

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Самойленко Олени**

Анатоліївни

**«МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ МОДИФІКАЦІЇ
ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ОРНІТИНДЕКАРБОКСИЛАЗИ ПРИ
ПУХЛИННОМУ ПРОЦЕСІ»,** подану на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.01.07 – онкологія

1. **Актуальність теми дисертації.** Дисертаційна робота О.А.Самойленко присвячена вирішенню актуальної наукової проблеми, пов'язаної з визначенням молекулярно-біологічних особливостей регуляції функціонального стану орнітиндекарбоксилази при пухлинному рості за впливу синтетичних інгібіторів ензиму.

Відомо, що одним із важливих регуляторів пухлиноутворення є орнітиндекарбоксилаза (ОДК) – фермент, що задіяний в каталізі початкового етапу біосинтезу поліамінів (ПА). Поліаміни важливі компоненти проліферації як нормальних так і злоякісно трансформованих клітин. Тому, підвищена активність ОДК асоційована з посиленою проліферацією пухлинних клітин, неангіогенезом і зниженням ефективності традиційної хіміотерапії розглядається як можливий протипухлинний компонент. Насьогодні, у лікуванні онкологічних хворих активно вивчаються інгібітори різних класів як природнього, так і синтетичного походження, здатні пригнічувати активність ОДК. Проте, після відміни інгібіторів, компенсаторні механізми адаптивного характеру щодо активності орнітиндекарбоксилази відновлюють її дію, що і спричиняє активацію проліферації злоякісно трансформованих клітин. Тому актуальним постає питання щодо механізмів пригнічення активності ОДК специфічними і неспецифічними інгібіторами з метою пролонгації антипроліферативних процесів у випадку відміни дії інгібіторів ОДК. Мало вивченими і фрагментарними є епігенетичні та сигнальні чинники, які впливають на

експресію гена орнітиндекарбоксилази (*odc1*), його транскрипційну активацію та пригнічення. Розуміння механізмів молекулярно-біологічної модифікації функціонального стану ОДК з використанням інгібіторів ОДК, може сприяти ідентифікації ключових механізмів регуляції обміну ПА, що створить теоретичне підґрунтя для визначення потенційних ефектів терапії інгібіторами ОДК.

Отже, роль молекулярно-біологічних механізмів в регуляції функціонального стану ОДК за пухлинного росту під впливом інгібіторів ензиму є метою та предметом даного дослідження.

У дисертаційній роботі Самойленко О.А. представлені результати експериментальних досліджень щодо впливу низки синтетичних інгібіторів ОДК на перебіг асцитних та солідних експериментальних пухлин різного гістогенезу з урахуванням активності та вмісту ензиму, експресії білків та метилювання генів, задіяних у регуляції ОДК у пухлинних клітинах та визначено ключові епігенетичні фактори модифікації функціонального стану ензиму, що опосередковують протипухлинний ефект застосованих сполук.

Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України за темами: «Дослідження молекулярних механізмів протипухлинної дії природних поліфенолів, що пов'язані з їх впливом на метаболізм поліамінів» (2006-2008 рр., державний реєстраційний № 0105U005559.), «Дослідити характер метилювання ДНК в пухлинних клітинах за умов блокування синтезу поліамінів» (2010-2012 рр., державний реєстраційний № 0109U007154), «Особливості метаболізму аргініну та поліамінів за умов впливу модуляторів їх обміну при пухлинному рості» (2013-2015 рр., державний реєстраційний № 0112U004715). Робота підтримана фондом УНТЦ – грант 4894 «Development of nanotechnology of nanoplant composites and investigation of their antitumor and antioxidant activities» (2011-2013 pp.).

2. **Наукова новизна роботи** полягає у ідентифікації ключових епігенетичних механізмів модифікації функціонального стану ОДК у пухлинних клітинах за умов впливу низки синтетичних інгібіторів ензиму: нораргініну, α -дифторметилорнітину (ДФМО), полігексаметиленгуанідину (ПМГ) та метилгліоксаль-біс-гуанілгідрозон (МГБГ).

Розширено фундаментальні знання щодо низки молекулярно-біологічних механізмів екзогенного інгібування вмісту та активності ОДК при пухлинному рості.

В дисертаційному дослідженні вперше показано, що протипухлинна дія інгібіторів ОДК реалізується шляхом гіперметилування генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *smox*, *sat1*, *amd1*, що супроводжується зниженням активності ензиму та асоціюється з гальмуванням росту пухлин; зміни співвідношення сигнальних білків (p50, p65, c-Мус, p53, Bcl-xL), що модулюють транскрипційну активність *odc1*; активації РНКаз, як складової супресії трансляції ОДК.

Також доведено, що поєднаний вплив інгібіторів ДФМО та нораргініну формує ефективну епігенетичну сигнатуру, яка забезпечує значне пригнічення експресії та активності ОДК і вагомий протипухлинний ефект порівняно із застосуванням інших досліджуваних сполук.

Вперше на основі результатів багатофакторного регресійного аналізу визначено гени, статус метилування яких є незалежним епігенетичним чинником, що у сукупності впливає на характер модифікації функціонального стану ОДК та перебіг пухлинного процесу за умов сумісного застосування ДФМО та нораргініну. Ідентифіковано патерн універсальних (*odc1*, *smox*) та модель-специфічних (*oaz1*, *sat1*, *amd1*, *azin1*) генів, рівень метилування яких регулює активність та вміст ОДК за умов комбінованої дії інгібіторів ДФМО та нораргініну.

3. **Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.**

Обґрунтовано доцільність використання комплексу синтетичних інгібіторів орнітиндекарбоксилази як ефективних засобів зниження активності

ферменту, що супроводжується пригніченням пухлинного росту та зменшенням метастазування. Отримані результати експериментальних досліджень можуть бути використані для розробки підходів до підвищення ефективності прогнозування перебігу онкологічних захворювань і вдосконалення терапевтичних підходів шляхом розробки мішень-орієнтованих стратегій лікування, спрямованих на ОДК як ключову молекулярну мішень обміну ПА.

4. Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертанткою проведено експериментальне дослідження з використанням сучасних методів експериментальної онкології, молекулярної біології з оцінки рівня експресії орнітиндекарбоксилази за впливу низки синтетичних інгібіторів ензиму. Отримані результати проаналізовано за допомогою сучасних статистичних методів обробки даних. Використані методи дослідження повністю відповідають меті, завданням дисертації та сучасним вимогам для підтвердження наукових досліджень. Отриманий матеріал базується на фактичних даних, що відповідають первинній документації і забезпечують вірогідність отриманих даних, зроблені висновки відображають поставлені завдання дисертаційної роботи.

5. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому та ідентичності змісту автореферату й основних положень дисертації. Дисертацію побудовано за традиційним планом. Вона складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи досліджень», чотирьох розділів результатів власних досліджень, розділу «Узагальнення та обговорення результатів», висновків та списку використаних джерел, який налічує 205 посилання, з них 9 кирилицею. Роботу ілюстровано 37 рисунками та 17 таблицями. Роботу викладено на 180 сторінках комп'ютерного тексту.

В **Анотації** наведено основні результати дисертаційного дослідження, обґрунтовано мету, завдання та основні висновки, що відповідають поставленим завданням. На основі результатів багатофакторного регресійного аналізу доведено, що рівні метилювання генів *odc1* та *smox* у пухлинних клітинах є ключовими епігенетичними факторами, що впливають на модифікацію функціонального стану ОДК і як наслідок обумовлюють протипухлинний ефект інгібіторів ОДК. При поєднаному застосуванні ДФМО та нораргініну рівні метилювання генів *odc1*, *smox* незалежно корелюють з рівнями активності ОДК у пухлинних клітинах карциноми легені Льюїс. Визначено основні ключові слова дисертаційного дослідження. Після анотації наведено **Список публікацій здобувачки**, який включає 8 статей із них 4 цитуються в наукометричній базі Scopus, 1 патент на корисну модель та 8 тез у збірках наукових конференцій та з'їздів.

У **Вступі** обґрунтовано актуальність теми; зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами; мета і задачі дослідження; дано визначення об'єкта, предмета та методів дослідження; викладено наукова новизна та практичне значення отриманих результатів; наведено дані про особистий внесок здобувача, апробацію результатів дисертації; публікації, а також про структуру та обсяг дисертації.

Розділ 1 «Огляд літератури» складається з 4 підрозділів. У **підрозділі 1.1** надано загальну характеристика структури та біологічних функцій орнітиндекарбоксилази, яка є ключовим ферментом у метаболізмі ПА, що каталізує перетворення орнітину на путресцин. Описано механізми регуляції ОДК, в яких задіяно декілька шляхів: *транскрипційний рівень*, де ген *odc1* активується під дією онкогенів факторів росту та умов гіпоксії *посттранскрипційний рівень*, при якому мікроРНК, пригнічують експресію *odc1*; однак у пухлинах відзначається порушення їхнього функціонування *посттрансляційний рівень*. Деградація ОДК здійснюється за участю білка-інгібітора OAZ (ОДК антизим), який індукується високими рівнями ПА *епігенетичний рівень*. Метилювання промотору *odc1* є механізмом його

глушення у нормальних тканинах, але у багатьох пухлинах, зокрема карциномі Ерліха, відбувається деметилювання й активація експресії *стрес-індукована регуляція*.

У **підрозділі 1.2** обгрунтовано роль орнітиндекарбоксилази у пухлинному процесі, де детально описано роль представлених в підрозділі 1.1 механізмів регуляції ОДК. Вказується, що підвищена активність ОДК є характерною ознакою багатьох злоякісних новоутворень і асоційована з агресивним перебігом пухлин, активацією ангиогенезу, формуванням імунодепресивного мікрооточення та розвитком резистентності до терапії, що робить цей фермент важливою мішенню для протипухлинного впливу.

Згідно аналізу даних літератури, автором підтверджується, що основним механізмом активації гена *odc1* у пухлинах є транскрипційна активація онкогенами. Зокрема, добре відомо, що с-Мус безпосередньо зв'язується з E-box елементами промотору *odc1* і стимулює його експресію. **Підрозділ 1.3** характеризує ОДК як молекулу-мішень протипухлинної терапії як сучасний підхід до лікування онкологічних захворювань, що полягає у вибіркового впливі на специфічні молекули, залучені до росту, виживання, ангиогенезу або метастазування пухлинних клітин. На відміну від традиційної хіміотерапії, яка вражає як пухлинні, так і здорові клітини, таргетні препарати мають вибірккову дію, що знижує загальну токсичність та підвищує ефективність лікування. **Підрозділ 1.4** присвячено механізмам ендогенної регуляції орнітиндекарбоксилази при пухлинному рості, в якому детально описано комунікативні молекули з якими асоційовано механізми регуляції активності ОДК.

Підрозділ 1.5 наводить сучасні інгібітори ОДК, які розділені на прямі та непрямі інгібітори. Щодо останніх наведено ряд молекул, які опосередковано іншими мішенями можуть впливати на активність ОДК.

У підсумковому підрозділі Огляду літератури **1.6** наводяться епігенетичні механізми регуляції ОДК, які є важливими як в прогресії так і регресії пухлинних клітин

В представленому списку літературних посилань представлено більше 32 відсотків джерел, що датовані в останні 5 років. Це вказує, що зацікавленість наукової спільноти у ролі орнітиндекарбоксилази в пухлинному рості зросла, тим паче, що даний фермент може як підсилювати пухлинний ріст так і його уповільнювати. Саме останнє і стало предметом представленого дослідження, до якого аналізуючи світові тренди логічно підводить здобувачка в кінці розділу Огляд літератури. Варто відмітити, що було звернуто увагу на можливість модифікації активності ОДК опосередковано впливом на ПА з використанням інгібіторів штучного походження.

Отже, виходячи з аналізу літературних даних здобувачкою стверджується, що «ОДК є важливою мішенню для протипухлинної терапії завдяки своїй ролі в синтезі ПА, які підтримують клітинний гомеостаз, життєздатність та проліферацію пухлинних клітин, а інгібітори ОДК і стратегії, що націлені на регуляцію обміну ПА, особливо в поєднанні з епігенетичною модифікацією, відкривають широкі можливості для підвищення ефективності та персоналізації лікування злоякісних новоутворень»

Незважаючи на високий рівень та критичний аналіз наведеного літературного огляду, слід зазначити деякі недоліки.

Зокрема:

- вказуючи на сучасні підходи регуляції активності ОДК за пухлинного росту варто було б описати механізми впливу на активність ОДК за класичними схемами терапії (доксорубіцин, паклітаксель, цисплатин);

- і яка Ваша думка щодо ролі ОДК та пов'язаних з ферментом шляхів регуляції її активності за виникнення резистентності до класичних протипухлинних хіміопрепаратів

В цілому, огляд літературних даних свідчить про ґрунтовні знання автором сучасного стану в обраній галузі досліджень, критичне відношення до опублікованих результатів, здатність виокремлювати та узагальнювати

головне з масиву розрізнених літературних відомостей, чітко викласти стан та перспективи власного дослідження в рамках дисертаційної роботи.

Розділ 2 «Матеріали та методи досліджень» представлено 10 підрозділами, де наведено експериментальні моделі, методичні підходи та схеми досліджень, зазначено біоетичні норми та принципи проведення експериментальних досліджень на індукованих та перещеплених моделях пухлинного росту. Також наведено методи молекулярно-біологічних методів досліджень експресії генів ОДК: виділення ДНК, аналіз метилування генів ферментів регуляції ОДК (*odc1*, *oaz1*, *azin1*, *sat1*, *smox*, *amd1*) методом ПЛР у реальному часі (RT-PCR), візуалізації ОДК методами вестерн-блот аналізу та гістологічного аналізу тканин за впливу синтетичних інгібіторів-модифікаторів активності ферменту. Автором детально представлено схеми експериментів, групи тварин, які було використано в експериментальних моделях. Детально описано статистичну обробку отриманих результатів дослідження з використанням програмного забезпечення Statistica (v.8) та MS Excel. Для оцінки достовірності відмінностей між групами використовували t-критерій Стьюдента. Ключові гени модифікації функціонального стану ОДК за дії інгібіторів ензиму визначали за допомогою кореляційного аналізу та багатофакторного лінійного регресійного аналізу.

При аналізі даного розділу виникли деякі зауваження:

- поясніть, з яких міркувань ви виходили при виборі інгібіторів ОДК, які були застосовані в дослідженні на різних штаммах перещеплюваних моделей пухлинного росту?

- також щодо інгібіторів варто було б описати більш детально їх походження: це комерційні препарати, новосинтезовані, тощо?

- до дозування також є питання: що передувало вибору застосованих концентрацій цих інгібіторів? І чи проводились в експериментах in silico підбір інгібуючої концентрації для ОДК (IK50)?

Результати власних досліджень представлені 5 розділами.

В **розділі 3** обговорюються питання інгібування синтетичними інгібіторами активності ОДК.

В даному розділі наведено переконливі дані, що найбільш ефективними щодо зменшення рівнів активності та вмісту ОДК у пухлинних клітинах виявилися наступні поєднання синтетичних інгібіторів ензиму: ДФМО та нораргініну, а також ДФМО у комбінації з нораргініном і МГБГ. Ці дані підтверджено для солідних пухлин як рівнем росту первинної пухлини так і гальмуванням метастазування, а для лімфолейкозів пригніченням проліферації пухлин.

Хотілося почути деякі уточнення:

чи визначали Ви за всіх варіантів впливу інгібіторів виживаність експериментальних тварин?

як на Вашу думку, чому саме поєднання ДФМО та нораргініну продемонструвало найстійкішу протипухлинну дію?

Розділ 4 присвячено визначенню вмісту білків, залучених до регуляції ОДК, у тканині солідних та асцитних перещеплюваних пухлин за умов дії інгібіторів ОДК. Було досліджено рівень низки транскрипційних факторів, залучених в регуляцію активності ОДК. Суттєвими регуляторними білками активності ОДК є субодиниці p50 та p65 фактору транскрипції NF-κB, а також білки p53, c-Myc, Bcl-xL. Порівняльний аналіз виявив модель-специфічні відмінності сигнальної відповіді досліджених регуляторних білків в залежності від солідних і асцитних пухлин. Наприклад, у L1210 спостерігається узгоджена регуляція (зменшення активаторів та активація супресора p53), яка забезпечує більш ефективне зниження вмісту ОДК і гальмування росту пухлини. У P388 сигнальна відповідь є менш узгодженою, що знижує чутливість до інгібіторів, попри активацію p53.

До даного розділу виникло незначне уточнення:

як можете пояснити феномен різної регуляції активності ОДК вищенаведеними транскрипційними факторами в солідних і асцитних пухлинах?

Розділ 5 присвячено важливій проблемі зміни активності генів за їх метилювання. Встановлено як спільні риси епігенетичної дії різних інгібіторів на гени-регулятори ОДК, так і відмінності у механізмах реалізації їхнього ефекту за метилювання, що імовірніше за все пов'язано з походженням експериментальних пухлин. В проведеному кореляційному аналізі в матеріалах **розділу 6** розглядаються ключові епігенетичні чинники екзогенної регуляції орнітиндекарбоксилази у пухлинних клітинах. Автором за даними досліджень важлива роль відводиться метилюванню *odc1* як провідному епігенетичному фактору регуляції активності ОДК як у клітинах КЛЛ, так і в L1210. Найбільш виражений ефект зафіксовано за поєднаної дії ДФМО та нораргініну, де показано, що метилювання *odc1* обернено корелює з активністю та вмістом ОДК ($\beta = -0,41..-0,52$; $p < 0,001$) і асоціюється зі зменшенням об'єму пухлини та метастазів у КЛЛ, а також зменшенням кількості пухлинних клітин у L1210. Багатофакторний регресійний аналіз підтвердив, що комбінована дія ДФМО та нораргініну реалізує подвійний епігенетичний блок, а саме – пригнічення *odc1* знижує біосинтез ПА, метилювання *stox* обмежує їхній катаболізм та утворення сигнальних метаболітів. Це створює “подвійний бар'єр” для проліферації, ангіогенезу та метастазування пухлин.

У підсумковому **розділі 7** Аналіз та узагальнення результатів доводиться, що ефективність інгібіторів ОДК залежить від комплексного впливу на сигнальні каскади та епігенетичний профіль пухлинних клітин. В даному розділі автор піддає детальному та критичному аналізу результати власних досліджень, аналізує їх із практичних точок зору та в порівнянні з даними літератури, висловлює власні припущення щодо протипухлинної дії синтетичних інгібіторів, направлених на пригнічення активності ОДК властивостей карбендазиму. Так, комбінована терапія ДФМО з нораргініном

демонструє синергічний ефект, стабільно знижуючи активність, або вміст ферменту та коригуючи протилежні епігенетичні реакції, що спостерігаються при монотерапії. Ці результати підтверджують перспективність таргетної терапії, що враховує епігенетичні особливості пухлин.

Наведені **висновки** відповідають меті та завданням, поставленим автором, проте дещо переобтяжені цифрами.

Перелік використаних джерел літератури містить 205 посилань українською та іноземними мовами, третина яких опублікована в останні 5 років.

Таким чином, дисертація Самойленко Олени Анатоліївни «Молекулярно-біологічні механізми модифікації функціонального стану орнітиндекарбоксилази при пухлинному процесі», подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.01.07 – онкологія є завершеною науковою роботою. Основні положення та висновки дисертації повністю викладені в авторефераті.

6. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях.

Автором проведено висвітлення матеріалів роботи на вітчизняних та міжнародних тематичних форумах та з'їздах. Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у 8 статтях із яких 4 цитуються в наукометричних базах (Google Scholar, Index Copernicus, PubMed/Medline, SCOPUS), 1 патенті на корисну модель та 8 тезах у збірках наукових конференцій та з'їздів.

При рецензуванні опублікованих статей встановлено, що вони мають необхідні елементи в своїй структурі і містять постановку загальної проблеми та її зв'язок із важливими науковими та практичними завданнями, аналіз останніх досліджень, в яких започатковано розв'язання даної проблеми, на які спирається автор. Інтерпретація отриманих даних, основні положення, що виносяться на захист, та висновки належать автору.

Всі публікації повністю відображають результати та суть дослідження, що надано у основних розділах дисертації.

7. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту і оформлення.

За позитивної оцінки, проведеної автором роботи можна відзначити наявність деяких загальних недоліків дисертації, таких як присутність в тексті дисертації в великій кількості граматичних та орфографічних помилок, русизмів, описок, невдалих перекладів з англійської мови та підписів до рисунків.

Більшість із недоліків та запитань було прокоментовано при аналізі розділів дисертаційної роботи, тому не вважаю за доцільне зупинятись на цих питаннях та зауваженнях повторно.

Однак наведені недоліки та зауваження не знижують загального позитивного враження про роботу і дисертація Самойленко Олени Анатоліївни «Молекулярно-біологічні механізми модифікації функціонального стану орнітиндекарбоксилази при пухлинному процесі», в цілому є завершеним, актуальним, самостійним дослідженням, виконаним на сучасному науковому рівні, характеризується новизною одержаних експериментальних даних і достовірністю та відповідністю висновків поставленим завданням. За обсягом і рівнем виконаних досліджень, їх викладом, отриманими практичними результатами, оформленням та ілюстрованістю дисертаційна робота заслуговує позитивної оцінки. Автореферат дисертації достатньо повно та адекватно висвітлює її зміст.

8. Відповідність дисертації встановленим вимогам. Дисертаційна робота Самойленко Олени Анатоліївни «Молекулярно-біологічні механізми модифікації функціонального стану орнітиндекарбоксилази при пухлинному процесі», подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.01.07 – онкологія, є закінченим науковим дослідженням. Робота відповідає вимогам п. 9, 11, 13 «Порядку присудження наукових

ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 (зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України №656 від 19.08.2015), а здобувач Самойленко Олена Анатоліївна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 14.01.07– онкологія.

Професор кафедри екології та зоології
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
д.б.н., проф.



Людмила ГАРМАНЧУК

