

ВІДГУК
ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Горак Ірини Романівни

«Роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі міграції й інвазії

пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo*»

на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю

03.00.04 - біохімія

Окрім традиційних методів лікування онкологічних новоутворень, серед яких рак грудної залози займає одне з перших місць за кількістю випадків та смертністю, до яких відносяться хірургічне видалення пухлин, радіо- та хіміотерапія, зараз активно розробляються новітні підходи таргетної терапії, що базуються на використанні специфічних мікроРНК, антитіл, блокувальних агентів, інгібіторів клітинного сигналювання тощо, а також неінвазивні методи первинного скринінгу і ранньої діагностики раку. Проте, актуальними залишаються завдання боротьби з хіміорезистентністю пухлинних клітин, метастазуванням та виникненням рецидивів. Серед перспективних мішеней для комплексної протипухлинної терапії виділяють інгібітори компонентів сигнальних мереж, залучених до контролю процесів проліферації, диференціювання, клітинної загибелі, рухливості, ангіогенезу, адгезії пухлинних клітин. До таких молекулярних мішеней належать адаптерні протеїни, які взаємодіють з компонентами сигнальних шляхів. Одним з таких протеїнів є Ruk/CIN85, експресія якого у пухлинах є вищою, ніж у нормальних тканинах, і асоційована з наявністю дистантних метастазів, проте молекулярні механізми його участі у контролі інвазивності та метастазування до кінця не з'ясовані.

З огляду на зазначене актуальність запропонованого наукового дослідження не викликає сумнівів.

Дисертаційна робота Горак І. Р. виконувалась відповідно до планів наукових досліджень відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України у 2010-2019 роках.

Роботу побудовано за традиційною схемою і викладено на 176 сторінках, проілюстровано 30 рисунками і 3 таблицями, список використаних джерел включає 317 найменувань. Дисертаційна робота включає такі стандартні розділи, як вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, експериментальну частину, узагальнення результатів досліджень, висновки, список використаних джерел.

Вступ містить достатню аргументацію актуальності роботи, постановку мети та відповідних завдань дослідження, обґрунтування наукової новизни дослідження та практичної цінності отриманих результатів, що виносяться на захист. У вступі також зазначено особистий внесок здобувача.

В огляді літератури приведено загальну характеристику адаптерних протеїнів і, зокрема, протеїну Ruk/CIN85, та його участі в контролі сигналювання клітини, а також висвітлені значення епітелійно-мезенхімної пластичності та розвитку фенотипу ракових стовбурових клітин для процесу метастазування.

При виконанні роботи дисертантом застосовано широкий спектр сучасних методів біохімії, молекулярної та клітинної біології, а саме: методи роботи з культурою клітин, Вестерн-блот аналіз, кількісна ПЛР, конфокальна флуоресцентна мікроскопія, визначення ензиматичної активності, робота з експериментальними тваринами, методи статистичної обробки даних. Цей розділ демонструє відмінне володіння автором сучасними методичними підходами.

Розділ «Результати досліджень» складається з шести підрозділів, які логічно пов'язані між собою і відображають послідовні завдання, поставлені відповідно до мети роботи. Автором одержано сублінії клітин аденокарциноми грудної залози миші лінії 4T1 зі стабільною надекспресією та пригніченою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

Продemonстровано участь протеїну Ruk/CIN85 у контролі основних властивостей пухлинної клітини, асоційованих з епітелійно-мезенхімним переходом (проліферація, адгезивність, рухливість, інвазивність). Дисертантом вперше досліджено експресію низки EMT-асоційованих генів у клітинах з різним вмістом Ruk/CIN85, виявлено ознаки амебоїдного типу міграції/інвазії у клітинах 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85, встановлено, що пригнічення інвазії у клітинах з пониженим регулюванням Ruk/CIN85 відбувається у залежний від активації MMP-2 та MMP-9 спосіб, шляхом продукування ангіостатинів.

Автором було виявлено також, що надекспресія Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 супроводжується посиленням прояву ознак ракових стовбурових клітин, а саме: зростанням рівнів експресії поверхневих маркерів та транскрипційних факторів, асоційованих з репрограмуванням, збільшенням здатності до росту і проліферації у не прикріпленому стані, стійкістю до доксорубіцину, зростанням активності альдегіддегідрогенази. На тваринній моделі було продемонстровано посилення метастатичного потенціалу клітин 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85, а також індукування мезенхімно-епітелійного переходу в клітинах легеневих метастазів. Автор робить висновок про те, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах аденокарциноми грудної залози миші лінії 4T1 супроводжується набуттям епітелійно-мезенхімної пластичності, яка необхідна для метастазування пухлинних клітин та забезпечення резистентності до протипухлинної терапії.

Результати дисертаційної роботи мають перспективу практичного застосування. Отримані дані стосовно участі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі молекулярних, біохімічних і функціональних ознак епітелійно-мезенхімної пластичності свідчать про те, що цей протеїн може стати потенційною мішенню для дії протипухлинних препаратів, скерованих на ракові стовбурові клітини та пухлинні клітини, що мають гібридний епітелійно-мезенхімний/амебоїдний фенотип. Створені сублінії клітин лінії

4T1 зі стабільною надекспресією Ruk/CIN85 можуть бути використані для тестування нових протипухлинних препаратів, скерованих на знищення ракових стовбурових клітин.

В останньому розділі автором проведено узагальнення та аналіз отриманих експериментальних даних з урахуванням даних джерел літератури.

В цілому, висновки і основні положення дисертаційної роботи Горак Ірини Романівни відповідають меті та поставленим завданням дослідження, повністю базуються на власних результатах досліджень. Статистична обробка результатів відповідає сучасним вимогам до наукових публікацій, а їх достовірність не викликає сумніву.

Результати дисертаційної роботи Горак І. Р. у повному об'ємі опубліковано в провідних фахових виданнях, рекомендованих для захисту кандидатських дисертацій та пройшли всебічну апробацію на вітчизняних та міжнародних конференціях, конгресах. За темою дисертації опубліковано 30 наукових робіт, 5 з яких представлені у вигляді статей в профільних наукових виданнях, 1 – у вигляді патенту на корисну модель. Автореферат дисертації повністю відображає зміст дисертаційної роботи.

Однак, до роботи є деякі зауваження та побажання:

1. Вважається, що «класичним» індуктором ЕМТ є TGF β . Було б цікаво дослідити сигналювання, залежне від TGF β , у клітинах з різними рівнями експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.
2. Чи знижуються експресія і активність матриксних металопротеїназ в інших клітинних лініях при надекспресії Ruk/CIN85? Чи універсальний цей феномен?
3. Які фактори впливають на рівень експресії Ruk/CIN85 в клітині? Центри зв'язування яких транскрипційних факторів знайдені у промоторі Ruk/CIN85?

4. З роботи не зрозуміло, чому підвищена проникність капілярів легені до барвника Evans Blue свідчить про посилене екстравазування. Роз'ясніть цей момент.
5. МТТ тест відображає активність дегідрогеназ клітини, тому його не можна вважати тестом на проліферацію.
6. Наскільки правомірне узагальнення відносно «Ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі міграції й інвазії пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo*», оскільки ретельне експериментальне дослідження було проведено лише на клітинах раку молочної залози?

Зауваження, запитання та побажання, що виникли під час рецензування дисертаційної роботи ніяким чином не впливають на загальне позитивне враження щодо представленої до захисту роботи.

Вважаю, що робота за своєю актуальністю, об'ємом, науково-практичною значимістю, новизною отриманих результатів та всебічним аналізом відповідає вимогам постанови КМ України від 24 липня 2013 року №567 "Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника", а її автор Горак Ірина Романівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент:

Завідувач відділу функціональної геноміки

Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

д.б.н., професор,

член-кореспондент НАН України

Риндич

А. В. Риндич



Підпис *Горак І.Р.*
посвідчується
Зав. відд. Ш. Риндич