

**Відзив****офіційного опонента на дисертаційну роботу****Степаненка Олексія Анатолійовича****«ВПЛИВ ТЕРАПЕВТИЧНИХ ХІМІОПРЕПАРАТІВ І СТАБІЛЬНОЇ  
ТРАНСФЕКЦІЇ ГЕНА *CH13L1* НА ГЕНОМ ТА ФЕНОТИП ПУХЛИННИХ  
КЛІТИН»**, представленої до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата  
біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Робота Олексія Анатолійовича Степаненка «Вплив терапевтичних хіміопрепаратів і стабільної трансфекції гена хітиназа 3-подібного білка 1 на геном та фенотип клітин», які впродовж довгого часу культивуються *in vitro*, присвячена актуальній проблемі сучасної молекулярної онкології. Вивчення цих питань слід розглядати як подальший розвиток досліджень, спрямованих на підтвердження еволюційної геномної теорії виникнення пухлин.

**Структура і об'єм дисертації.** Дисертаційна робота складається із вступу, переліку умовних позначень, огляду літератури, розділу матеріали і методи дослідження, експериментальної частини, присвяченої одержаним результатам, розділу «Аналіз та узагальнення результатів», висновків і списку використаних джерел. Список використаної літератури містить посилання на 286 джерел. Загальний об'єм дисертації – 137 сторінок машинописного тексту.

У вступі наведені дані стосовно хромосомної нестабільності і генетичної гетерогенності пухлин, які відіграють значну роль у прогресії захворювання, розвитку метастазів і появою рецидивів. Саме вони слугували основним аргументом у виборі теми дисертаційної роботи.

В огляді літератури послідовно викладені у порівняльному плані основні положення генно-мутаційної та еволюційної геномної теорій канцерогенезу. Розглядаються питання змін геному при дії деяких протипухлинних препаратів і виникнення лікарської резистентності. Особлива увага приділена хітиназа 3-подібному білку 1 (*CH13L1*) як потенційному онкобілку і мішені для таргетної терапії. Підкреслюється, що невирішеними залишаються питання використання

стабільно трансфікованих (трансгенних) клітинних ліній у виявленні онкогенних властивостей генів. Важливим висновком огляду літератури є те, що збільшення хромосомних аномалій під час і після проведення хіміотерапії корелює з підвищенням агресивності пухлин, придбанням терапевтичної резистентності і зростанням ризику розвитку множинних побічних ефектів. Слід відзначити, що аналізу хромосомної нестабільності пухлинних клітин останнім часом приділяється значна увага. Таким чином, детальний аналіз хромосомної нестабільності та фенотипу пухлинних клітин після обробки відомими клінічними хіміопрепаратами дозволяє встановити певні особливості їхньої дії в умовах *in vitro* та *in vivo*.

Для вирішення поставлених завдань автором використовувались сучасні методи – диференційне забарвлення хромосом, порівняльна геномна гібридизація, вестерн блот аналіз, тест на життєздатність, аналіз утворення колоній у напіврідкому агарі, аналіз проліферації, аналіз міграції клітин, тощо.

**Дисертаційна робота тісно пов'язана з програмами, планами, темами** наукових досліджень відділу біосинтезу нуклеїнових кислот (зараз лабораторія біосинтезу нуклеїнових кислот відділу функціональної геноміки) Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Варто відзначити, що дисертант був співвиконавцем низки науково-дослідних тем відділу.

**Наукова новизна** роботи полягає у вирішенні завдань, які не були достатньо висвітлені в літературі або взагалі не досліджувались раніше. Автор дисертації поставив собі за мету вивчення рівня хромосомної нестабільності і фенотипу пухлинних клітин після довготривалого впливу різних стрес-факторів: стабільної трансфекції плазмиди pcDNA3.1, рекомбінантної ДНК, що містить кДНК гена *CHI3L1*, та хіміопрепаратів різного механізму дії. Встановлено, що всі ці фактори спричиняють зміни рівня хромосомної нестабільності і впливають на фенотип в залежності від типу пухлинних клітин. Показано, що стабільна трансфекція плазмідної ДНК без цільового гена призводить до хромосомної нестабільності і впливає на фенотипові ознаки пухлинних клітин лінії 293. Вперше продемонстровано, що збільшення або

зменшення агресивності злоякісного фенотипу під дією темозоломіду залежить від типу пухлинних клітин людини і пов'язане з індивідуальними особливостями дестабілізації геному. Вперше встановлено, що довготривала обробка клітин гліобластоми відомим таргетним препаратом темзиролімусом або експериментальним інгібітором MEK1/2 кіназ U0126 призводить до збільшення гетерогенності клітинних популяцій, змін геному і певних фенотипових ознак в залежності від ліній пухлинних клітин.

Таким чином, дисертаційна робота вносить суттєве доповнення в сучасне уявлення про дестабілізацію клітинного геному і зміну фенотипових ознак під впливом екзогенних біологічних та хімічних чинників на прикладі різних клітинних ліній, в тому числі таких, що походять від злоякісних пухлин головного мозку. Це слугує підґрунтям для подальшого вивчення механізмів процесу хромосомної нестабільності та його ролі в туморогенезі.

**Практичне значення одержаних результатів.** Одержані дані вказують на те, що клінічне застосування хімічних та біологічних препаратів може мати і негативний вплив на перебіг онкозахворювання. Таким чином, слід проводити постійний моніторинг стану хромосомного апарату та геному при застосуванні хіміотерапії. Отримані сублінії пухлинних клітин можуть бути використані для вивчення крос-резистентності до лікарських препаратів та інших дослідницьких цілей.

**Особистий внесок здобувача** у виконання дисертаційної роботи не викликає сумніву, оскільки у більшості робіт, опублікованих за темою дисертації спільно з іншими дослідниками, прізвище здобувача стоїть першим номером у списку співавторів.

За темою дисертації **опубліковано 9 наукових статей**, серед яких 5 статей опубліковано в міжнародних журналах. Результати роботи добре представлені на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях.

Разом із загальною позитивною оцінкою дисертаційної роботи Степаненка О.А., до неї можна висловити **ряд зауважень і запитань:**

1. В роботі вказано, що контрольні клітини HeLa\_pcDNA3.1 і гетерогенна сублінія HeLa\_CHI3L1, з якої отримали клони 1 та 2, були недоступні для аналізу, що не дозволяє зробити однозначний висновок, з чим пов'язані зміни фенотипу клітин HeLa\_CHI3L1 (клон 1 та клон 2): з процедурою стабільної трансфекції, з селекцією окремих клонів або з ектопічною надпродукцією CHI3L1.

2. В роботі мало уваги приділено базальному рівню хромосомної нестабільності в клітинах, з яких отримували сублінії для подальшого аналізу. Базальний рівень хромосомної нестабільності міг би слугувати відправною точкою для кількісного аналізу змін рівня хромосомної нестабільності.

3. Хоча автором дисертації зроблений аналіз каріотипу і фенотипу 16 субліній 5 клітинних ліній, що демонструє значний об'єм виконаної роботи, тим не менше, тільки одна сублінія була проаналізована в динаміці на різних пасажах після дії певного стресу. Тому в роботі представлено скоріше «статичне», ніж «динамічне» відображення хромосомної нестабільності.

4. Сублінії клітин HeLa і 293 мають різний рівень хромосомної нестабільності (низький і високий, відповідно) після стабільної трансфекції рекомбінантного вектору pcDNA3.1\_CHI3L1 або довготривалої обробки генотоксичним хіміопрепаратом темозоломідом. Порухення функціонування яких механізмів репарації може відповідати за різний рівень дестабілізації геному?

5. Автор наводить ряд посилань на публікації, що рівень хромосомної нестабільності і генетичної гетерогенності значно корелює з прогресією розвитку пухлин і терапевтичною резистентністю. Чому тоді в окремих випадках високий рівень хромосомної нестабільності навпаки пов'язаний зі зниженням життєздатності і агресивності пухлинних клітин? Чи може рівень нестабільності *in vitro* та *in vivo* мати різний вплив на пухлинні клітини? Чому деякі вчені пропонують хіміотерапію, спрямовану саме на збільшення рівня хромосомної нестабільності, якщо це може мати потенційні негативні наслідки?

Усі наведені питання і зауваження не знижують наукової цінності отриманих дисертантом результатів, але, навпаки, підкреслюють глибокий інтерес до них і важливість подальшого вивчення.

**Висновок.** На підставі викладеного вважаю, що за актуальністю теми, методичним рівнем проведених досліджень, науковим і науково-практичним значенням отриманих результатів, адекватністю зроблених висновків дисертаційна робота Степаненка О.А. відповідає вимогам пп 11, 12 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року №567, а її автор, Степаненко Олексій Анатолійович, заслуговує присудження йому наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Завідувач відділу імуноцитохімії та онкогематології  
Інституту експериментальної патології, онкології  
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України,  
доктор медичних наук, професор

Глузман Д.Ф.

