

ВІДЗИВ

офіційного опонента

на дисертаційну роботу *Косач Вікторії Романівни*

„*Особливості функціонування mTOR/ S6K сигнального шляху під час поділу та ініціації міграції клітин карциноми молочної залози людини in vitro*» представленої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Робота Косач В.Р. присвячена з'ясуванню окремих молекулярних основ функціонування регуляторного сигнального каскаду PI3K/mTOR/S6K (зокрема, кінази S6K1 та її ізоформи p60S6K1) в процесах поділу і міграції в клітинах аденокарциноми молочної залози.

Актуальність теми Представлений в роботі напрямок досліджень фактично спрямований на розробку методів дослідження, діагностики, регуляції і корекції молекулярно-клітинних функцій тканин молочної залози в нормі та при канцерогенезі, що залишається актуальними на даний час. PI3-кіназний/mTOR сигнальний каскад тісно пов'язаний 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, деактивація і рециклізація рецепторів ростових факторів, трансформація клітин тощо. Крім того, гіперактивація сигналізації mTOR/S6K1 може бути тісно пов'язана з деякими формами раку молочної залози і може використовуватися як маркер для прогнозування розвитку патології та терапевтична мішень при її лікуванні. Отже, вибір дослідження функціонування ізоформ кіназ mTOR та S6K як одного з показників зміни функціонального стану клітин молочної залози є доречним і актуальним.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Дослідження Косач В.Р. виконувались на базі відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології та генетики НАН

України в межах бюджетної теми “Особливості функціонування mTOR – залежних сигнальних шляхів: множинність ізоформ mTOR та регуляція процесів в клітині” (номер державної реєстрації - 0110U000692, 2011-2015 рр.) та « Особливості структурно-функціональної організації mTOR / S6K- залежного сигнального каскаду в нормальних та злоякісних клітинах: множинність сплайсових ізоформ mTOR та S6K кіназ” (номер держреєстрації 0115U003745, 2016-2020 р.).

Новизна дослідження та одержаних результатів. В роботі вперше вивчено особливості локалізації і функціонування кінази S6K1 при різних функціонально-структурних станах клітин лінії MCF7, зокрема – при впливі такого фактору, як щільність клітинної культури, а також міграційної та проліферативної активності. Продемонстровано роль S6K1 як регулятора міграції клітин карциноми молочної залози. Проведено оптимізацію окремих підходів до дослідження вказаних процесів – зокрема, створено модельні клітинні лінії для дослідження функціонування різних наборів ізоформ кінази S6K1

Враховуючи вищевказане, результати представленої до попереднього захисту роботи Косач В.Р. 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 клітин молочної залози людини, цитологічне і гістологічне дослідження тканин і

культивованих об'єктів, їх імуноцитохімічний аналіз, імуофлюоресцентні і хемілюмінесцентні методи, методи електрофорезу та блотингу), підбір яких повністю відповідає досягненню поставлених задач і дозволив зробити цілком обґрунтовані висновки з отриманих результатів.

Отримані результати в достатній мірі представлені якісними мікрофотографіями, які дають чітку уяву про особливості досліджуваних процесів. Результати оброблені статистично з використанням t-тесту для незалежних вибірок даних при нормальному розподілі та кореляційного аналізу.

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 6 статей у фахових наукових виданнях і 11 тез у матеріалах наукових форумів – як українських, так і зарубіжних. Роботи опубліковані протягом 2010-2018 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 попереднього захисту дисертаційна робота Косач А.Р. „„ *Особливості функціонування mTOR/ S6K сигнального шляху під час поділу та ініціації міграції клітин карциноми молочної залози людини in vitro*» повністю відповідає вимогам, що висуваються до кандидатських дисертацій в Україні. Дисертація також 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. Науково-експериментальний зміст роботи викладений на 127 стор. (без списку літератури) Розділ *Огляд літератури* побудовано на аналізі 145 літературних джерел, переважна більшість яких видана за останнє п'ятиріччя. В огляді літератури викладені основні дані про об'єкт дослідження (молекулярні механізми функціонування сигнального

каскаду PI3K/mTOR/S6K в цілому та його роль в розвитку онкотрансформацій та новоутворень молочної залози зокрема) з процесами проліферації, диференціювання і локомоції клітин. Таким чином, розділ "Огляд літератури" дає досить чітке уявлення про стан проблеми і важливість продовження наукових досліджень в межах, обраних автором.

Експериментальна частина роботи виконана із залученням широкої низки сучасних методів молекулярної та клітинної біології, гістології, імуноцитохімії, біохімії. Зокрема, в розділі *Матеріали та методи* описані принципи і умови, яких дотримувались при різних варіантах культивування клітин молочної залози, гістологічний аналіз післяопераційного матеріалу, імуногістологічне дослідження клітин, міграції клітин, визначення рівня проліферації. Методи роботи з білками включали, їх електрофоретичного розділення, вестернблот-аналізу, імунопреципітації. Проводився також біоінформативний аналіз. 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 та кореляційного аналізу). В цілому методична сторона представленої роботи є дуже вдалим і адекватно підібраним поєднанням сучасних методів молекулярної та клітинної біології, цитології.

Результати досліджень викладені у 3-х підрозділах роботи з належною повнотою і наведенням відповідних мікрофотографій та графіків.

В роботі докладно описані результати дослідження субклітинної локалізації кіназ S6K1 та mTOR в нормальних та онкотрансформованих клітинах молочної залози, показано результати оптимізації окремих підходів до культивування і дослідження проліферуючих клітин лінії MCF7, описані особливості експресії і локалізації форм кінази S6K у зв'язку з такими процесами як міграція клітин, проліферація, зміна стану культури (її щільність, розпластування сфероїдів тощо).

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 та їх поведінки в культурі, нормальної і патологічної цитології клітин молочної залози.

Робота викладена грамотною науковою мовою.

Зміст автореферату відповідає основним положенням дисертації.

При аналізі дисертаційної роботи В.Р.Косач принципів зауважень наукового характеру щодо викладених результатів не виникло.

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

1. Хотілося б мати більш глибоке обговорення результатів щодо субклітинної локалізації кінази S6K1, яке в представленій роботі видається недостатнім. Очевидно, припустимі причини і механізми ядерної транслокації цього регулятора є більш широкими, ніж просто щільність моношару та ініціація міграції. Зокрема, як видно з представлених даних, ядерна локалізація властива клітинам у яких на даний момент відсутнє контактне гальмування (це аденокарциноми *in vivo*, клітини одиночні або в розрідженому моношарі, клітини крайової зони сфероїдів). Залучення власних даних автора по перебудові актинового цитоскелету в таких випадках може дати додаткові висновки щодо регуляторних механізмів дії кінази S6K1.

2. В роботі чомусь необґрунтовано посиленнями вибір транскрипційного фактору TBR2, для перевірки регуляторної участі кінази S6K1 в міграційних процесах в клітинах молочної залози. Добре відомо, що цей фактор є регулятором розвитку (і в тому числі міграції) переважно клітин мезодермального та нейрального походження, що відображено й в одній з його назв – еомезодермін. Наскільки він є характерним для клітин аденокарциноми молочної залози? Можливо, його висока експресія в клітинах MCF-7, показана в представленій роботі, може також розглядатися як одне з наукових досягнень автора?

3. Недоречно вказувати, що створені лінії MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+ можуть бути використані «для дослідження функцій різних/окремих ізоформ кінази S6K1 у клітинах раку молочної залози», оскільки дані лінії дозволяють досліджувати фактично роль експресії тільки однієї ізоформи – p60.

4. В той же час висновок з цих досліджень і припущення механізму повинні бути більш глибокими. При обговоренні ролі ізоформи кінази p60 в прояві онкогенних властивостей клітини, очевидно, повинно бути більш уважно проаналізовано експресію і взаємодію різних ізоформ в різних генетичних типах лінії MCF-7. Зокрема, у всіх проведених експериментах практично однакові властивості проявляють як клітини дикого типу, у яких на високому рівні експресовані всі 3 ізоформи кінази S6K1, в тому числі і p60S6K1, так і клітини MCF-7 p85-/p70-/p60-, де всі ці ізоформи «виключені». В той же час клітини MCF-7 p85-/p70-/p60+, що мають одну експресовану ізоформу p60, але на фоні «виключених» ізоформ p85 та p70, проявляють різко відмінні властивості – в морфології, рухливості, мітотичній активності. Отже, можливо, в клітинах дикого типу перші 2 ізоформи справляють гальмуючий вплив на проонкогенні властивості p60?

5. Мікрофотографія клітин MCF-7 в культурі (рис.3.25), яка повинна демонструвати морфологічні особливості і відмінності цих клітин з різною експресією ізоформ кінази S6K1 є занадто дрібна – в більшості випадків лінійні розміри ядра на фото ледве сягають 1 мм. Проте, вона могла б представити цікаві особливості впливу спектру кіназ на морфологію.

6. З метою більш високої обґрунтованості тверджень бажано частіше використовувати посилання на власні попередні роботи та роботи інших авторів, результати яких в чомусь узгоджуються, або ж, можливо, не зовсім, з даними представленої роботи. Натомість, автор іноді просто застосовує тезу, що той чи інший результат «узгоджується із даними літератури» (напр., с.71, 106, 122 тощо).

7. В роботі зустрічаються поодинокі синтаксичні та друкарські помилки, наявні окремі помилки в позначках ізоформ кіназ на рис.3.28.

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

Висновок. Дисертаційна робота В.Р.Косач 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 17 друкованих працях – серед них 6 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 Косач Вікторії Романівни *«Особливості функціонування $mTOR/S6K$ сигнального шляху під час поділу та ініціації міграції клітин карциноми молочної залози людини *in vitro*»* відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567, а її автор Косач В.Р. 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



