

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу Нідосвої Заріни Манзарішівни

«Регуляція експресії гена *MGMT* людини біологічно активними речовинами комплексної терапії онкохворих», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 «Молекулярна генетика».

Робота Нідосвої Заріни Манзарішівни присвячена дослідженню особливостей регуляції активності репаративного фермента Об-метилгуанін-ДНК метилтрансферази (*MGMT*) на рівні експресії відповідного гена, що має як фундаментальне значення, наприклад, у виявленні механізмів, які регулюють процеси стабілізації геному, так і практичне – у контексті розробки нових методів комплексного лікування пацієнтів з онкологічними захворюваннями.

Актуальність теми. Пухлинні клітини, які експресують *MGMT*, є стійкими до алкілувальних сполук, які застосовуються під час хіміотерапії. Цей фермент видаляє мутагенні алкільні групи з Оксигену в шостому положенні гуаніну. У нормальних, нетрансформованих клітинах, ця функція *MGMT* є надзвичайно важливою, оскільки алкілування ДНК клітини відбувається постійно, за багатьма атомами, під впливом зовнішніх та внутрішніх факторів, а алкілування Об-гуаніну є одним із найбільш мутагенних та цитотоксичних ефектів на клітини й призводить до G-A транзицій та до формування поперечних зшивок у ДНК. *MGMT* забезпечує захист організму від негативної дії цього ушкодження. Однак, експресія, даного ферменту у клітинах пухлин обмежує ефективність алкілувальної хіміотерапії, що спрямована на їхнє знищення. Саме в цьому полягає важливість вивчення факторів, що впливають на рівень експресії *MGMT* та на активність даного ферменту в клітині.

Зв'язок роботи з державними чи галузевими науковими програмами. Дисертаційна робота виконувалась в рамках проектів: «Особливості експресії гена репаративного ензиму Об-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферази в

умовно нормальних та пухлинних клітинах” (№ держреєстрації 0108U008526, 2009-2013 рр.), “Регуляція експресії гена репаративного ензиму MGMT під впливом деяких біологічно активних речовин (гормонів, цитокінів, лектинів та ін.) у клітинах ссавців” (№ держреєстрації 0115U000355, 2014-2018 рр.) та “Вплив нових інгібіторів репаративного ензиму MGMT на ефективність алкілувальної терапії пухлин в модельних системах” (№ держреєстрації 0119U100158, 2019-2023 рр.).

Новизна дослідження та отриманих результатів. У представленій роботі за допомогою біоінформатичного аналізу та метааналізу даних вперше виявлено низку цис-регуляторних сайтів у промоторній ділянці гена MGMT людини, сайтів посттрансляційних модифікацій даного білка та білків-партнерів. Вперше виявлено нові потенційні елементи відгуку на стероїдні гормони (прогестерон, β -естрадіол і глюкокортикоїди), а також елементи відгуку на деякі інші транскрипційні фактори. Продемонстровано, що β -естрадіол активує експресію MGMT як на рівні мРНК, так і на рівні білка у досліджуваних клітинних лініях, які експресують мембранний рецептор естрогенів та відрізняються патерном експресії ядерних рецепторів. Вперше показано позитивну регуляцію експресії гена MGMT прогестероном як у клітинах MCF7 та HEp-2, що експресують ядерний рецептор, так і у клітинах 293, які його не експресують. Вперше показано інгібувальний ефект високоочищеного рекомбінантного інтерферону $\alpha 2\beta$ на вміст білка MGMT в клітинах *in vitro*. Вперше досліджено вплив низки потенційних ненуклеозидних інгібіторів білка MGMT людини на його вміст у пухлинних та умовно нормальних клітинах *in vitro*, виявлено декілька ефективних сполук.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Переважна частина експериментальних даних представленої роботи отримана та оброблена автором самостійно. Наукова співпраця з керівником роботи та іншими спеціалістами-співавторами докладно представлена у підрозділі «*Особистий внесок здобувача*».

Експериментальна частина роботи виконана із залученням сучасних методів біоінформатичного аналізу, молекулярної та клітинної біології, підбір яких повністю відповідає досягненню поставлених задач і дозволив зробити цілком обґрунтовані висновки з отриманих результатів.

Отримані результати в достатній мірі представлені якісними графіками, гістограмами, блотограмами. Результати статистично оброблені та адекватно представлені.

Висновки роботи є ємними, лаконічними і належним чином відображають отримані результати.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. Результати, викладені в дисертації, повністю представлені в друкованих працях, серед них 5 статей у фахових наукових виданнях та 8 тез у матеріалах наукових форумів, як українських, так і зарубіжних та один патент. Роботи опубліковані протягом 2011-2020 років.

Загальна характеристика роботи та її відповідність вимогам, що висуваються до кандидатських дисертацій. За своєю актуальністю, високим методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, ступенем новизни отриманих результатів і обґрунтованістю висновків представлена до захисту дисертаційна робота Нідоевої З.М. *“Регуляція експресії гена MGMT людини біологічно активними речовинами комплексної терапії онкохворих”* повністю відповідає вимогам, що висуваються до кандидатських дисертацій в Україні. Дисертація оформлена відповідно до офіційних вимог – в ній представлені всі необхідні розділи: вступ, огляд літератури, опис методів дослідження, викладення власних результатів та їхнє узагальнення, висновки, список використаної літератури. Науково-експериментальний зміст роботи викладено на 150 сторінках стандартного машинопису, робота містить 28 рисунків, 7 таблиць та 4 додатки. Розділ огляд літератури побудований на аналізі 145 літературних джерел, переважна більшість із яких сучасні. В огляді літератури викладені основні дані про об'єкт дослідження (регуляцію експресії гена MGMT людини). Літературні

дані викладені чітко, логічно, із дотриманням причинно-наслідкових зв'язків. Розділ «Огляд літератури» дає чітке уявлення про стан проблеми і важливість продовження наукових досліджень в межах, обраних автором.

Експериментальна частина роботи виконана із залученням низки сучасних методів біологічних досліджень. Серед них: культура еукаріотичних клітин, ПЛР у реальному часі, методи токсикологічних досліджень, електорофоретичне розділення білків та нуклеїнових кислот, Вестерн-блот аналіз, Аналіз нуклеотидних послідовностей *in silico*, біоінформативний аналіз потенційних сайтів посттрансляційних модифікацій MGMT людини, тощо. В цілому, докладний опис методів роботи дає змогу при необхідності відтворити умови експерименту і дозволяє зробити висновок про адекватність обраних методів. У роботі проведена статистична обробка отриманих результатів.

Результати досліджень викладені у 7-х підрозділах роботи з належною повнотою і наведенням відповідних графіків, гістограм, таблиць, блотограм.

В дисертаційній роботі були отримані результати, що розкривають механізми регуляції функціонування гену MGMT людини, а саме виявлено низку цис-регуляторних сайтів у промоторній ділянці гена MGMT людини та сайтів посттрансляційних модифікацій білка; на клітинних лініях людини *in vitro* показано, що β -естрадіол, прогестерон і інтерферон $\alpha 2\beta$ впливають на експресію MGMT. Також досліджено інгібувальну активність нових потенційних інгібіторів даного фермента. В цілому, викладення і аналіз результатів свідчить про глибоке володіння автором знаннями з широкого кола проблем, що стосуються галузі досліджень.

Робота викладена грамотною науковою мовою.

Зміст автореферату відповідає основним положенням дисертації.

При аналізі дисертаційної роботи Нідосвої З.М. принципових зауважень наукового характеру щодо викладених результатів не виникло.

Окремі зауваження і побажання стосуються переважно аналізу отриманих даних та редакційного оформлення тексту роботи:

1. Було б бажано навести більш ґрунтовні пояснення, чому були обрані саме ці лінії клітин у якості досліджуваних клітинних моделей.
2. Ніяк не пояснюється, чому для культивування клітин використовували середовище із підвищеним рівнем глюкози.
3. Не наведені дані, якою була початкова щільність клітин при пасажах клітинних ліній і як рахували кількість клітин.
4. Не надано достатнього пояснення відсутності залежності ефекту естрогенів від концентрації.
5. Не зовсім зрозуміло, чому додавання диметилсульфоксиду призводило до суттєвого зменшення кількості MGMT у клітинах.
6. Доцільно було б провести імуноцитохімічний аналіз вмісту та субклітинної локалізації MGMT у досліджуваних лініях клітин.
7. В роботі зустрічаються поодинокі синтаксичні та друкарські помилки.

Висновок. Дисертаційна робота Нідоевої З.М. є закінченою, самостійною науковою працею, в якій отримано низку нових даних, важливих як у теоретичному, так і в практичному аспекті. Результати роботи є достовірними. Всі основні положення дисертації відображені у авторефераті. Основний зміст дисертації опублікований у 14 наукових працях, з них 5 статей у фахових журналах, 1 патент та 8 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних і міжнародних наукових форумів. За своєю актуальністю, методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, новизною отриманих результатів, логічністю, обґрунтованістю висновків представлена до захисту дисертаційна робота Нідоевої Заріни Манзарішівни *“Регуляція експресії гена MGMT людини біологічно активними речовинами комплексної терапії онкохворих”*, відповідає вимогам п.9, 11, 12, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 р., (зі змінами, внесеними згідно Постанови Кабінету Міністрів України №656 від 19.08.2015 р., №1159 від 30.12.2015 р., та 567 від 27.07.2016 р.), які пред'являються до

кандидатських дисертацій, а її автор Нідоева Заріна Манзарішівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 «Молекулярна генетика».

Офіційний опонент

Доцент, кандидат біологічних наук,

доцент кафедри біоорганічної

та біологічної хімії

Національного медичного університету

імені О.О. Богомольця

Ніжерадзе Костянтин Олексійович

