

## ВІДГУК

### офіційного опонента

на дисертаційну роботу Гоцуляка Назарія Ярославовича

«Роль mTOR-сигнальної мережі у регуляції локомоторних властивостей пухлинних клітин під впливом мікрооточення»,

представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Робота Гоцуляка Назарія Ярославовича присвячена ідентифікації, розмежуванню та характеристиці функцій ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1, як елементів mTOR-сигнальної мережі, у процесі сприйняття сигналів, генерованих пухлинним мікрооточенням, та їх трансформації у регуляції рухливості пухлинних клітин.

**Актуальність теми.** Дослідження, спрямовані на з'ясування механізмів функціонування mTOR-сигнальної мережі в цілому та ізоформ кінази S6K1 зокрема, наразі викликають широкий інтерес і проводяться досить активно, оскільки порушення функціонування цих механізмів супроводжують виникнення і розвиток численних патологічних станів, включаючи канцерогенез, діабет, атеросклероз, тощо. Ізоформи кінази S6K1 розглядають як перспективні мішені при проведенні відповідних терапевтичних заходів. Особливу увагу на сьогоднішній день привертає до себе підтвержене існування нової ізоформи p60S6K1, маловивчене її функціональне призначення та онкогенний потенціал, а також сучасні можливості ефективного розмежування функцій окремих ізоформ S6K1. Представлена до захисту робота спрямована у даному напрямку та розкриває деякі особливості функціонування ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 у регуляції процесів паракринної та фізичної пухлино-стромальної взаємодії, клітинної міграції та адгезії, механорецепції та самоорганізації у просторі.

### **Зв'язок роботи з державними чи галузевими науковими програмами.**

Дослідження Гоцуляка Н.Я. виконувались на базі відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України у зв'язку з темами наукових досліджень: «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 злоякісних новоутворень» (номер державної реєстрації – 0117U002123, 2017-2019 рр.), «Характеристика нових молекулярно-генетичних маркерів злоякісних 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 отриманих результатів.** Науковим здобутком дисертації є встановлення наявності низки функціональних та регуляторних зв'язків між ізоформами p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1, паракринною сигналізацією фібробластів, функціонуванням mTOR-сигнальної мережі та експресією білків залучених до здійснення міграційного циклу. Автором показано здатність mTOR/S6K1-сигнальної ланки у клітинах раку молочної залози сприймати та опосередковувати вплив молекул паракринної

сигналізації фібробластів. Продемонстровано здатність дермальних фібробластів паракринно посилювати активність міграції клітин раку молочної залози у двовимірних та тривимірних умовах, за одностороннього впливу та двосторонньої взаємодії, а також залучення до регуляції цієї активації mTOR/S6K1-сигнальної ланки. Показано, що дія молекул паракринної сигналізації, продукованих фібробластами, може нейтралізувати ефект рапаміцину на рухливість пухлинних клітин. Продемонстровано здатність дермальних фібробластів обмежувати активність міграції клітин раку молочної залози за умов прямої фізичної взаємодії у тривимірних умовах. У ході роботи встановлено залучення ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 та відмінності їхніх ролей у: регуляції клітинної рухливості під впливом паракринної сигналізації фібробластів; підтриманні нормальної морфології клітин раку молочної залози; здатності до самоорганізації у просторі у вигляді багатоклітинних сфероїдів та реалізації стратегій клітинної міграції; регуляції активності елементів PI3K/AKT/mTOR-сигнального шляху – кіназ AKT, GSK-3 $\beta$  та eEF2K; регуляції ступеню фосфорилування білків S6, RAPTOR та білків-мішеней кінази AKT; експресії білків клітинної адгезії – CD326, CD227 та CD66e; експресії білків клітинної адгезії з функціями механорецепції – CD29 та CD44; активності регулятора ремоделювання адгезиних контактів – кінази FAK; активності експресії білків цитоскелету –  $\beta$ -актину та гістіоспецифічних – цитокератинів і віментину; експресії білка щільних контактів – ZO-1. Розроблено та адаптовано модифікацію моделі «раневої поверхні», що уможлиблює вимірювання з її використанням міграційної активності клітин за умов співкультивування.

#### **Теоретичне значення результатів дисертаційного дослідження.**

Ідентифікація нових регуляторних зв'язків mTOR/S6K1-сигнальної ланки у клітинах раку молочної залози та у пухлино-стромальній взаємодії поглиблює розуміння її ролі у процесах ініціації, розвитку та метастазування злоякісних новоутворень загалом та раку молочної залози зокрема, а також сприятиме подальшому більш глибокому вивченню функціонування цієї ланки у нормі та

патології. Отримані результати дають підставу розглядати S6K1 як ключовий компонент системи регуляції рухливості клітин раку молочної залози загалом та під впливом паракринної сигналізації фібробластів мікрооточення зокрема.

**Практичне значення результатів дисертаційного дослідження.**

Результати досліджень можуть бути корисними для урахування при експериментальному моделюванні пухлинного росту та розробці стратегій ефективної терапії раку. Крім того, продемонстрована виразна та багатогранна участь ізоформ кінази S6K1 у регуляції клітинної рухливості та пухлино-стромальної взаємодії дозволяє розглядати їх у якості перспективних мішеней таргетної терапії раку. Розроблена та адаптована у даній роботі модифікація моделі «раневої поверхні» може бути застосована як для дослідження базових механізмів канцерогенезу, так і для розробки протипухлинних препаратів з урахуванням гетеротипових паракринних взаємодій.

**Особистий внесок здобувача.** Всі дослідження, представлені у дисертаційній роботі, було виконано особисто або за безпосередньої участі здобувача.

**Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Обґрунтованість дисертаційної робота Гоцуляка Н.Я. є достатньою та базується на детальному аналізі літературних джерел за проблемою, що вирішувалась в ході виконання даної роботи, чітко визначеній меті та коректній постановці завдань дослідження, використанні сучасних методів досліджень, якісній візуалізації та вичерпному аналізі результатів роботи зі статистичною обробкою, коректному та чіткому формулюванні висновків дисертації. Обґрунтованість і достовірність результатів досліджень, отриманих в рамках дисертаційної роботи, підтверджено апробацією на семінарах та конференціях, а також публікаціями статей у наукових фахових виданнях та статей у журналах, що входять до міжнародної наукометричної бази SCOPUS.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті.** Основні положення та результати досліджень достатньо повно викладено у 12 наукових працях, серед яких 5 статей у виданнях, що входять до наукометричної бази SCOPUS та 7 тез доповідей у збірниках матеріалів вітчизняних та міжнародних наукових конференцій. Роботи опубліковані протягом 2014-2020 років. Автореферат оформлений грамотно, його зміст відповідає основним положенням дисертації і добре ілюстрований рисунками, передусім блотограмами високої якості.

**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»* повністю відповідає вимогам, що висуваються до кандидатських дисертацій в Україні.

Дисертація побудована за традиційною схемою і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел. Робота викладена грамотною науковою мовою на 146 сторінках.

Розділ «Огляд літератури» побудований на аналізі 128 літературних джерел, переважна більшість із яких сучасні. В огляді літератури викладені основні дані про об'єкт дослідження (молекулярні механізми функціонування mTOR-сигнальної мережі у клітинах аденокарциноми молочної залози людини). Літературні дані викладені чітко, логічно, із дотриманням причинно-наслідкових зв'язків. Розділ *«Огляд літератури»* дає чітке уявлення про стан проблеми і важливість продовження наукових досліджень в межах, визначених автором.

Експериментальна частина роботи виконана із залученням низки сучасних методів біологічних досліджень, підбір яких повністю відповідає досягненню поставлених задач. Серед них: культивування та співкультивування клітин людини (дво- та тривимірне), отримання первинної культури дермальних фібробластів людини, ПЛР-тестування на контамінацію клітинної культури мікоплазмами, електрофоретичне розділення білків, імуноблот аналіз, денситометричний аналіз блотограм, імунофлюоресцентний аналіз, світлова та конфокальна мікроскопія, формування та стандартизація багатоклітинних сфероїдів, морфометричний аналіз багатоклітинних сфероїдів, вимірювання міграційної активності клітин на моделі «раневої поверхні» та моделі «реверсії багатоклітинного сфероїда». Також в розділі описано розроблену модифікацію моделі «раневої поверхні», що уможливорює вимірювання з її використанням міграційної активності клітин за умов співкультивування.

В цілому, докладний опис методів роботи дає змогу при необхідності відтворити умови експерименту і дозволяє зробити висновок про адекватність обраних методів.

Результати досліджень викладено з належною повнотою і наведенням відповідних графіків, схем, блотограм та мікрофотографій. В дисертаційній роботі були отримані результати, що свідчать про наявність низки функціональних та регуляторних зв'язків між ізоформами p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1; паракринною сигналізацією фібробластів; міграційною активністю пухлинних клітин за різних умов; функціонуванням mTOR-сигнальної мережі, зокрема її ланок кінази АКТ та білкового комплексу mTORC1; функціонуванням кіназ FAK, GSK-3 $\beta$ , eEF2K, білків S6 та RAPTOR; експресією білків залучених до здійснення міграційного циклу, зокрема білків клітинної адгезії CD326, CD227 та CD66e, білків-механорецепторів – CD29 та CD44, білків цитоскелету  $\beta$ -актину, цитокератинів і віментину, білка щільних контактів – ZO-1.

У роботі проведена ретельна статистична обробка отриманих результатів.

Викладення і аналіз результатів свідчить про глибоке володіння автором знаннями з широкого кола проблем, що стосуються галузі досліджень.

Висновки роботи є ємними, розгорнутими і належним чином відображають отримані результати.

**Зауваження та побажання.** При аналізі дисертаційної роботи Гоцуляка Н.Я. принципових зауважень наукового характеру щодо викладених результатів не виникло. Окремі зауваження і побажання стосуються переважно аналізу отриманих даних та редакційного оформлення тексту роботи:

1. Як розрізняли мігруючі пухлинні клітини і клітини фібробластів при їх сумісному культивуванні на моделі «раневої поверхні»? Морфологічно?
2. Як пояснити, що міграційно найактивніші клітини клону з нокдаунами ізоформ р85S6K1 та р70S6K1 на конфокальних фотографіях найбільш сильно взаємодіють одна з одною?
3. Необхідно узгодити масштаби мікрофотографій (рис. 3.1).
4. У огляді літератури не наведено відомості про молекули адгезії, які досліджувались у роботі.
5. Потрібно узгодити порядок підрозділів у розділі 3.1.
6. В роботі зустрічаються поодинокі синтаксичні та друкарські помилки.

Зауваження, подані вище, не впливають на загальну позитивну оцінку наукової новизни результатів і висновків дисертації.

**Висновок.** Дисертаційна робота Гоцуляка Н.Я. є закінченою, самостійною науковою працею, в якій отримано низку нових даних, важливих як у теоретичному, так і в практичному аспекті. Результати роботи є достовірними. Всі основні положення дисертації відображені у авторефераті. Основний зміст дисертації опублікований у 12 друкованих працях, серед них 5 статей у фахових наукових виданнях.

За своєю актуальністю, методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, новизною отриманих результатів, логічністю, обґрунтованістю висновків представлена до захисту дисертаційна робота *«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 з Постановами Кабінету Міністрів України №656 від 19.08.2015 р., №1159 від 30.12.2015 р. та №567 від 27.07.2016 р.), а її автор, Гоцуляк Назарій Ярославович, заслуговує присудження йому наукового ступеню кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

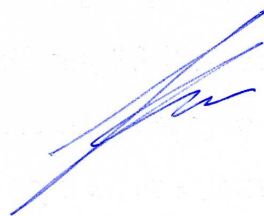
### Офіційний опонент

Завідувач лабораторії імунобіології

Інституту біохімії імені О. В. Палладіна

НАН України

доктор біологічних наук, професор



Д. В. Колибо

