

ЗАПИТ
на проведення наукової (науково-технічної) роботи

1. Назва роботи

Ідентифікація нових молекулярних маркерів чутливості та розробка персоналізованих підходів метаболічної ензимотерапії злоякісних пухлин на основі голодування за аргініном

2. Вид тематики

II. Програмно-цільова та конкурсна тематика НАН України

3. Назва цільової програми або цільового проєкту

Цільова програма наукових досліджень НАН України «Геномні, молекулярні та клітинні основи розвитку інноваційних біотехнологій» на 2020–2024 рр.

4. Назва розділу програми або напрямку цільового проєкту

н е м а є

5. Строки виконання роботи

01 квітня 2020 р. - 31 грудня 2024 р.

6. Код програмної класифікації видатків

6541030 (фундаментальні дослідження)

7. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Фундаментальні наукові дослідження з найбільш важливих проблем розвитку науково-технічного, соціально-економічного, суспільно-політичного, людського потенціалу для забезпечення конкурентоспроможності України у світі та сталого розвитку суспільства і держави

8. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Фундаментальні проблеми наук про життя та розвиток біотехнологій

9. Код та назва наукового напрямку (проблеми) з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук




2.2.4.1. Вивчення механізмів регуляції функціональних систем організму за умов норми і патології

2.2.4.3. Вивчення молекулярно-генетичних основ регуляції метаболічних процесів при пухлинній хворобі

10. Науковий керівник роботи

Стасик Олег Володимирович, д.б.н., с.д., завідувач відділу, Інститут біології клітини НАН України
телефон: +38 032 261 2146; факс: +38 032 261 2148; e-mail: StasykOV@nas.gov.ua

11. Відповідальні виконавці

Прізвище, ім'я та по батькові	Науковий ступінь, посада, місце роботи, телефон, електронна адреса	Підпис
Бобак Ярослав Петрович	к.б.н., старший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032)2612146, e-mail: bobak@cellbiol.lviv.ua	
Вовк Олена Іванівна	к.б.н., молодший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032)2612146, e-mail: vovkoliv@gmail.com	
Чень Олег Ігорович	к.б.н., молодший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032) 2612146, e-mail: chen_oi@nas.gov.ua	

12. Установи - співвиконавці

н е м а є

13. Ключові слова

протипухлинна ензимотерапія, маркери чутливості, експресія генів

14. Резюме

Метою запропонованих досліджень є ідентифікація нових молекулярних маркерів чутливості клітин пухлин людини до метаболічної ензимотерапії на основі голодування за аргініном, з метою прогнозування ефективності відповідної терапії злоякісних пухлин та розробки її нових персоналізованих та комбінаційних підходів. Метаболічна ензимотерапія, що базується на використанні рекомбінантних ферментних препаратів, які знижують вміст деяких вільних амінокислот, специфічно важливих для росту пухлинних клітин, є одним із альтернативних підходів онкотерапії, що активно розвивається у світі. Зокрема, метаболічна терапія на основі рекомбінантного ферменту деградації аргініну, аргінази людини I, проходить міжнародні клінічні випробування. Відповідна терапія є селективною і малотоксичною, але водночас потребує розробки більш ефективних комбінаційних підходів на її основі та підходів щодо її персоналізованого застосування. Запропонована робота базується на широкому попередньому досвіді колективу авторів, підтверженому численими високорейтинговими публікаціями, монографією та патентом. Шляхом отримання ізогенних субліній пухлин людини різного органного походження з різною чутливістю до дефіциту аргініну, аналізу задіяних у клітинній відповіді окремих білкових маркерів та сигнальних механізмів, зокрема сигнальних каскадів АМПК, та PI3K-АКТ, GCN2, mTOR, та MAP кіназ, білків теплового шоку та інш., буде ідентифіковано молекулярні маркери, зокрема специфічні для певних типів пухлин, статус яких корелює із чутливістю до дефіциту екзогенного аргініну. На підсумковому етапі роботи буде проведено аналіз впливу напрямлених змін відповідних маркерів на виживання злоякісних клітин за дії терапії з метою пошуку нових ефективних хемотерапевтичних комбінаційних підходів на її основі. Робота матиме не лише прикладне, але і фундаментальне значення для розуміння механізмів сигналювання амінокислот у трансформованих клітинах.

15. Обґрунтування доцільності виконання роботи

15.1. Цілі та завдання роботи, її актуальність, соціальна та економічна значимість.

Як причина захворюваності та смертності людини онкопатології займають глобальне друге місце, поступаючись лише захворюванням серцево-судинної системи. Згідно даних МОЗ, в Україні щорічно реєструється 140 тис. нових випадків онкозахворювань, від яких щорічно помирає 90 тис. чоловік, з них 35% людей працездатного віку. Злоякісні новоутворення вражають в Україні кожного четвертого чоловіка і кожну шосту жінку. Кожен другий-третій онкохворий помирає впродовж першого року хвороби, що у декілька разів перевищує аналогічний показник у розвинених країнах, що свідчить про недостатній рівень діагностики раку та ефективності його лікування.

Основними підходами при лікуванні онкозахворювань залишаються хірургічне видалення пухлин та використання хіміо- та радіотерапії. Однак традиційні протипухлинні препарати виявляють як правило обмежену селективність і, як наслідок, значну загальну токсичність для клітин різних тканин і органів людини. Таким чином, пошук альтернативних персоналізованих і нетоксичних для організму в цілому підходів до терапії раку залишається актуальним завданням сучасної біології та медицини.

15.2. Стан розроблення проблеми.

Одним із альтернативних підходів онкотерапії, що активно розвивається у світі, є метаболічна ензимотерапія, що базується на використанні рекомбінантних ферментних препаратів, які знижують вміст деяких вільних амінокислот речовин, специфічно важливих для росту пухлинних клітин. Відомо, що деякі типи пухлин є ауксотрофами (нездатними до біосинтезу) за аспарагіном, метіоніном чи аргініном, та виявляють підвищену чутливість до голодування за цими амінокислотами. Це привернуло значний інтерес до розробки терапії раку на основі рекомбінантних ферментів, що розщеплюють вищезгадані амінокислоти – аспарагінази, метіонінази, аргініндеімінази та аргінази. Найбільш успішним прикладом є використання рекомбінантної аспарагінази для лікування гострих лімфобластичних лейкозів (Lopez et al., 2017; Paul et al., 2019). Іншим, з певних причин менш успішним прикладом, що перебуває на стадії доклінічних та окремих клінічних досліджень, є використання ферменту метіонінази для створення дефіциту метіоніну в організмі з метою гальмування росту різних типів пухлин (Hoffman, 2015).

Протипухлинна терапія з використанням альтернативних рекомбінантних ферментів деградації аргініну, аргініндеімінази й аргінази, на даний момент знаходяться на фазі лабораторних досліджень та клінічних випробувань у декількох країнах, включаючи Китай, Великобританію та США (Kuo et al., 2010; Yau et al., 2015; Stasyk et al., 2015; Riess et al., 2018). Вперше цей тип терапії був застосований щодо гепатокарцином та меланом

людини, для яких досі не існує достатньо ефективних методів лікування (Wheatley et al., 2005). Наступні дослідження виявили, що потенційно чутливими до відповідної ензимотерапії є такі агресивні типи пухлин як карцином кишківника, нирок, голови та шиї, яйників, простати, мезотеліоми, гліоми, ретинобластоми та ряд лейкозів (Stasyk et al., 2015; Fultang et al., 2016). Однак молекулярні механізми, що лежать в основі підвищеної чутливості ряду злоякісних клітин до дефіциту аргініну, залишаються поки-що не повністю з'ясованими, що значно гальмує практичне застосування ензимотерапії. Складність пошуку причин чутливості пухлинних клітин до голодування за аргініном зумовлена комплексним характером метаболізму цієї амінокислоти в організмі людини. На відміну від багатьох інших амінокислот, аргінін є необхідним не лише для біосинтезу білка, але й виступає ключовою молекулою у низці інших як метаболічних, так і регуляторних та сигнальних шляхів, що зазнають змін при злоякісній трансформації клітин. Тому, дефіцит аргініну викликає специфічний багатотаргетний метаболічний стрес у клітинах пухлин, порушення регуляції клітинного циклу, транзйентну зупинку синтезу білка та проліферації, та у певних типів пухлин індукцію апоптичних програм.

Слід також відзначити, що результати клінічних випробувань вказують на те, що застосування ферментів деградації аргініну, аргініндеімінази й аргінази, як монотерапії викликає виражений канцеростатичний ефект у пухлин, дефіцитних за ASS, але супутній канцероцидний ефект є як правило недостатнім для успішного лікування онкопатологій (Zou et al., 2019). Поряд з цим протипухлинна селективність цієї терапії і низька загальна токсичність для організму в цілому служать хорошою основою для розробки більш ефективних комбінаційних методів. При цьому важливим елементом подальших досліджень є ідентифікація та валідація молекулярних маркерів чутливості різних типів пухлин до рекомбінантних аргінін-деградуючих ферментів. Вирішенню цього питання і є присвячений запропонований проект.

15.3. Досвід і доробок авторів.

Колектив виконавців проекту володіє значним попереднім досвідом для успішного виконання запропонованих досліджень. Зокрема, в Інституті біології клітини НАН України у співпраці між декількома відділами було сконструйовано власні генно-інженерні надпродуценти рекомбінантної аргінази I людини (Zakalskiy et al., 2012; Stasyk et al., 2015). Було вперше встановлено, що активність ендогенних ферментів біосинтезу аргініну не визначає чутливість пухлинних клітин людини різних типів до дефіциту цієї амінокислоти (Bobak et al., 2010). Авторами також встановлено, що голодування за аргініном значно підсилює чутливість клітин колоректальних карцином та гліобластом до опромінення (Vynnytska-Myronovska et al., 2012; Hinrichs et al., 2018), дії інгібіторів автофагії, зокрема хлорохіну (Shuvayeva et al., 2014), чи нетоксичних доз екзогенного донора оксиду азоту (Mayevska et al., 2017), чи комбінації з низькими концентраціями аналога аргініну канаваніну (Vynnytska et al., 2011; Kurlishchuk et al., 2016). Також вперше продемонстровано, що дефіцит аргініну порушує організацію актинового цитоскелету пухлинної клітини, наслідком чого є зниження рухливості та інвазивності ракових клітин (Pavlyk et al., 2015). У недавній роботі авторів проекту вперше досліджено, яким чином голодування за аргініном впливає на регуляцію клітинного циклу та mTOR-сигнального шляху у тривимірній культурі сфероїдів пухлинних клітин (Vynnytska-Myronovska et al., 2016). Вперше показано, що статус відомого онкорегулятора транскрипційного фактора p53 може бути потенційним біомаркером чутливості пухлин, щонайменше у двовимірній культурі, до дефіциту аргініну. Також вперше показано, що голодування за аргініном індукує у солідних пухлинних клітин стрес ендоплазматичного ретикулуму, який однак у багатьох випадках не є достатнім для індукції апоптичних програм клітини (Bobak et al., 2016; Chen' et al., 2018).

Нижче наведено основні наукові публікації авторського колективу за тематикою запропонованої роботи:

1. Bobak YP, Vynnytska BO, Kurlishchuk YV, Sibirny AA, Stasyk OV. Cancer cell sensitivity to arginine deprivation in vitro is not determined by endogenous levels of arginine metabolic enzymes. **Cell Biol Int.** 2010;34(11):1085-9. (IF – 1.64)
2. Vynnytska BO, Mayevska OM, Kurlishchuk YV, Bobak YP, Stasyk OV. Canavanine augments proapoptotic effects of arginine deprivation in cultured human cancer cells. **Anticancer Drugs.** 2011 Feb;22(2):148-57. (IF – 2.23)
3. Ю. В. Курліщук, Б. О. Винницька-Мироновська, Я. П. Бобак, О. В. Стасик. Вплив метаболітів аргініну на життєздатність людських пухлинних клітин за умов дефіциту цієї амінокислоти *in vitro*. **Біологічні студії.** 2011, Т.5, №2. С. 5-16.

4. O. I. Chen, L. S. Lyniv, N. I. Igmentseva, M. L. Barska, N. O. Sybirna, O. V. Stasyk. Effect of nitric oxide donor on viability of human leukemic cells upon arginine deprivation. **Studia Biologica**, 2011, V5 (2), P. 17-28.
5. Zakalskiy AE, Zakalska OM, Rzhetskiy YA, Potocka N, Stasyk OV, Horak D, Gonchar MV. Overexpression of (His)6-tagged human arginase I in *Saccharomyces cerevisiae* and enzyme purification using metal affinity chromatography. **Protein Expr Purif.** 2012;81(1):63-8. (IF – 1.64)
6. Vynnytska-Myronovska B., Bobak Y., Garbe Y., Dittfeld C., Stasyk O., Kunz-Schughart L.A. Single amino acid arginine starvation efficiently sensitizes cancer cells to canavanine treatment and irradiation. **Int. J. Cancer**, 2012; 130(9):2164-2175. (IF – 4.9)
7. Vynnytska-Myronovska B, Kurlishchuk Y, Bobak Y, Dittfeld C, Kunz-Schughart LA, Stasyk O. Three-dimensional environment renders cancer cells profoundly less susceptible to a single amino acid starvation. **Amino Acids.** 2013;45(5):1221-30. (IF – 3.91)
8. Chen O., Kavalets B., Lyniv L., Vovk O., Barska M., Sybirna N., Stasyk O. Effect of combi-national arginase and canavanine treatment on normal human peripheral blood lymphocytes in vitro. **Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences**, 2013, 26(4):385–389.
9. Shuvayeva G., Bobak Y., Igmentseva N., Titone R., Morani F., Stasyk O. Isidoro C. Single amino acid arginine deprivation triggers pro-survival autophagic response in ovarian carcinoma SCOV3. **BioMed Research International** 2014, Article ID 505041, 10 pages (doi: 10.1155/2014/505041) (IF – 1.58)
10. Бобак Я. П., Курліщук Ю. В., Винницька-Мироновська Б. О., Чень О. І., Барська М. Л., Стасик О. В. “Спосіб контролю експресії генів ферментів біосинтезу амінокислот у клітинах пухлин за допомогою канаваніну при комбінованій ензимотерапії раку”, № а201306988, 3.06.13 р., (Патент України на винахід. Рішення про видачу №25010/3А/14 від 27.10.2014)
11. Pavlyk I, Rzhetskiy Y, Jagielski AK, Drozak J, Wasik A, Pereverzieva G, Olchowik M, Kunz-Schugart LA, Stasyk O, Redowicz MJ. Arginine deprivation affects glioblastoma cell adhesion, invasiveness and actin cytoskeleton organization by impairment of β -actin arginylation. **Amino Acids.** 2015;47(1):199-212. (IF – 3.91)
12. Stasyk OV, Boretsky YR, Gonchar MV, Sibirny AA. Recombinant arginine-degrading enzymes in metabolic anticancer therapy and bioanalytics. **Cell Biol Int.** 2015;39(3):246-52. (IF – 1.9)
13. Bobak Y, Kurlishchuk Y, Vynnytska-Myronovska B, Grydzuk O, Shuvayeva G, Redowicz MJ, Kunz-Schughart LA, Stasyk O. Arginine deprivation induces endoplasmic reticulum stress in human solid cancer cells. **Int J Biochem Cell Biol.** 2016;70:29-38. (IF-4,0)
14. Vynnytska-Myronovska BO, Kurlishchuk Y, Chen O, Bobak Y, Dittfeld C, Hüther M, Kunz-Schughart LA, Stasyk OV. Arginine starvation in colorectal carcinoma cells: Sensing, impact on translation control and cell cycle distribution. **Exp Cell Res.** 2016;341(1):67-74. (IF – 3.2)
15. Kurlishchuk Y, Vynnytska-Myronovska B, Grosse-Gehling P, Bobak Y, Manig F, Chen O, Merker SR, Henle T, Löck S, Stange DE, Stasyk O, Kunz-Schughart LA. Co-application of canavanine and irradiation uncouples anticancer potential of arginine deprivation from citrulline availability. **Oncotarget.** 2016; 7(45):73292-73308 (IF – 6.4)
16. Chen O. I., Barska M. L., Lyniv L. S., Igmentseva N. I., Vovk O. I., Sybirna N. O., Stasyk O. V. Effect of combined arginase and nitric oxide donor treatment on normal and leukemic cells in vitro. **Studia Biologica**, 2016, V10 (1), P. 17-28.
17. Vovk O., Chen O., Igmentseva N., Senchuk O., Barska M., Sybirna N., Stasyk O. Effect of the combined arginase and canavanine treatment on leukemic cells in vitro and in vivo. **Ukrainian Biochemical Journal**, 2016, V 88 (2), P. 45-55.
18. Чень О., Барська М., Вовк О., Цимбалюк-Волошин І., Козлова О., Сибірна Н., Стасик О. Вплив рекомбінантної аргінази на життєздатність баластних клітин периферичної крові пацієнтів, хворих на лейкоз, *in vitro*. **Вісник Львівського університету**. Серія біологічна. 2016. В. 73. – С. 342-346.
19. Mayevska O.M., Chen O.I., Karatsai O., Bobak Ya.P., Barska M.L., Lyniv L.S., Pavlyk Yu., Rzhetskiy Yu., Redowicz M-J., Stasyk O.V. Nitric oxide donor augments antineoplastic effects of arginine deprivation in human melanoma cells. **Exp Cell Res.** 2017;355(2):162-171. (IF – 3.4)
20. Hinrichs CN, Ingargiola M, Käubler T, Löck S, Temme A, Köhn-Luque A, Deutsch A, Vovk O, Stasyk O, Kunz-Schughart LA. Arginine Deprivation Therapy: Putative Strategy to Eradicate Glioblastoma Cells by Radiosensitization. **Mol Cancer Ther.**, 2018;17(2):393-406. (IF – 5.37).

21. Chen OI, Bobak YP, Stasyk OV, Kunz-Schughart LA. A Complex Scenario and Underestimated Challenge: The Tumor Microenvironment, ER Stress, and Cancer Treatment. *Curr Med Chem.*, 2018; 25(21):2465-2502. (review) (IF – 3.47)
22. Karatsai O, Stasyk O, Redowicz MJ. Effects of Arginine and Its Deprivation on Human Glioblastoma Physiology and Signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1202:243-258. doi: 10.1007/978-3-030-30651-9_12. Review.

Всього опубліковано статей: - 21, з них у міжнародних виданнях – 15, оглядів та розділів у монографіях – 3. Патент України на винахід – 1.
Сумарний Impact Factor публікацій - 47,55

15.4. Структура досліджень.

Молекулярні маркери чутливості пухлин людини різних типів до метаболічної ензимотерапії можуть бути ідентифіковані як при аналізі окремих сигнальних механізмів клітини, базуючись на попередньому досвіді та доробку авторів, так і при глобальному аналізі транскриптому та протеому пухлинних клітин. З точки зору економічності відповідних досліджень, аналіз певної вибірки регуляторних механізмів клітини є на даний момент більш доцільним. Очікується, що запропонований підхід допоможе у розробці персоналізованої метаболічної терапії на основі голодування за аргініном, як на основі монотерапії при застосуванні аргінін-деградуючих рекомбінантних ферментів (і з наголосом на аргіназу людини I, як більш ефективного ензиму), так і похідних комбінованих підходів, які передбачають сенситизацію пухлинних клітин напр. до опромінення чи певних хемотерапевтичних чинників.

Дослідження буде здійснено у рамках взаємопов'язаних п'яти річних етапів, як деталізовано нижче у розділі «Календарний план».

15.5. Наявність матеріально-технічної бази для виконання роботи.

У роботі будуть використані сучасні та класичні методи клітинної біології та молекулярної генетики, біохімічних, та ультраструктурних досліджень. Виконавець проекту Відділ сигнальних механізмів клітини Інституту біології клітини НАН України є належно забезпечений необхідним для його успішного виконання обладнанням та основними реагентами. Деякі спеціалізовані реагенти, лабораторний посуд та інші розхідні матеріали будуть придбані за кошти проекту.

Зокрема виконавець проекту володіє термостатованими CO₂-інкубаторами та ламінарами для культивування пухлинних клітин, низькотемпературними холодильниками для зберігання біологічних зразків та матеріалів, високошвидкісними центрифугами, ПЛР-машиною, апаратами для електрофорезу ДНК та білків, звичайними та флуоресцентним мікроскопами, проточним цитофлуориметром, апаратом для високоефективної рідинної хроматографії та спектрофотометрами для аналітичних досліджень та іншими приладами, використання яких передбачається у ході реалізації проекту. Відділ сигнальних механізмів клітини також володіє значною власною колекцією пухлин людини різних типів, що будуть використані у ході виконання проекту.

16. Техніко-економічне обґрунтування

не стосується фундаментальних тематик

17. Власна оцінка науково-технічного рівня розробки, що пропонується, яка очікується за результатами наукової, науково-технічної роботи

- немає аналогів у світі або краща за існуючі у світі аналоги
 немає аналогів в Україні
 краща за існуючі в Україні аналоги за всіма основними показниками
 перевищує існуючі в Україні аналогічні розробки за окремими показниками

18. Використання результатів роботи

18.1. Очікувані наукові та науково-практичні результати, об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), які плануються до впровадження після завершення роботи

Найменування результатів, ОІВ	Назва підприємства, організації, де передбачається використовувати результати, ОІВ	Заплановані обсяги впровадження
За результатами досліджень буде запропоновано нові молекулярні маркери для клінічної діагностики та прогнозування для різних типів пухлин, та нові більш ефективні підходи до ензимотерапії онкозахворювань на основі рекомбінантних ферментів деградації аргініну. Попередній прогноз індивідуальної чутливості пацієнтів до терапії (цільовий аналіз транскриптому та протеому пухлин) прискорить перехід до наступних фаз клінічних випробувань та дозволить впровадити персоналізований підхід щодо цієї метаболічної терапії. Слід зазначити, що прогнозується, що наслідком роботи буде також розробка нових комбінаційні підходів для пухлин людини різних типів, для яких на даний момент методи лікування є недостатньо ефективними (зокрема клітини колоректального раку, раку голови та шиї, гліобластом, меланом тощо). У випадку успіху, відповідні терапевтичні підходи буде запатентовано.	Вітчизняні та закордонні медичні та діагностичні заклади у галузі онкології	сотні тисяч у.о.

18.2. Шляхи та способи подальшого використання в суспільній практиці результатів виконання роботи

Результати роботи, а саме розроблені нові рекомендації щодо діагностики маркерів чутливості у індивідуальних хворих перед використанням метаболічної ензимотерапії, чи нові підходи до комбінаційних методів відповідної терапії повинні пройти перевірку на моделях лабораторних тварин та клінічні випробування перед практичним використанням.

18.3. Потенційні споживачі наукових та науково-технічних результатів, об'єктів права інтелектуальної власності (ОІВ)

Країна	Назва підприємства, організації	Найменування результатів, ОІВ	Можливі обсяги споживання
Україна	Національна академія медичних наук України Міністерство охорони здоров'я України	Нові молекулярні маркери чутливості пухлин людини різних типів до ензимотерапії раку на основі голодування за амінокислотами, публікації та патенти за результатами виконання роботи	діагностика та прогноз лікування, клінічні випробування
Зарубіжні країни	Клінічні центри та діагностичні лабораторії в галузі онкотерапії	нові рекомендації щодо тестування маркерів чутливості у індивідуальних хворих пперед використанням метаболічної ензимотерапії, чи нові підходи до комбінаційних методів відповідної терапії	В межах лікування пухлин, чутливих до метаболічної ензимотерапії

19. Об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), використання яких передбачається під час проведення досліджень (для прикладних досліджень та фундаментальних, де використовуються ОІВ)

н е м а є

20. Фінансові аспекти роботи

20.1. Загальна вартість роботи 1100,000 тис. грн.

словами: один мільйон сто тисяч грн.

20.2. Вартість роботи:

Роки виконання роботи	2020 р.	2021 р.	2022 р.	2023 р.	2024 р.
Вартість виконання робіт (тис. грн.)	200,000	225,000	225,000	225,000	225,000

21. Наукові ради (комітети, комісії) НАН України, ради регіональних наукових центрів НАН і МОН України, яких доцільно залучити до експертної оцінки запиту

н е м а є

22. Кандидатури можливих експертів у галузі, до якої відноситься робота, що пропонується

Прізвище, ім'я, по батькові	Науковий ступінь, посада	Місце роботи
Скок Марина Володимирівна	академік НАН України, д.б.н., проф., головний науковий співробітник	Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
Філоненко Валерій Вікторович	академік НАН України, д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України
Воробець Зіновій Дмитрович	д.б.н., проф., завідувач кафедри	Львівський національний університет ім. Данила Галицького, кафедра медичної біології, паразитології та генетики
Арбузова Світлана Борисівна	д.м.н., проф., директор	КЛПУ «Східно-Український спеціалізований центр медичної генетики та пренатальної діагностики»

23. Додатки, що є невід'ємною частиною запиту:

1. Технічне завдання на виконання роботи (Додаток А).
2. Планова калькуляція кошторисної вартості роботи (Додаток Б).

26 лютого 2020 р.

дата


Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України



(підпис)
Андрій СИБІРНИЙ
25255758
М.П.

Науковий керівник роботи

Завідувач відділу
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., с.д.



(підпис)
Олег СТАСИК

ПОГОДЖЕНО

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України


_____ Андрій СИБІРНИЙ
(підпис)
«26» лютого 2020 р.



ЗАТВЕРДЖУЮ

Співкоординатор Програми
академік НАН України

_____ Сергій КОМІСАРЕНКО
(підпис)
«_____» _____ 20__ р.
М.П.

ТЕХНІЧНЕ ЗАВДАННЯ
на виконання наукової (науково-технічної) роботи

**«Ідентифікація нових молекулярних маркерів чутливості та розробка персоналізованих підходів метаболічної ензимотерапії
злоякісних пухлин на основі голодування за аргініном»**
**Цільова програма наукових досліджень НАН України «Геномі, молекулярні та клітинні основи розвитку інноваційних
біотехнологій» на 2020–2024 рр.**

Інститут біології клітини НАН України

1. Рішення про затвердження роботи

2. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Фундаментальні наукові дослідження з найбільш важливих проблем розвитку науково-технічного, соціально-економічного, суспільно-політичного, людського потенціалу для забезпечення конкурентоспроможності України у світі та сталого розвитку суспільства і держави

3. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Фундаментальні проблеми наук про життя та розвиток біотехнологій

4. Код та назва наукового напрямку або проблеми з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук (для фундаментальних досліджень)

2.2.4.1. Вивчення механізмів регуляції функціональних систем організму за умов норми і патології

2.2.4.3. Вивчення молекулярно-генетичних основ регуляції метаболічних процесів при пухлинній хворобі

5. Основний напрям наукової діяльності установи, за яким проводяться роботи

Дослідження молекулярних механізмів регуляції проліферації, диференціації та апоптозу у нормальних та пухлинних клітинах тварин і людини.

6. Мета роботи

Метою запропонованих досліджень є ідентифікація нових молекулярних маркерів чутливості клітин пухлин людини до метаболічної ензимотерапії на основі голодування за аргініном, з метою передбачення ефективності відповідної терапії злоякісних пухлин та розробки її нових персоналізованих та комбінаційних підходів, зокрема на основі рекомбінантної аргінази I людини. За результатами аналізу експресії генів та сигнальних шляхів, задіяних у відповіді злоякісних клітин на голодування за аргініном, на моделях пухлин різного органного походження, зокрема меланом, карцином голови та шиї, гепатокрцином, гліобластом та інш., буде встановлено молекулярні маркери, що визначають чутливість пухлинних клітин різних типів до відповідної ензимотерапії. Зокрема у роботі шляхом клональної селекції *in vitro* будуть отримані ізогенні лінії пухлин клітини з різною чутливістю до дефіциту аргініну та проаналізовані молекулярні компоненти про- та антиапоптичних сигнальних шляхів клітини, шляхів сигналювання амінокислот, білки теплового шоку та інш., як можливі прогностичні маркери чутливості до терапії. На основі отриманого знання будуть запропоновані та протестовані нові підходи для підвищення ефективності метаболічної ензимотерапії пухлин.

7. Термін проведення роботи:

початок — 01 квітня 2020 р. ; закінчення — 31 грудня 2024 р.

Орієнтовний обсяг коштів на виконання роботи в цілому **1100,000** тис. грн.

та по роках

2020 р. — 200,000 тис. грн.

2021 р. — 225,000 тис. грн.

2022 р. — 225,000 тис. грн.

2023 р. — 225,000 тис. грн.

2024 р. — 225,000 тис. грн.

8. Календарний план роботи

№ з/п	Найменування основного етапу роботи	Термін виконання	Відповідальний виконавець
1	Клоногенна селекція in vitro пухлинних клітин з підвищеною резистентністю до голодування за аргініном за дії рекомбінантної аргінази людини.	01 квітня 2020 р. - 31 грудня 2024 р.	к.б.н., О.І. Вовк.
2	Дослідження варіативності експресії проапоптичних та антиапоптичних генів та білків, та статусу відповідних сигнальних шляхів, що активуються при дії рекомбінантної аргінази у пухлинних клітин з різною чутливістю до дефіциту аргініну,	01 січня 2021 р. - 31 грудня 2021 р.	к.б.н., Я.П. Бобак.
3	Аналіз експресії генів та регуляції білків теплового шоку (HSP білків) у чутливих та нечутливих до голодування за аргініном пухлинних клітин	01 січня 2022 р. - 31 грудня 2022 р.	к.б.н., О.І. Чень.
4	Дослідження природи індивідуальної чутливості пухлинних клітин до дефіциту екзогенного аргініну: аналіз експресії генів та статусу регуляторних білків, задіяних у GCN2- та mTOR-залежних сигнальних механізмах	01 січня 2023 р. - 31 грудня 2023 р.	
5	Формулювання та експериментальна перевірка рекомендацій щодо використання ідентифікованих молекулярних маркерів чутливості у комбінаційній персоналізованій ензимотерапії пухлин різного органного походження.	01 січня 2024 р. - 31 грудня 2024 р.	д.б.н., с.д., О.В. Стасик.

9. Зміст, основні вимоги до виконання роботи, рівня і способів її виконання

В рамках проекту буде проведено аналіз вибраних компонентів транскриптому та протеому пухлинних клітин у нормі, та за умов голодування за аргініном у визначеному аргінін-дефіцитному середовищі, чи за дії рекомбінантної аргінази людини. Відповідний аналіз буде здійснено на клітинних моделях злоякісно-трансформованих клітин людини різних типів (зокрема колоректального раку, раку голови та шиї, меланом, гліобластом та інш.).

Зокрема буде поведено клонотипну селекцію *in vitro* пухлинних клітин з підвищеною резистентністю до голодування за аргініном за дії рекомбінантної аргінази людини. Відповідну селекцію буде здійснено шляхом кількакратного перенесення клітин, чутливих до дефіциту аргініну (напр. клітин раку голови чи меланоми) із середовища із рекомбінантною аргіназою на повноцінне аргінін-вмісне та відновлення росту клітин. При цьому буде здійснено моніторинг життєздатності та залишкового проліферативного потенціалу клітин, що вижили після кількодобової інкубації без аргініну. Таку клонотипну селекцію буде здійснено вперше, а отримані умовно-резистентні клітини будуть використані на наступних етапах роботи як експериментальні моделі.

З метою аналізу варіативності експресії генів-репортерів та статусу сигнальних шляхів, що активуються за дії рекомбінантної аргінази у пухлинних клітин з різною чутливістю до дефіциту аргініну, буде проведено аналіз ряду метаболічних, проапоптичних та пропроліферативних сигнальних шляхів, які можуть визначати чутливість чи резистентність пухлинних клітин до ензимотерапії, зокрема MAP кіназний сигнальний каскад, AMPK та PI3K-AKT. Аналіз проводитиметься шляхом виявлення фосфорильованих форм білків та дослідження впливу інгібіторів p44/42 MAPK (ERK1/2) (U0126), AMPK (метформіну) та PI3K (вортманіну) на чутливість пухлинних клітин до дефіциту аргініну. Для цього буде використано антитіла до активованих форм ERK1/2, ASK1, p38/MAPK, SAPK/JNK1/2, AMPK, AKT.

Буде здійснено аналіз експресії генів та регуляції білків теплового шоку (HSP білків) у чутливих та нечутливих до голодування за аргініном пухлинних клітин різного органного походження. Відомо, що активація ряду HSP білків за умов стресу, у тому числі стресу ендоплазматичного ретикулуму, що виникає у пухлинних клітинах за дефіциту аргініну (Bobak et al., 2016), забезпечує виражений антиапоптичний ефект. У роботі буде визначено рівень експресії ряду HSP генів (HSP70, HSP90, HSP40 та інш.) методом детекції кДНК відповідних генів (RT-PCR), та визначення рівня відповідних білкових продуктів методом Вестерн блотингу. Ці дані будуть порівняні із експресією типових маркерів стресу ER (GRP78, CHOP та EDEM1) та апоптичної загибелі клітин (CHOP, фрагментований PARP1). Також буде досліджено вплив селективних індукторів чи інгібіторів HSP білків на життєздатність вибраних пухлинних клітин за умов метаболічного стресу. Буде сформульовано висновок про кореляцію між статусом та регуляцією тестованих HSP білків та чутливістю клітин до ензимотерапії на основі голодування за аргініном.

На наступному етапі роботи з метою подальшого встановлення природи індивідуальної чутливості пухлинних клітин до дефіциту екзогенного аргініну буде проведено: аналіз експресії генів та статусу регуляторних білків, задіяних у GCN2- та mTOR-залежних сигнальних, та залежних від них механізмах. Як відомо, mTOR-залежні регуляторні шляхи є драйвером проліферації та синтезу білка, гіперактивованими у цілому ряду пухлин. Зокрема буде проаналізовано сигнальні каскади AKT-mTOR-p70S6K та GCN2-ATF4, залучені у відповіді клітин на дефіцит амінокислот у середовищі. Аналіз проводитиметься шляхом виявлення фосфорильованих форм білків-репортерів (mTOR, Raptor, S6, GCN2, eIF2a, GADD34) та аналізу експресії генів (*ATF4*, *ATF3*, *ATF2*, *PPP1R15A(GADD34)*, *ASNS*, *ASS*, *CAT1*) при дії ензимотерапії. Також буде проведено кореляційний аналіз білків, задіяних у залежній від mTOR автофагії, деградації білків та органел у лізосомах. Зокрема буде проаналізовано експресію генів *ATG 5*, *ATG 12*, *SQSTM1(p62)*, *BECLN1* та білків Beclin 1, LC3II. За результатами аналізу буде сформульовано висновок, чи можуть окремі із проаналізованих регуляторних компонентів бути використані як прогностичні маркери чутливості злоякісних клітин різних типів до голодування за амінокислотами, зокрема аргініном.

На останньому етапі роботи буде сформульовано та експериментально перевірено на лабораторних моделях рекомендації щодо використання ідентифікованих молекулярних маркерів чутливості у комбінаційній персоналізованій ензимотерапії пухлин різного органного походження. З цією метою у пухлин із варіативною чутливістю до голодування за аргініном, зокрема до дії рекомбінантної аргінази людини, буде проведено аналіз життєздатності та проліферативного потенціалу за умов інгібування або додаткової індукції окремих білків, визначених на попередніх етапах як

потенційні репортери та маркери чутливості до цієї ензимотерапії. З цією метою будуть використані як попередньо встановлені низькомолекулярні інгібітори чи індуктори синтезу відповідних білків, так і інгібування експресії окремих генів методом siRNA.

На основі отриманих даних також будуть сформульовані висновки щодо універсального чи пухлино-специфічного характеру встановлених маркерів та механізмів резистентності клітин пухлин до метаболічної ензимотерапії, перелік маркерів для перевірки на моделях тварин та запропоновано нові адресні підходи до комбінованої хіміо- та ензимотерапії для окермих типів злоякісних клітин.

10. Наукові (науково-технічні) результати, що очікуються за основними етапами та роботою в цілому

У результаті проведених досліджень буде отримане нове знання щодо молекулярних маркерів чутливості злоякісних пухлин різного органного походження до ензимотерапії на основі дефіциту аргініну. Зокрема, пошук таких молекулярних репортерів буде проводитись серед компонентів сигнальних каскадів MAP кіназ, AMPK та P13K-AKT, GCN2, mTOR, та білків теплового шоку. Вперше, як експериментальні моделі, будуть створені та використані у дослідженнях методом клональної селекції субліні пухлинних клітин із підвищеною резистентністю до дефіциту аргініну. Також очікується, що отримані результати ляжуть в основу нових ефективних, селективних та адресних комбінаційних підходів до відповідної терапії ракових захворювань на основі препаратів рекомбінантної аргінази. Отримані результати також стануть основою для наступних досліджень ефективності терапії на експериментальних моделях тварин та клінічних випробувань.

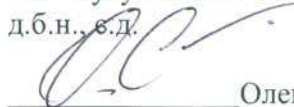
Результати роботи будуть опубліковані у провідних міжнародних та вітчизняних наукових виданнях та представлені на міжнародних наукових конференціях. Терапевтично-важливі результати досліджень будуть захищені вітчизняними та міжнародними патентами.

11. Перелік науково-технічної та іншої документації, що надасться по завершенню роботи

Науковий звіт, Акт прийому-здачі робіт, перелік наукових публікацій та патентів за результатами виконання роботи, облікова картка.

Науковий керівник роботи

Завідувач відділу
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., в.д.



Олег СТАСИК

(підпис)

Планова калькуляція кошторисної вартості наукової (науково-технічної) роботи

«Ідентифікація нових молекулярних маркерів чутливості та розробка персоналізованих підходів метаболічної ензимотерапії
злоякісних пухлин на основі голодування за аргініном»
на 2020 рік

Термін виконання роботи: початок — 01.04.2020 р., закінчення — 31.12.2024 р.

№ з/п	Найменування статей витрат	КЕКВ	Сума, тис. грн.
1	Заробітна плата	2111	100,000
2	Нарахування на оплату праці	2120	22,000
3	Предмети, матеріали, обладнання та інвентар	2210	16,500
4	Оплата послуг (крім комунальних)	2240	1,000
5	Видатки на відрядження	2250	1,500
6	Оплата водопостачання та водовідведення	2272	8,000
7	Оплата електроенергії	2273	40,000
8	Оплата природного газу	2274	10,000
9	Інші поточні видатки	2800	1,000
Разом:			200,000
в т.ч. накладні витрати			33,300
% їх до основної заробітної плати			36,0%

УСТАНОВА-ВИКОНАВЕЦЬ:

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академик НАН України

_____ Андрій СИБІРНИЙ

(підпис)

М.П.

Науковий керівник роботи
Завідувач відділу
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., с.д. _____ Олег СТАСИК

(підпис)