

ВІДЗИВ

офіційного опонента

на дисертаційну роботу *Гоцуляка Назарія Ярославовича*
„Роль mTOR-сигнальної мережі у регуляції локомоторних властивостей пухлинних клітин під впливом мікрооточення» представленої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Робота Гоцуляка Н.Я. присвячена з'ясуванню особливостей функціонування сигнальної системи mTOR/S6K (зокрема, кінази S6K1 та її ізоформ) в реалізації міграційної здатності пухлинних клітин, а також визначенню регуляторного впливу оточуючих клітин на ці процеси.

Актуальність теми. mTOR-асоційовані сигнальні каскади тісно пов'язані з передачею сигналів від гормональних, ростових та інших регуляторних факторів і задіяний в регуляції таких важливих клітинних процесів як проліферація, реорганізація актинового цитоскелету і міграція, апоптоз, активація/десенситизація рецепторів ростових факторів, трансформація клітин тощо. І, безумовно, будь-які порушення в різних ланках таких каскадів з одного боку можуть бути тісно пов'язана з різними формами онкотрансформацій, а з іншого – можуть використовуватися як маркер для прогнозування розвитку патології та терапевтична мішень при її лікуванні, у таргетній хіміо- та імунотерапії онкологічних захворювань. Отже, представлений в роботі напрямок досліджень фактично є теоретичною і практичною основою методів дослідження, діагностики, регуляції і корекції молекулярно-клітинних функцій тканин в нормі та при канцерогенезі, що є актуальним зараз і буде залишається таким тривалий час.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Дослідження Гоцуляка Н.Я. виконувались на базі відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України в межах бюджетних тем «Особливості функціонування mTOR-залежних сигнальних шляхів: множинність ізоформ mTOR та регуляція метаболічних процесів в клітині» (номер державної реєстрації – 0110U000692, 2011-2015 рр.), «Створення та характеристика клітинної моделі на основі співкультивування пухлинних та стромальних клітин для оцінки ефективності впливу протипухлинних засобів» (номер державної реєстрації – 0115U001403, 2015-2019 рр.), «Особливості структурно-функціональної організації mTOR/S6K-залежного сигнального каскаду в нормальних та злоякісних клітинах: множинність сплайсових ізоформ mTOR та S6K кіназ»

(номер державної реєстрації – 0115U003745, 2016-2020 рр.), «З'ясування особливостей регуляції експресії генів та характеристика нових молекулярних маркерів злякисних новоутворень» (номер державної реєстрації – 0117U002123, 2017-2019 рр.), «Характеристика нових молекулярно-генетичних маркерів злякисних новоутворень людини для діагностики онкологічних захворювань, оцінки метастатичного потенціалу та чутливості пухлин до хіміотерапії» (номер державної реєстрації – 0120U100648, 2020-2021 рр.), а також у зв'язку з проектом за конкурсом науково-дослідних робіт молодих учених НАН України на тему: «Роль p60 ізоформи кінази S6K1 в індукції епітеліально-мезенхімального переходу у клітинах раку молочної залози», 2019-2020 рр.

Новизна дослідження та значення одержаних результатів. Отримані і представлені результати є новими як в науково-теоретичному, так і в практичному плані. В роботі вперше встановлено молекулярно-клітинні особливості регуляторного паракринного впливу фібробластів з мікрооточення пухлинних клітин на процеси міграції трансформованих клітин та на функціонування mTOR/S6K1-сигнальної ланки (у клітинах раку молочної залози). При цьому показано відмінності ролей різних ізоформ кінази S6K1 (p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1) в цих процесах.

Ідентифікація нових регуляторних зв'язків між сигнальними каскадами у пухлинних клітинах та процесами пухлино-стромальної взаємодії важлива для поглиблення розуміння їх ролі у процесах ініціації, розвитку та метастазування злякисних новоутворень загалом та раку молочної залози зокрема. Ці результати можуть бути важливими при подальших експериментальних модельних дослідженнях пухлинного росту та розробці стратегій ефективної терапії раку, зокрема виборі перспективних мішеней таргетної терапії раку.

Автором також запропоновано і використано в дисертаційному дослідженні модифікацію використання моделі «раневої поверхні» одночасно з співкультивуванням клітин з різними характеристиками, що дозволяє адекватно оцінювати паракринні впливи таких клітин на процеси клітинної міграції.

Враховуючи вищевказане, результати представленої до захисту роботи Гоцуляка Н.Я. можуть служити додатковим внеском у розуміння механізмів сигнальних каскадів клітин в нормі і при онкопатології, а також виступати теоретичною підставою при виборі молекулярних мішеней при розробці підходів таргетної терапії, доборі ефективних методів культивування

нормальних і онкотрансформованих клітин, дослідження їх структурно-функціональних властивостей.

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

Експериментальна частина роботи виконана із залученням широкого ряду сучасних методів (первинних і вторинних культур нормальних і онкотрансформованих клітин, цитологічне дослідження культивованих об'єктів, їх імуноцитохімічний аналіз, імунофлюоресцентні і хемілюмінесцентні методи, методи електрофорезу та блотингу). Підбір методів повністю відповідає досягненню поставлених задач і дозволив зробити цілком обґрунтовані висновки з отриманих результатів.

Отримані результати в достатній мірі представлені якісними мікрофотографіями, графіками і схемами, які дають чітку уяву про особливості досліджуваних процесів. Проте, на окремих мікрофотографіях наявні невідповідні за розміром масштабні лінійки. Результати оброблені статистично з використанням двовибіркового t-критерію Стьюдента, що в даному випадку є цілком адекватним і достатнім для оцінки їх достовірності. Висновки є ємними, лаконічними і в достатній мірі 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, які рекомендовані МОН України і входять до наукометричної бази даних Scopus і 7 тез у матеріалах наукових форумів – як українських, так і зарубіжних. Роботи опубліковані протягом 2014-2020 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 Гоцуляка Н.Я. «Роль mTOR-сигнальної мережі у регуляції локомоторних властивостей пухлинних клітин під впливом мікрооточення» відповідає вимогам, що висуваються до кандидатських дисертацій в Україні. Дисертація також в цілому оформлена згідно відповідних вимог – в ній представлені всі необхідні розділи: вступ, огляд

літератури, опис методів дослідження, викладення власних результатів та їх узагальнення, висновки, список використаної літератури. Основний науково-експериментальний зміст роботи викладений на 110 стор. (без списку літератури). Розділ *Огляд літератури* побудовано на аналізі 114 літературних джерел, 50% яких видана за останнє десятиріччя, проте чомусь відсутні посилання на роботи останніх років і деякі роботи, які згадуються в тексті, не внесені до самого списку літератури. В огляді літератури викладені основні дані про об'єкт дослідження (організація та молекулярні механізми функціонування сигнального каскаду PI3K/mTOR/S6K в цілому та його роль в життєдіяльності клітин та розвитку онкотрансформацій) з процесами проліферації, диференціювання і локомоції клітин. Таким чином, розділ "Огляд літератури" дає чітке уявлення, обгрутоване посиланнями на наукові джерела, про рівень знань і стан проблеми в обраному дисертантом напрямку досліджень. Проте, наприкінці розділу «Огляд літератури» бажано було б дати коротке узагальнення, яке б обгрутовувало актуальність і важливість виконання наукових досліджень і завдань, обраних автором.

Експериментальна частина роботи виконана із залученням широкої низки сучасних методів молекулярної та клітинної біології, цитології, імуноцитохімії, біохімії. Зокрема, в розділі *Матеріали та методи* докладно описані принципи і умови, яких дотримувались при отриманні і характеристиці первинних культур фібробластів, збереженні і культивуванні клітин в різних умовах (моношарові і тривимірні культури, співкультивування, застосування моделі «раневої поверхні»), їх морфометричний аналіз, імуноцитохімічне дослідження клітин, визначення особливостей міграції клітин тощо. Методи роботи з ДНК і білками включали їх електрофоретичне розділення, вестернблот-аналіз, проведення полімеразної ланцюгової реакції. В цілому докладний опис методів роботи дає змогу при необхідності відтворити умови експерименту і дозволяє зробити висновок про адекватність обраних методів поставленим задачам. Обробка отриманих експериментальних результатів проведена із застосуванням відповідних методів статистичного аналізу (t-тесту для незалежних вибірок даних при нормальному розподілі). В цілому методична сторона представленої роботи є вдалим і адекватно підібраним поєднанням сучасних методів молекулярної та клітинної біології.

Результати досліджень викладені у 4-х підрозділах роботи з належною повнотою і наведенням відповідних мікрофотографій, графіків та пояснюючих схем.

В роботі докладно описані результати дослідження участі кінази mTOR та ізоформ кінази S6K1 у сприйнятті та передачі паракринної сигналізації дермальних фібробластів онкотрансформованими клітинами ліній MCF-7 та HeLa, участь ізоформ кінази S6K1 у регуляції активності PI3K/АКТ/mTOR-сигнального шляху при застосуванні клітинних ліній MCF-7 з редагованою експресією ізоформ (p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1). Досліджено участь кінази mTOR та ізоформ кінази S6K1 у регуляції клітинної рухливості під впливом паракринної сигналізації дермальних фібробластів і, зокрема, у регуляції експресії окремих білків, асоційованих з процесами міграції клітин.

В цілому викладення і аналіз результатів свідчить про глибоке володіння автором знаннями з широкого кола проблем, що стосуються галузі дослідження – молекулярних особливостей сигнальних процесів в клітині, механізмів онкотрансформації клітин, їх поведінки в культурі, реалізації та регуляції міграційної активності клітин.

Робота викладена в цілому грамотною науковою мовою, проте іноді автор необгрунтовано застосовує «новітні» терміни, які не є загальноприйнятими.

Зміст автореферату відповідає основним положенням дисертації.

При аналізі дисертаційної роботи Н.Я.Гоцуляка принципових зауважень наукового і методичного характеру щодо викладених результатів не виникло.

Проте, низка зауважень і побажань стосуються особливостей представлення отриманих даних та редакційного оформлення тексту:

1. З метою більш високої обгрунтованості тверджень в розділі *Аналіз та узагальнення отриманих результатів* необхідно використовувати посилання на роботи інших авторів або власні попередні роботи, результати яких в чомусь узгоджуються, або ж, можливо, не зовсім, з даними представленої роботи. Натомість, автор іноді просто застосовує твердження, що відомі певні дані, або той чи інший результат узгоджується із даними літератури тощо.

2. У зв'язку з попереднім зауваженням, слід відмітити, що автор не завжди обгрунтовано робить окремі твердження, наприклад, «слід зазначити, що, відповідно до наших даних, p60S6K1 відіграє важливу роль у пухлинній прогресії раку молочної залози на моделі культури клітин». По-перше, не зрозуміло, чи мається на увазі дана робота, чи якісь попередні дослідження, оскільки немає посилання, по-друге, у будь-якому випадку реакції клітин в культурі не можна прямим чином пов'язувати з

прогресію раку певного органу – це вже зовсім інший рівень (органний та організменний), який в подібних дослідженнях, очевидно, не розглядався. В таких випадках можливі лише припущення щодо можливої реалізації властивостей клітин, встановлених *in vitro*, на рівні організму.

3. Висновок №3, в якому автор стверджує про розробку та адаптацію модифікації моделі «раневої поверхні», необхідно було б конкретизувати, вказавши, в чому саме полягає відмінність такої модифікації від існуючих.

4. На окремих мікрофотографіях наведені масштабні лінійки, розмір яких не відповідає дійсності, більше того, наявні неспівпадіння між ними на фото у дисертації та у авторефераті.

5. Подекуди застосовані терміни, які не загальноприйнятими або застосовуються для інших структур і процесів. Наприклад, англomовний термін *Stress-fiber* так і залишається в українській термінології (стрес-фібрили), а не перекладається як «стресові фібрили». З іншого боку, терміни *механорецепція*, *механорецептори* мають абсолютно конкретні і давно прийняті значення у фізіології і клітинній біології і аж ніяк не відповідають тим процесам, і молекулам, які автор називає цими термінами в дисертаційній роботі.

6. Не всі посилання на наукові джерела, зазначені в тексті дисертаційної роботи, зведені в Список використаних джерел. Крім того, в списку чомусь практично відсутні роботи після 2015 року.

7. Далеко не всі активно застосовувані автором аббревіатури внесені до Переліку умовних скорочень (ЕМП, ПАФ, ПКМ, ММП, ПЛР, КС, ВВБ та багато інших), хоча назви великої низки кіназ ретельно розшифровані.

8. В роботі зустрічаються невивправлені синтаксичні та друкарські помилки, невідповідна нумерація розділів і рисунків.

Проте, слід зазначити, що наведені зауваження не знижують наукової цінності представленого матеріалу, а робота в цілому відображає високий науково-практичний рівень автора.

Висновок. Дисертаційна робота Н.Я.Гоцуляка є закінченою, самостійною науковою працею, в якій отримано ряд нових даних, важливих як у теоретичному, так і в практичному аспекті. Результати роботи є достовірними. Всі основні положення дисертації відображені в авторефераті. Основний зміст дисертації опублікований в 12 друкованих працях – серед них 5 статей в фахових наукових виданнях. За своєю актуальністю, методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, новизною отриманих

результатів, логічністю і обґрунтованістю висновків представлена на захист дисертаційна робота Гоцуляка Назарія Ярославовича «Роль mTOR-сигнальної мережі у регуляції локомоторних властивостей пухлинних клітин під впливом мікрооточення» 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 Гоцуляк Н.Я. заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Офіційний опонент
доктор біологічних наук
професор кафедри цитології, гістології та репродуктивної медицини
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного
університету імені Тараса Шевченка, професор

ОСТРОВСЬКА Г.В.

Підпис проф.Островської Г.В. засвідчую:

Заступник директора ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка



Месриченко Г.В.