

**РЕФЕРАТ**  
**циклу наукових праць**  
**“РОЛЬ СТРЕСУ ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМА В**  
**РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ, ЇХ ПРОФІЛАКТИЦІ ТА**  
**ЛІКУВАННІ”**

**Вілецька Юлія Миколаївна, Хіта Олена Олександрівна**

Надзвичайно актуальним напрямком сьогодення є дослідження біохімічних та молекулярних механізмів регуляції патологічних станів організму, зокрема на рівні експресії генів. Ожиріння з його метаболічними ускладненнями та онкологічні захворювання є поширеними захворюваннями сучасності, що потребують детальних досліджень та розробки нових перспективних методів діагностики, профілактики та лікування цих патологій. Дані патологічні стани тісно пов'язані з розвитком стресу ендоплазматичного ретикулума, який є необхідним фактором їх розвитку. На даний момент головна увага дослідників зосереджена на вивченні детальних механізмів регуляції експресії генів, що контролюють процеси проліферації, ангіогенезу, адипогенезу, апоптозу, функцію мітохондрій та низку інших процесів, приймають участь в інтегральній регуляції метаболізму.

*Мета роботи:* дослідження залежних від стресу ендоплазматичного ретикулума механізмів, що лежать в основі ожиріння з його метаболічними ускладненнями та онкогенезу, шляхом вивчення експресії генів, що кодують ключові фактори проліферації і ангіогенезу, а також пухлинних супресорів, онкогенів та інших факторів, які контролюють функцію мітохондрій, і їх залежність від активності сигнального протеїну IRE1.

**ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Встановлено, що за умов ожиріння у підшкірній жировій тканині чоловіків пригнічується експресія генів основних факторів ангіогенезу, але збільшується рівень експресії онкогенів та факторів росту, що може призводити і до онкотрансформації. Розвиток резистентності до інсуліну за умов ожиріння

асоціюється з підвищеним рівнем експресії низки про-проліферативних генів у підшкірній жировій тканині порівняно з особами, що мали ожиріння та нормальну толерантність до глюкози.

Встановлено також, що за умов ожиріння у підшкірній жировій тканині посилюється експресія факторів опосередковуючих стрес ендоплазматичного ретикулума, причому розвиток резистентності до інсуліну супроводжується зниженням рівня експресії великої групи генів, що контролюють ключові метаболічні процеси. За умов ожиріння знижується також рівень низки мікроРНК, які контролюють рівень експресії ключових регуляторних генів. Отримані результати вказують на важливу роль змін в експресії цих ключових факторів у розвитку ожиріння, а також його метаболічних та інших ускладнень шляхом репрограмування геному через стрес ендоплазматичного ретикулума.

Більше того, розвиток резистентності до інсуліну різко знижує імунний захист організму. На сьогодні в світі ще не виявлені високочутливі молекулярно-генетичні маркери для виявлення послаблення імунного захисту організму у підлітків за умов ожиріння. У зв'язку з цим, було розроблено високочутливий спосіб визначення стану імунного захисту організму підлітків із резистентністю до інсуліну на фоні ожиріння за рівнем експресії виявлених молекулярно-генетичних маркерів з метою попередження зниження імунного захисту таких пацієнтів. У якості молекулярно-генетичних маркерів ідентифіковано ген HLA-DRA (альфа ланцюг HLA-DR) та мікроРНК miR-190b. Зміни в їх експресії визначали порівняно з нормою в крові у підлітків із резистентністю до інсуліну на фоні ожиріння за допомогою методу кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

Крім того, було показано, що різні наночастинки ініціюють розвиток стресу ендоплазматичного ретикулума і що це призводить до розвитку генотоксичності і різкого зниження імунного захисту. Забруднення об'єктів довкілля наночастинками, у тому числі й CrSi<sub>2</sub>, TiN, одностінними карбоновими нанотрубками та фулеренами C<sub>60</sub>, є гострою проблемою останніх років у багатьох країнах світу та Україні, оскільки при попаданні в живі організми вони можуть проявляти токсичну дію. Але на сьогодні токсична дія

багатьох наночастинок на організм не вивчена. Проблема прогнозування токсичної дії наночастинок CrSi<sub>2</sub>, TiN, одностінних карбонових нанотрубок та фулеренів C<sub>60</sub> ускладнюється тим, що ще не встановлені високочутливі молекулярно-генетичні маркери, які б давали можливість виявити їх негативний вплив за низьких концентрацій. У зв'язку з цим було створено високочутливі та зручні у виконанні способи визначення токсичної дії на організм дуже низьких концентрацій наночастинок одностінних карбонових трубок, CrSi<sub>2</sub>, TiN та фулеренів C<sub>60</sub> шляхом визначення рівня експресії генів HLA-DRA і HLA-G, що відіграють ключову роль у імунному захисті, у використанні тканини печінки мишей або культури клітин для прогнозування та запобігання розвитку патологічних станів.

Вперше показано гено-специфічну залежність експресії досліджених ядерних генів протеїнів мітохондрій у клітинах гліоми від функціонування IRE1, який опосередковує основний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума, що свідчить про можливий вклад цих генів у анти-проліферативний ефект, обумовлений пригніченням IRE1.

Виявлено різні механізми стрес-залежної регуляції експресії генів протеїнів мітохондріону, що можуть опосередковуватись як протеїнкіназою, так і ендорибонуклеазною активністю IRE1, а у деяких випадках – обома ензиматичними активностями цього сигнального протеїну. Методом біоінформаційного аналізу в промоторних послідовностях більшості досліджених генів було ідентифіковано специфічні регуляторні послідовності, що розпізнаються транскрипційним фактором XBP1 (X-box binding protein 1, протеїн 1, що зв'язується з X-боксом). Отримані результати вказують на можливу роль фактора XBP1 у транскрипційній регуляції експресії цих генів. Більше того, у 3'-кінцевій нетранслюємій ділянці мРНК низки генів, що кодують протеїни мітохондріону було знайдено сайти зв'язування таких мікроРНК: miR-182-5p, -203-3p, -507-3p, -381, -361-3p, -107 та -588. Оскільки у клітинах гліоми з пригніченим IRE1 зниження експресії відповідних генів супроводжувалося одночасним посиленням експресії цих мікроРНК, можна стверджувати про існування ще одного молекулярного механізму регуляції

експресії досліджених генів, а саме на пост-транскрипційному рівні шляхом ініціації розщеплення мРНК внаслідок їх взаємодії з відповідними мікроРНК.

Крім того, було показано, що пригнічення функціональної активності IRE1 по-різному модифікує чутливість експресії більшості досліджених генів до гіпоксії, а це є важливим для росту пухлин. Методом біоінформаційного аналізу було виявлено регуляторні елементи, що розпізнаються транскрипційним фактором HIF (hypoxia inducible factor; фактор, що індукується гіпоксією), ключовим регулятором клітинної відповіді на гіпоксію, у промоторних ділянках більшості ядерних генів протеїнів мітохондріону, причому частина таких сайтів одночасно містила у своїй структурі сайти зв'язування із фактором ХВР1. Отримані результати вперше розкривають можливі молекулярні механізми залежності гіпоксичної регуляції від функціональної активності IRE1, а також демонструють механізм комплексної регуляції експресії частини ядерних генів, що кодують полі-функціональні протеїни мітохондрій, шляхом розпізнавання специфічних сайтів зв'язування різними транскрипційними факторами.

Виявлено, що пригнічення функціональної активності сигнального протеїну IRE1 запускає функціональне репрограмування геному мітохондрій, змінюючи рівень експресії низки онкогенів та пухлинних супресорів, а також факторів апоптозу, репрограмуючи чутливість експресії більшості досліджених генів до умов гіпоксії, дефіциту глюкози або глутаміну, а це призводить до зниження проліферативного потенціалу клітин гліоми.

Таким чином, отримані результати демонструють важливу роль ядерних генів протеїнів мітохондрій у регуляції процесів проліферації та росту клітин гліоми за умови пригнічення IRE1 і розширюють уявлення про молекулярні механізми впливу гіпоксії та інших важливих компонентів пухлинного росту на експресію цих генів, що безумовно сприятиме пошуку перспективних генів-мішеней для створення нових анти-пухлинних терапевтичних препаратів.

**Практичне значення даної роботи** полягає у з'ясуванні залежних від стресу ендоплазматичного ретикулума механізмів розвитку ожиріння з його

метаболическими та іншими ускладненнями, а також молекулярних механізмів регуляції проліферації та росту клітин гліоми, що є необхідним для розробки нових перспективних методів діагностики, профілактики та лікування цих патологій. Крім того, було розроблено способи прогнозування стану імунного захисту підлітків із ожирінням та резистентністю до інсуліну з метою попередження зниження імунного захисту таких пацієнтів. Розроблено також високочутливі та зручні у виконанні способи визначення негативного впливу наноматеріалів на організм та його імунний захист за експресією молекулярно-генетичних маркерів HLA-DRA і HLA-G, що може бути використано для прогнозування та запобігання розвитку патологічних станів.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що за умов стабільного ожиріння в підшкірній жировій тканині чоловіків виражено змінюється рівень експресії генів, які кодують основні фактори ангіогенезу і ключові регуляторні компоненти фібринолізу, що свідчить про порушення процесів ангіогенезу та фібринолізу та вказує на можливість розвитку серцево-судинних захворювань.

2. Показано, що у підшкірній жировій тканині пацієнтів з ожирінням знижується рівень експресії генів специфічних фосфатаз, які регулюють ростові процеси і можуть бути мішенями для терапевтичних цілей у поліпшенні чутливості до інсуліну, а також продемонстровано залежність експресії цих генів від розвитку резистентності до інсуліну.

3. Виявлено, що рівень експресії генів факторів росту і онкогенів підвищується за умов ожиріння та резистентності до інсуліну, а це вказує на порушення процесів проліферації і розвиток прозапальних процесів.

4. Показано, що за ожиріння зростає рівень експресії стрес-залежного шаперона HSPA5/BiP, задіяного у розвитку ожиріння та рості злоякісних пухлин, і це вказує на наявність стресу ендоплазматичного ретикулума та схильність організмів з ожирінням до канцерогенезу.

5. Виявлено зниження рівня експресії низки мікроРНК, які задіяні в пост-транскрипційній регуляції експресії ключових регуляторних генів, що вказує на

їх важливу роль у розвитку ожиріння і його метаболічних ускладнень шляхом опосередкованого стресом ендоплазматичного ретикулума репрограмування геному.

6. Отримані результати вказують не лише на репрограмування геному за умов ожиріння і за резистентності до інсуліну, а і на важливу роль ключових регуляторних генів у розвитку цих патологій, зокрема різкого зниження імунного захисту організму внаслідок розвитку резистентності до інсуліну, що підтверджено патентом на винахід.

7. Показано гено-специфічну залежність експресії досліджених ядерних генів, що кодують протеїни мітохондрій, від функціональної активності IRE1, який опосередковує основний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума, а це свідчить про важливий вклад цих генів у анти-проліферативний ефект, обумовлений пригніченням IRE1 у клітинах гліоми.

8. Виявлено різні молекулярні механізми стрес-залежної регуляції експресії ядерних генів мітохондріальних протеїнів, які опосередковуються як протеїнкіназою, так і ендорибонуклеазою IRE1, а у деяких випадках – обома його ензиматичними активностями, що вказує на залежність функціональної активності мітохондрій від стресу ендоплазматичного ретикулума, зокрема сигнального ензиму IRE1.

9. Показано, що пригнічення функціональної активності сигнального протеїну IRE1 знижує проліферативний потенціал клітин гліоми, змінюючи рівень експресії низки онкогенів та пухлинних супресорів, а також репрограмує чутливість експресії більшості досліджених генів до умов гіпоксії, дефіциту глюкози або глутаміну.

10. Виявлено різноспрямований характер змін експресії ядерних генів, які кодують протеїни мітохондрій, у клітинах гліоми лінії U87 з виключеною функціональною активністю IRE1, що свідчить про IRE1-залежне репрограмування функціонального стану мітохондрій та вказує на можливу участь цих генів у опосередкованій IRE1 регуляції процесів проліферації і росту пухлинних клітин,.

11. Показано, що різні наночастинки проявляють генотоксичні ефекти, ініціюють розвиток стресу ендоплазматичного ретикулула і різко знижують імунний захист організму. Розроблено також високочутливі способи визначення негативного впливу наноматеріалів на організм та його імунний захист за експресією молекулярно-генетичних маркерів, що дозволяє прогнозувати ймовірність розвитку патологічних станів.

**Патентна захищеність.** Способи прогнозування стану імунного захисту підлітків із ожирінням за рівнем експресії молекулярно-генетичних маркерів захищені двома патентами на винахід. Способи визначення негативного впливу наноматеріалів на організм за експресією генів HLA-DRA і HLA-G захищені чотирма патентами на корисну модель.

**Публікації.** До циклу наукових праць включено 26 статей, виданих друком в період із 2013 по 2020 рр., зокрема 10 статей у англійських журналах з імпаکت-фактором. Загальна кількість посилань на публікації авторів/ h-індекс роботи, згідно баз даних складає відповідно: Web of Science – 3 / 2, Scopus – 44 / 8, Google Scholar – 105 / 13. Отримано 6 патентів України, 2 із них на винахід.

Виконавці:

Науковий співробітник  
відділу молекулярної біології  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна, к.б.н.

Вілецька Ю.М.

Молодший науковий співробітник  
відділу молекулярної біології  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна, Ph.D.

Хіта О.О.

Вчений секретар Інституту біохімії  
ім. О.В. Палладіна, к.б.н.

Протасова З.С.

## ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ВКЛЮЧЕНИХ ДО ЦИКЛУ РОБІТ

1. Minchenko D., Ratushna O., Bashta Y., Herasymenko R., Minchenko O. The expression of TIMP1, TIMP2, VCAN, SPARC, CLEC3B and E2F1 in subcutaneous adipose tissue of obese males and glucose intolerance. *CellBio.* 2013, 2(2), 25-33.
2. Minchenko D.O., Yavorovsky O.P., Paustovskyi Y.O., Bashta Y.M., Lypova N.M., Minchenko O.H. Expression of key circadian genes as sensitive marker of in vivo toxic action of methyl tertial butyl ether. *Appl. Cell Biol.*, 2014, 3 (4), 129-138.
3. Minchenko D.O., Bakalets T.V., Tsymbal D.O., Ratushna O.O., Bashta Y.M., Minchenko O.H. Effect of hypoxia on the expression of MAP3K5, MAP4K3, CIB1, RIPK1, and RIPK2 genes in U87 glioma cells with ERN1 knockdown. *J. Investig. Biochem.*, 2014, 3(3), 101-106.
4. Bashta Y.M., Minchenko D., Bova D., Kovalevska O., Minchenko O. Expression of protein phosphatase DUSP genes in subcutaneous adipose tissue of obese men with normal and impairment glucose tolerance. *Biol. Systems*, 2014, 6(1), 3-9.
5. Minchenko O., Bashta Y., Minchenko D., Kovalevska O., Kulinich A. Expression of genes, which participate in the control cell proliferation, in subcutaneous adipose tissue of the obese men with glucose intolerance. *Appl. Cell Biol.*, 2014, 3(4), 129-138.
6. Minchenko O., Bashta Y., Minchenko D., Ratushna O. Glucose tolerance in obese men is associated with dysregulation of some angiogenesis-related gene expressions in subcutaneous adipose tissue. *Fiziol. Zh.*, 2016, 62(2), 12-23.
7. Мінченко Д.О., Вілецька Ю.М., Давидов В.В., Мінченко О.Г. Експресія генів TLR2, TLR4, TNFA та ADD3 у підлітків і дорослих чоловіків з ожирінням за умови різної чутливості до інсуліну. *Сучасна педіатрія*, 2017, 6(86), 147-152.
8. Minchenko O., Viletska Y., Minchenko D., Davydov V. Insulin resistance modifies the expression of proliferation related genes in obese adolescents and adult men. *Ukr Biochem J.*, 2019, 91(3), 65-77.
9. Minchenko D., Tsymbal D., Riabovol O., Viletska Y., Lahanovska O., Sliusar M., Minchenko O. Hypoxic regulation of EDN1, EDNRA, EDNRB, and ECE1 gene expressions in ERN1 knockdown U87 glioma cells. *Endocr. Regul.*, 2019, 53(4), 250-262.
10. Tsymbal D.O., Minchenko D.O., Khita O.O., Rudnytska O.V., Viletska Y., Lahanovska Y. Minchenko O.H. ERN1 knockdown modifies the effect of glucose deprivation on homeobox gene expressions in U87 glioma cells. *Endocr. Regul.*, 2020, 54 (3), 196-206.
11. Minchenko O. H., Kryvdiuk I. V., Minchenko D. O., Riabovol O. O., Halkin O. V. Inhibition of IRE1 signaling affects expression of a subset genes encoding for TNF-related factors and receptors and modifies their hypoxic regulation in U87 glioma cells. *Endoplasm. Reticul. Stress Dis.*, 2016, 3(1), 1 – 15
12. Minchenko O.H., Tsymbal D.O., Minchenko D.O., Riabovol O.O., Ratushna O.O. Hypoxic regulation of the expressions of proliferation related genes in U87 glioma cells upon inhibition of ERN1 signaling. *Ukr. Biochem. J.*, 2016, 88(1), 11-21
13. Tsymbal D.O., Minchenko D.O., Riabovol O.O., Ratushna O.O., Minchenko O.H. IRE1 knockdown modifies glucose and glutamine deprivation effects on the expression of proliferation related genes in U87 glioma cells. *Biotech. Acta.*, 2016, 9(1), 26-37
14. Minchenko D. O., Riabovol O. O., Halkin O. V., Ratushna O .O., Tsymbal D. O., Minchenko O. H. IRE-1 $\alpha$  regulates expression of ubiquitin specific peptidases during hypoxic response in U87 glioma cells. *Endoplasm. Reticul. Stress Dis.*, 2016, 3, 50 – 62
15. Minchenko O.H., Kryvdiuk I.V., Riabovol O.O., Minchenko D.O., Danilovskyi S.V., Ratushna O.O. Inhibition of IRE1 modifies the hypoxic regulation of GADD family gene expressions in U87 glioma cells. *Ukr. Biochem. J.*, 2016, 88(2), 25-34



16. Minchenko O.H., Riabovol O.O., Tsymbal D.O., Minchenko D.O., Ratushna O.O. Effect of hypoxia on the expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells. *Ukr. Biochem. J.*, 2016, 88 (3), 54-65
17. Riabovol O.O., Tsymbal D.O., Minchenko D.O., Ratushna O.O., Minchenko O.H. IRE1 knockdown modifies the effect of glutamine and glucose deprivations on the expression level of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells. *Biotech. Acta*, 2016, 9(2), 37-47
18. Minchenko D.O., Riabovol O.O., Tsymbal D.O., Ratushna O.O., Minchenko O.H. Inhibition of IRE1 affects the expression of genes encoded glucocorticoid receptor and some related factors and their hypoxic regulation in U87 glioma cells. *Endocr. Regul.*, 2016, 50 (3), 127-136
19. Minchenko D.O., Riabovol O.O., Ratushna O.O., Minchenko O.H. Hypoxic regulation of the expression of genes encoded estrogen related proteins in U87 glioma cells: effect of IRE1 inhibition. *Endocr. Regul.*, 2017, 51(1), 8-19
20. Minchenko O. H., Riabovol O. O., Halkin O. V., Minchenko D. O., Ratushna O. O. IRE1-knockdown modifies hypoxic regulation of cathepsins and LONP1 genes expression in U87 glioma cells. *Ukr. Biochem. J.*, 2017, 89(2), 55 – 69
21. Halkin O. V., Minchenko D. O., Riabovol O. O., Telychko V. V., Ratushna O. O., Minchenko O. H. Expression of ubiquitin specific peptidase and ATG7 genes in U87 glioma cells upon glutamine deprivation. *Ukr. Biochem. J.*, 2017, 89(5), 52 – 61
22. Halkin O. V., Riabovol O. O., Minchenko D. O., Kuznetsova A. Y., Ratushna O. O., Minchenko O. H. IRE1 knockdown modifies the effect of glutamine deprivation on the expression of a subset of proteases in U87 glioma cells. *Biotech. Acta*, 2017, 10(4), 34 – 43
23. Riabovol O. O., Tsymbal D. O., Minchenko D. O., Lebid-Biletska K. M., Sliusar M. Y., Rudnytska O. V., Minchenko O. H. Effect of glucose deprivation on the expression of genes encoding glucocorticoid receptor and some related factors in ERN1-knockdown U87 glioma cells. *Endocr Regul.*, 2019, 53(4), 237-249
24. Minchenko D.O., Tsymbal D.O., Luzina O.Y., Riabovol O.O., Danilovskyi SV, Minchenko O.H. Silencing of NAMPT leads to up-regulation of insulin receptor substrate 1 gene expression in U87 glioma cells. *Endocr. Reg.*, 2020, 54 (1), 31-42
25. Minchenko D.O., Khita O.O., Tsymbal D.O., Danilovskyi S.V., Rudnytska O.V., Halkin O.V., Kryvdiuk I.V., Smeshkova M.V., Yakymchuk M.M., Bezrodnyi BH, Minchenko O.H. Expression of IDE and PITRM1 genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells: effect of hypoxia and glucose deprivation. *Endocr. Reg.*, 2020, 54(3), 183-195
26. Hnatiuk O.S., Tsymbal D.O., Minchenko D.O., Khita O.O., Viletska Y.M., Rudnytska O.V., Kozynkevych H.E., Maslak H.S., Minchenko O.H. Insulin receptor substrate 1 gene expression is strongly up-regulated by HSPB8 silencing in U87 glioma cells. *Endocr. Reg.*, 2020, 54 (4), 231-243
27. Мінченко О.Г., Ратушна О.О., Цимбал Д.О., Мінченко Д.О., Рябовол О.О. Спосіб визначення токсичної дії наночастинок нітриду титану на організм за експресією гена HLA-DRA. Патент на корисну модель. № 124458, 10.04.2018; Бюл. № 7, 2018. МПК G01N 33/50 (2016.01); C22C 29/16 (2016.01). Заявка № u201710601, 01.11.2017
28. Мінченко О.Г., Ратушна О.О., Цимбал Д.О., Мінченко Д.О., Рябовол О.О. Спосіб визначення токсичної дії на організм наночастинок дисиліциду хрому за експресією гена HLA-DRA. Патент на корисну модель. № 124939, 25.04.2018; Бюл. №8, 2018
29. Мінченко О.Г., Рябовол О.О., Мінченко Д.О., Цимбал Д.О., Ратушна О.О. Спосіб визначення токсичної дії на організм наночастинок фулеренів C60 за експресією гена HLA-DRA. Патент на корисну модель №124940, 25.04.2018; Бюл. №8, 2018. МПК G01N 33/50 (2017.01). Заявка № u201711518, 24.11.2017