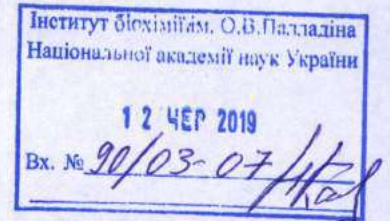


ВІДГУК



офіційного опонента на дисертаційну роботу Горак Ірини Романівни на тему «РОЛЬ АДАПТЕРНОГО ПРОТЕЇНУ RUK/CIN85 У КОНТРОЛІ МІГРАЦІЇ Й ІНВАЗІЇ ПУХЛИННИХ КЛІТИН *IN VITRO* ТА *IN VIVO*» представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.04 – біохімія

1. **Актуальність теми дисертації.** Успішність терапії раку грудної залози залежить не лише від вчасного встановлення діагнозу на ранній стадії захворювання, але й постійного моніторингу за перебігом захворювання та запобігання виникненню рецидивів. Розвиток агресивного фенотипу пухлин пов'язаний з прогресією в напрямку метастазування за рахунок формування клону стовбурово-подібних пухлинних клітин. Тому, підбір інтегральних молекулярно-клітинних та біохімічних показників, які дозволяють враховувати ризики метастазування захворювання з визначенням клону стовбурово-подібних клітин, для яких характерним є процеси мезенхімно-епітеліального переходу з так званим мезенхімно-амебоїдним фенотипом є новітнім напрямком молекулярно-діагностичної онкології. На сьогодні лікування первинної пухлини раку грудної залози поєднує ряд класичних методів таких як хірургія, хіміотерапія, променева терапія, а останнім часом і мішенева («таргетна») терапія і є достатньо успішною, однак визначення ризиків метастатичного ураження і виникнення рецидивів на ранніх етапах потребує новітніх підходів. Набуття мезенхімно-амебоїдного міграційного фенотипу є передумовою для виникнення субклінічних метастазів, екстравазії в органи мішені, залучення клітин та гуморальних факторів, що формують мікрооточення для метастатичного клону та відновлення епітеліального фенотипу пухлинного клону і експресію факторів, що активують проліферацію клітин. В зміні

фенотипу клітин важливу роль відіграють адаптерні білки Ruk/CIN85 (Regulator for ubiquitous kinase/Cbl-interacting protein of 85 kDa), для яких описано близько 300 протеїнів-партнерів, шляхом взаємодії з якими цей адаптерний протеїн бере участь у таких процесах як ендоцитоз активованих рецепторних тирозинкіназ, проліферація, організація і біогенез елементів цитоскелету, адгезія, інвазивність, апоптоз. Отже поставлені автором мета та завдання щодо встановлення ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі міграції й інвазії пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo* є актуальними та обґрунтованими.

Дисертаційна робота виконана у відповідності з планами наукових досліджень відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. У роботі використані результати досліджень, отримані в рамках бюджетних тем "Механізми участі адаптерного/риштувального білка Ruk/CIN85 у регулюванні біологічних відповідей нормальних і трансформованих клітин" (№ держреєстрації 0110U002698, 2010-2014 рр.), «Сигнальні мережі, залежні від адаптерного протеїну Ruk/CIN85, у контролі проліферативного потенціалу, міграції й метастазування пухлинних клітин» (№ держреєстрації 0112U002624, 2015-2019 рр, а також ряду програм фонду фундаментальних досліджень та україно-швейцарського проекту.

2. **Наукова новизна роботи** полягає у виявленні вираженого зв'язку між надекспресією Ruk/CIN85 в пухлинних клітинах грудної залози та їх підвищеною рухливістю, інвазивністю та хіміорезистентністю, змінами у EMT-залежній транскрипційній програмі *in vitro*, а також посиленням екстравазування пухлинних клітин та ростом метастазів *in vivo*. В роботі виявлено закономірність між пригніченням експресії Ruk/CIN85 та втратою пластичності пухлинних клітин і індукції диференціювання. Наведені дані про здатність Ruk/CIN85 спричиняти системні ефекти на транскрипційному рівні є цілком новими. Встановлено найважливіші зміни, необхідні для підтримки амебоїдного типу інвазивності: зниження активності матриксних

протеїназ MMP-2, MMP-9 та катепсину D, TGF- β 2 і інтегрину β 1, а також підвищення рівня експресії й активності лізилоксидози, реорганізація актинових філаментів.

3. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.

Дисертаційна робота вирішує актуальну науково-практичну задачу, в якій на основі визначення рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 як важливого регулятора епітеліально-мезенхімного переходу при раку грудної залози можливо запропонувати новітній молекулярно-біологічний підхід в якості діагностично-прогностичного фактора перебігу даного новоутворення з метою індивідуалізації комплексного лікування захворювання. В рамках дисертаційної роботи автором запропонований комплекс досліджень молекулярно-біохімічного профілю експресії білків-партнерів адаптерного протеїну Ruk/CIN85 за розвитку раку грудної залози в клініці та експерименті з метою запобігання ранньому метастазуванню та виникненню рецидивів.

4. Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертанткою проведено експериментальне дослідження з використанням сучасних методичних підходів, а саме молекулярно-біологічних, гістологічних, біохімічних, колориметричних, морфометричних, методу культури клітин та експериментальної онкології. Отримані результати проаналізовано за допомогою сучасних статистичних методів обробки даних. Використані методи дослідження повністю відповідають меті, завданням дисертації та сучасним вимогам щодо підтвердження наукових досліджень. Отриманий матеріал базується на фактичних даних, що відповідають первинній документації і забезпечують вірогідність отриманих даних, зроблені висновки відображають поставлені завдання дисертаційної роботи.

5. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому та ідентичності змісту автореферату й основних положень дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та

методів дослідження, розділу результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаної літератури, який включає 317 першоджерел. Робота викладена на 176 сторінках, проілюстрована 30 рисунками та 3 таблицями.

Розділ 1. «Огляд літератури» містить 3 підрозділи, в яких автором проаналізовано роль адаптерних протеїнів у сигналюванні клітини, охарактеризовано морфофункціональні характеристики адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та визначено його роль в молекулярних механізмах метастазування пухлин. Детально проаналізовано літературні дані щодо регуляторних властивостей адаптерних протеїнів в сигнальних каскадах трансформованих клітин та потенціальне їх використання як мішеней в протипухлинній терапії. Даний розділ ілюстрований рисунками та схемами, які показують багатофункціональну роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в формуванні фенотипу клітин, які представляють метастатичний клон.

До даного розділу є декілька зауважень:

- 1) Підрозділ 1.3. Молекулярні механізми метастазування пухлинної клітини – не досить вдала назва, оскільки процес метастазування відносять загалом до пухлин, а не до окремої пухлинної клітини;
- 2) в кінці розділу огляд літератури доцільно було б навести узагальнююче резюме, яке б логічно підводило до мети та завдань проведення власних досліджень щодо експресії та функціонування адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та його ролі в пластичності пухлинних клітин.

Розділ 2. «Матеріали та методи досліджень» складається з 28 сучасних методів досліджень, які включають комплекс молекулярно-біологічних, біохімічних, морфологічних, методів культури клітин та експериментальної онкології. Методи, які застосовані в даному експериментальному дослідженні, вражають високотехнологічними підходами, створенням модельних систем, що дозволяють на молекулярному, клітинному та системному рівні проаналізувати роль

адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в прогресуванні/регресуванні метастатичного клону пухлинних клітин. Для визначення метастатичного клону клітин застосовано оригінальні підходи клітинної біології, такі як дослідження міграційних властивостей клітин за допомогою тесту на заростання подряпини *in vitro*, оцінювання інвазивності клітин *in vitro* з використанням модифікованої камери Бойдена, а також вивчення динаміки міграції та інвазії клітин з надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 порівняно з клітинами з низькою експресією Ruk/CIN85. Важливими методичними підходами для визначення онкогенності клітин та їх медикаментозної резистентності були тест на сфероїдоутворення та дослідження резистентності клітин 4T1 з різним вмістом Ruk/CIN85 до доксорубіцину

Проте, до деяких методів експериментального дослідження є запитання.

- 1) В підрозділах 2.2.23 Оцінювання проникності капілярів легені *in vivo* та 2.2.24 Оцінювання здатності до колонізації легені *in vivo* не уточнено, які клітини вводили тваринам при оцінці вищевказаних показників.
- 2) Також, при морфологічному аналізі рівня метастазування було б доцільним визначити об'єм метастатичного ураження легені, і чи можна вважати, що в системі різної кількості «+», або їх відсутності можливо достовірно проводити напівкількісну оцінку ефективності метастазування? На які літературні дані Ви посилались при визначенні рівня метастазування даним методичним підходом?
- 3) Якщо ж це оригінальна методика, то поясніть яким чином Ви проводили стандартизацію гістологічних досліджень для оцінки рівня метастазування?

Розділ 3. «Результати власних досліджень» складаються з 6 підрозділів, в яких наведені результати щодо отримання субліній клітин

аденокарциноми грудної залози миші лінії 4T1 зі стабільною надекспресією та пригніченою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та проведено аналіз їх властивостей, асоційованих з ЕМТ залежно від рівня експресії Ruk/CIN85 в отриманих сублініях. Пригнічення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 супроводжувалась достовірним зростанням їх адгезивності до різних компонентів позаклітинного матриксу у порівнянні з контрольною сублінією Scr. Також виявлено, що клітини з високим вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85 характеризуються активною рухливістю та інвазивністю, тобто високим метастатичним потенціалом. Отримані автором дисертаційної роботи результати вказують на зв'язок надекспресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у аденокарциномних клітинах лінії 4T1 із зростанням інтенсивності їх міграції через напівпроникну мембрану та інвазії через шар Матригелю. Дослідження біохімічних та молекулярних маркерів MAT/MET в клітинах з різним рівнем експресії Ruk/CIN85 дали змогу авторові оцінити морфофункціональну пластичність пухлинних клітин, які метастазували, що проявлялось в формуванні кортикального F-актинового кільця та мембранних вип'ячувань та посиленням міграційної активності. Для дослідження ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у розвитку ознак, властивих раковим стовбуровим клітинам автором було обрано ряд функціональних тестів таких як ріст клітин в 3D мамосферах, визначення співвідношення експресії CD44/CD24, а також визначення рівня активності альдегіддегідрогенази (АЛДГ), яку пов'язують із міграцією та метастазуванням пухлинних клітин. Для визначення резистентності до доксорубіцину порівнювали клітини з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Було зафіксовано, що клітини з високим рівнем експресії Ruk/CIN85 виживають при суттєво вищих концентраціях доксорубіцину в середовищі інкубації порівняно з клітинами з низьким рівнем експресії Ruk/CIN85. При визначенні ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у метастазуванні *in vivo* було застосовано ряд методичних підходів таких як трансендотеліальна міграція, проникність капілярів легені до барвника

Evans Blue, ефективність колонізації легені, метастазування в легеню на моделі експериментального метастазування.

Проте, для повноти даного блоку експериментальних досліджень було б доцільним провести визначення кількості та об'єму метастатичного ураження легені.

Дисертація завершується аналізом та узагальненням результатів та висновками, які є аргументованими та відповідають поставленим меті та завданням. Автором наголошується, що в результаті комплексного дослідження виявлено участь адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі епітелійно-мезенхімної пластичності пухлинних клітин на моделях *in vitro* та *in vivo*. Даний феномен вказує на те, що високий рівень експресії Ruk/CIN85 в клітинах 4T1 призводить до розвитку високо агресивного, гібридного мезенхімно-амебоїдного фенотипу, тоді як пригнічення експресії адаптерного протеїна – до фіксування клітин 4T1 у гомогенному епітеліальному стані і блокування епітелійно-мезенхімної пластичності.

Перелік використаних джерел літератури містить 317 посилань українською та іноземними мовами, переважна більшість яких опублікована в останні 5 років.

Таким чином, дисертація Горак Ірини Романівни «Роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі міграції й інвазії пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo*» є завершеною науковою роботою. Основні положення та висновки дисертації повністю викладені в авторефераті.

6. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях.

Автором проведено висвітлення матеріалів роботи на вітчизняних та міжнародних тематичних конференціях та з'їздах. За темою дисертації опубліковано 30 робіт, які включають 5 статей у фахових виданнях, патент на корисну модель та тези 24 доповідей на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях, з'їздах, конгресах. При рецензуванні опублікованих статей встановлено, що вони мають необхідні елементи в своїй структурі. Публікації містять постановку загальної проблеми та її зв'язок із важливими

науковими та практичними завданнями, аналіз останніх досліджень, в яких започатковано розв'язання проблеми, на яку спирається автор. Інтерпретація отриманих даних, основні положення, що виносяться на захист, та висновки належать автору.

Всі публікації повністю відображають результати та суть дослідження, що надано у основних розділах дисертації.

7. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту і оформлення.

За позитивної оцінки, проведеної автором роботи, можна відзначити наявність деяких загальних недоліків дисертації.

1. Автором не досить вдало, на мою думку, сформульовано мету «Метою дослідження було дослідити роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі міграції й інвазії пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo*.» можна було б «Метою роботи було...», або ж «Метою дослідження було з'ясувати/визначити...»

2. В роботі зустрічаються різні назви щодо субліній клітин, використаних в дослідженні: зокрема, клітини з надекспресією Ruk/CIN85, RukUp, клітини з Up-регулюванням Ruk/CIN85. То дані назви стосуються одних і тих же клітин, чи можливо ще якісь у Вас були використані в експериментальних дослідженнях?

3. В деяких розділах не уточнюється, які клітини використовували для культивування, або ж для введення тваринам для визначення системних ефектів.

4. Також зустрічаються назви легені в однині та множині. Що Ви можете зазначити з цього приводу?

5. Зустрічаються по тексту громіздкі, стилістично невдалі речення, орфографічні помилки.

6. Також слід було розширити наукову новизну, а саме фундаментальне значення ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85, і практичне значення проведених досліджень.

Частина зауважень та запитань прокоментовано у вищенаведеному тексті при рецензуванні різних розділів даної роботи.

Однак, слід підкреслити, що зазначені зауваження, недоліки та поставлені питання не знижують загальної позитивної оцінки та визнання науково-теоретичного та практичного значення запропонованих науково обґрунтованих і впроваджених в навчальний процес результатів дисертаційної роботи.

8. **Відповідність дисертації встановленим вимогам.** Дисертаційна робота Горак Ірини Романівни на тему «Роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі міграції й інвазії пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo*» є закінченим науковим дослідженням. Робота відповідає вимогам пп.11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а пошукач заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.04 – біохімія.

Професор кафедри біомедицини
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка,
д.б.н., проф.



Л.В.Гарманчук

ПІДПИС ЗАСВІДЧУЮ
ВЧЕНИЙ СЕКРЕТАР НАЧ
КАРАУЛЬНА Н.В.
11.06.2019р.

