повністю відповідають поставленим задачам. Це методи виділення РНК із клітин гліоми, виділення плазмідних та рекомбінантних ДНК, спектрофотометричні методи визначення кількості РНК та ДНК, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, метод синтезу комплементарних ДНК, методи зворотної транскрипції і кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, а також Вестерн-блот аналіз протеїнів та статистичний аналіз результатів.

У розділі „Результати досліджень” описані результати численних експериментальних досліджень, якими він вперше продемонстрував, що експресія *TP53*, а також залежних від нього генів (*MDM2*, *PERP*, *USP7*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2*) у клітинах гліоми лінії U87 суттєво змінюється за умов пригнічення функціональної активності ERN1, що є сенсорно-сигнальним ензимом стресу ендоплазматичного ретикулула, причому виявлені зміни в експресії цих генів чітко корелюють зі зменшенням інтенсивності проліферації клітин із пригніченою активністю ERN1. Сергій Вікторович також встановив, що зміни в експресії генів *TP53*, *MDM2* та *USP7* у клітинах гліоми за умов пригнічення ERN1 обумовлені виключенням саме кіназної, а не ендорибонуклеазної активності ензиму ERN1, а гена *PERP* – виключенням обох активностей цього сигнального ензиму. Більше того, за умов пригнічення лише ендорибонуклеазної активності ERN1 у клітинах гліоми спостерігається підвищення експресії гена *PERP* до того рівня, що має місце у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS.

Цікаві результати було отримано при дослідженні впливу гіпоксії на рівень експресії *TP53* залежних генів у клітинах гліоми як із функціонально активним ERN1, так і за умов пригнічення його активності. Так, було виявлено зниження експресії *TP53*, *USP7*, *TOPORS*, *NME6*, *RBL1*, *CSNK2B* та *ZMAT3* і збільшення *MDM2*, *TP53BP2*, *CSNK2A2* та *PERP* у клітинах гліоми за умов гіпоксії, причому ефект гіпоксії на рівень експресії генів *TP53*, *USP7*, *CSNK2A2* та *ZMAT3* знімався пригніченням функції сигнального ензиму ERN1. Сергій Вікторович також встановив, що рівень експресії мРНК *TP53* і більшості залежних від нього протеїнів збільшується за умов дефіциту глютаміну у середовищі культивування і що цей ефект значною мірою визначається функціональною активністю ERN1. У той же час, за умов дефіциту глюкози експресія генів *TP53*, *MDM2*, *USP7* та *PERP* не змінювалася у контрольних клітинах гліоми, але пригнічення ERN1 індукувало чутливість експресії генів *TP53*, *MDM2* та *PERP* до дефіциту глюкози і посилювало вплив дефіциту глюкози на експресію гена *TOPORS*,

знімаючи ефект дефіциту глюкози на експресію гена *ZMAT3*. Одержані результати розкривають молекулярні механізми участі TP53 та асоційованих з ним протеїнів в процесах проліферації клітин і апоптозу, а також механізми взаємодії гіпоксії та ішемічних чинників із ERN1, основним сенсорно-сигнальним ензимом стресу ендоплазматичного ретикулула.

У розділі “Обговорення результатів” Сергій Вікторович провів аналіз отриманих результатів по чотирьом напрямкам: 1) ролі ERN1-залежного шляху стресу ендоплазматичного ретикулула в регуляції експресії гена *TP53*; 2) ролі TP53-залежних протеїнів у регуляції експресії та біологічної активності TP53 у клітинах гліоми за умови пригнічення сигнального ензиму ERN1; 3) особливостям гіпоксичної регуляції експресії TP53-залежних генів за умов пригнічення функціональної активності сигнального ензиму ERN1 та 4) залежності експресії TP53-залежних генів за умов дефіциту глутаміну та глюкози від пригнічення функції сигнального ензиму ERN1.

Дисертація Сергія Вікторовича оформлена відповідно прийнятим вимогам до кандидатських дисертацій і зміст автореферату є ідентичним основним її положенням. Важливо відмітити, що наукові положення його дисертаційної роботи, а також зроблені ним висновки, досить повно відображені в 12 опублікованих наукових працях: 6 статей, що опубліковані у фахових вітчизняних та міжнародних наукових виданнях, і 6 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних наукових з’їздів і конференцій.

Результати експериментальних досліджень є достовірними, оскільки вони статистично опрацьовані і ретельно проаналізовані. У зв’язку з вище сказаним, принципових зауважень щодо дисертаційної роботи Сергія Вікторовича не маю.

Разом з тим, при роботі над дисертацією виникло декілька цікавих дискусійних питань, на які хотілося би почути думку Сергія Вікторовича:

1) В якій мірі досліджені гени є відповідальними за проліферацію у злоякісних пухлинах?

2) Вами проведені дослідження на клітинах гліоми, а чи можна перенести ці дані на клітини інших видів злоякісних пухлин?

3) Із досліджених вами генів найбільш вивченим є пухлинний супресор TP53, який вважають стражем геному, що контролює багато процесів у різних типах клітин. У зв'язку з цим, наскільки вагома роль TP53-залежних факторів та ензимів у протидії злоякісному росту?

Поставлені вище запитання істотно не впливають на загальну високу оцінку роботи Сергія Вікторовича, який успішно виконав всі поставлені у роботі наукові задачі. Результати цієї роботи істотно розширюють сучасні уявлення про зміни у механізмах регуляції процесів проліферації клітин гліоми за умов пригнічення ERN1, що є основним сенсорно-сигнальним ензимом стресу ендоплазматичного ретикулула. Практичне значення дисертаційної роботи Сергія Вікторовича у виявленні перспективних мішеней для розробки нових стратегій пригнічення росту гліом, а також у використанні отриманих ним результатів у програмах спецкурсів у Київському національному університеті імені Тараса Шевченка.

Вважаю, що дисертаційна робота Сергія Вікторовича Даніловського за актуальністю проблеми, науковою новизною отриманих результатів і можливістю їх практичного використання, а також достовірністю зроблених висновків повністю відповідає вимогам пп. 11, 12 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567, а її автор Даніловський Сергій Вікторович заслуговує присудження йому наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент,
завідуюча відділом біохімії Інституту кардіології
ім. академіка М.Д. Стражеска НАМН України,
доктор медичних наук, професор

 Мхитарян Л. С.

