

## ВІДЗИВ

### офіційного опонента

на дисертаційну роботу НІДОЄВОЇ Заріни Манзаршівни "Регуляція експресії гена *MGMT* людини біологічно активними речовинами комплексної терапії онкохворих", представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика

Системи репарації ДНК, які є важливим засобом захисту геному від різноманітних пошкоджень ДНК, водночас вступають у конфлікт з засобами антиракової терапії, спрямованими на внесення таких пошкоджень у ДНК злоякісних клітин. Зокрема, саме така ситуація складається у випадку застосування у хіміотерапії сполук, що алкілюють ДНК, дії яких перешкоджає репаративний ензим *MGMT* (Об-метилгуанін-ДНК-метилтрансфераза). Дисертаційна робота З. М. Нідоевої присвячена дослідженню впливу низки біологічно активних сполук на експресію гена *MGMT*, а також аналізу системи регуляції експресії цього гена, пошуку нових потенційних сайтів посттрансляційних модифікацій ферменту і його нових інгібіторів. Оскільки, з одного боку, алкілувальні сполуки широко використовуються у протипухлинній терапії, а з іншого – питання щодо механізмів регуляції гена *MGMT* залишаються недостатньо з'ясованими, тему дисертаційної роботи слід безперечно визнати **актуальною** як у фундаментальному, так і у прикладному аспектах.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Дисертація, що побудована за загальноприйнятою схемою, містить 150 сторінок (включаючи 4 додатки), ілюстрована 28 рисунками і 7 таблицями, список використаних джерел містить 145 посилань. В цілому дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 14 публікацій, в тому числі 1 патент і 5 статей у вітчизняних фахових наукових журналах, 2 з яких входять до наукометричної бази даних Scopus. Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо механізмів репарації ДНК, властивостей білка MGMT і регуляції експресії його гена, впливу гормональних препаратів та інших біологічно активних сполук на цю експресію є стислим, але змістовним – таким, що демонструє високий рівень теоретичної підготовки автора.

У роботі використано широкий набір сучасних методів молекулярної біології і генетики, описаних у Розділі 2: культивування клітин *in vitro*, оцінка життєздатності клітин за допомогою МТТ-тесту, полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі, різні варіанти електрофорезу, вестерн-блотинг, методи біоінформатики та інші. Загальна висока якість проведених експериментів і біоінформатичного аналізу не викликає сумніву.

Робота З. М. Нідоевої мала на меті з'ясувати вплив стероїдних гормонів ( $\beta$ -естрадіолу і прогестерону) та інтерферону  $\alpha 2\beta$  на експресію гена *MGMT* у культивованих клітинах людини, а також проаналізувати промоторну ділянку гена *MGMT*, знайти нові потенційні сайти посттрансляційних модифікацій білка MGMT і протестувати його нові потенційні інгібітори. Отже, у роботі здійснено поєднання біоінформатичних і експериментальних підходів. Отримані результати можна розділити на чотири змістовні блоки, представлені у семи підрозділах розділу 3.

Підрозділ 3.1 присвячено біоінформатичному аналізу промоторної ділянки гена *MGMT* з метою пошуку регуляторних *cis*-елементів, здатних



відповідати на дію гормонів. Автору вдалося детектувати низку таких елементів, що являють собою сайти зв'язування з рецепторами стероїдних та тиреоїдних гормонів, вітаміну D, ретиноевої кислоти, ретиноїду X, активації проліферації пероксисом. Оскільки серед знайдених елементів є також вже відомі сайти зв'язування з транскрипційним факторами, якість проведеного аналізу не викликає сумніву.

Підрозділи 3.3–3.5 присвячено експериментальному дослідженню впливу стероїдних гормонів на експресію гена *MGMT* на рівнях мРНК (полімеразна ланцюгова реакція) і білка (вестерн-блотинг), а також впливу інтерферону  $\alpha 2\beta$  на рівень білка *MGMT*. При цьому на підготовчому етапі цієї частини роботи (підрозділ 3.2) було з'ясовано, які комбінації рецепторів стероїдних гормонів присутні у досліджуваних клітинах різних типів, обґрунтовано використані далі концентрації стероїдних гормонів та продемонстровано відсутність цитотоксичного впливу гормонів на досліджувані клітини. Далі у цій частині роботи продемонстровано позитивну регуляцію експресії *MGMT* (як на рівні мРНК, так і на рівні білка)  $\beta$ -естрадіолом і прогестероном. Цікавим результатом слід визнати встановлену автором важливу роль мембранного рецептору другого гормону у такій регуляції. У останньому підрозділі цієї частини роботи представлено результати, які свідчать про індуковане інтерфероном  $\alpha 2\beta$  зниження кількості білка *MGMT*, причому цей ефект був більш вираженим у клітинах пухлинного походження. На думку автора, цей результат дозволяє пояснити такий вплив інтерферону інгібуванням транскрипційного фактору NF- $\kappa$ B. Загалом, ця частина роботи представляється найбільш вагомим здобутком автора.

У підрозділі 3.6 автор повертається до біоінформатичного аналізу – здійснює пошук можливих сайтів посттрансляційних модифікацій білка

MGMT. Той факт, що крім нових таких сайтів автор знайшла і всі відомі сайти модифікацій не стільки "інтригує" (за висловом автора), скільки вказує на те, що проведений аналіз заслуговує на подальшу експериментальну перевірку отриманих результатів.

Підрозділ 3.7 присвячено тестуванню низки нових синтетичних сполук на здатність знижувати кількість білка MGMT у клітинах. Не зважаючи на те, що жодна з цих сполук не виявилась занадто ефективною у порівнянні з відомим інгібітором MGMT, кілька сполук можуть розглядатись як основа для подальшого дизайну таких інгібіторів.

У Розділі 4, який присвячено обговоренню отриманих результатів, автор, аналізуючи їх у загальному контексті даних інших дослідників, окреслює напрямки подальших досліджень і обґрунтовує гіпотетичний молекулярний механізм пригнічення експресії MGMT інтерфероном  $\alpha 2\beta$ .

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи З. М. Нідоевої полягає в тому, що в ній отримані нові результати щодо шляхів регуляції експресії гена MGMT, продукт якого залучений до прямої репарації ДНК, і можливих шляхів впливу на рівень цієї експресії з метою її пригнічення при антираковій терапії. Отримані результати будуть сприяти пошуку нових терапевтичних антиканцерогенних засобів. Наведені у дисертації результати і висновки знайдуть застосування у наукових дослідженнях у галузі молекулярної біології і генетики, а також у практичних розробках, що проводяться в академічних, освітніх та медичних установах, які працюють над вивченням систем репарації ДНК і пошуком нових підходів у лікуванні онкологічних захворювань.

Використання сучасних експериментальних методів, застосування експериментальних підходів, що доповнюють один одного, узгодження отриманих результатів з існуючими експериментальними даними і



висновками інших авторів дозволяють констатувати достовірність експериментальних результатів та обґрунтованість наукових висновків.

Загалом, дисертація демонструє належний рівень кваліфікації автора – володіння сучасними методами, здатності аналізувати свої результати та узагальнювати їх. Разом з тим, до дисертаційної роботи З. М. Нідосвої виникли наступні зауваження та запитання.

1. Не зовсім вдалим виглядає представлення результатів біоінформатичного пошуку регуляторних *cis*-елементів у промоторі гена *MGMT* (рис. 3.1–3.3, табл.3.1). По-перше, було б краще зобразити ці елементи стрілками, які б відображали напрям послідовностей відносно кодуєчого ланцюга, а не просто зазначити зони у межах двох ланцюгів – зрозуміло, що саме по послідовностях двох ланцюгів проводився пошук, але сайт зв'язування транскрипційного фактора вочевидь формується обома ланцюгами ДНК. По-друге, слід було б пронумерувати позиції у межах дослідженої промоторної ділянки відносно старту транскрипції, а не відносно початку фрагменту, що аналізувався.

2. Не зовсім зрозуміло, що автор має на увазі, коли пише, що при дії на свої мембранні рецептори "естрогени можуть діяти значно швидше, оминаючи етап регуляції транскрипції" (стор. 82). Адже кінцевими мішенями гормонального сигналу, що діє на мембранний рецептор, також є транскрипційні фактори.

3. Виникає враження, що на деяких рисунках не позначено всі статистично достовірні відмінності. Невже, наприклад, стовпчик при 100 нмоль/л на рис. 3.8б недостовірно відрізняється від контролю?

4. Дивує заява про визначення гліцину у позиції 3 як можливого сайту ацетилювання (стор. 95): що, власне, може піддаватись ацетилюванню у гліцині, якщо цей залишок не є N-кінцевим?

Наведені зауваження і запитання жодним чином не впливають на загальну *позитивну* оцінку розглянутої роботи.

**Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій.** Дисертаційна робота Нідоевої Заріни Манзаршівни "Регуляція експресії гена *MGMT* людини біологічно активними речовинами комплексної терапії онкохворих" є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів, глибиною розкриття поставлених проблем, логічністю і обґрунтованістю висновків дисертація повністю відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, які висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент,  
доктор біологічних наук,  
професор кафедри загальної та медичної генетики  
ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського  
національного університету імені Тараса Шевченка

А. В. Сиволоб

Підпис проф. А. В. Сиволоба засвідчую



Жаремко О.У.

Заст. директора ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка