

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу Геращенко Ганни Володимирівни «Генетичні, епігенетичні та експресійні порушення у низці епітелійних пухлин», представлену до захисту на здобуття ступеня доктора біологічних наук за спеціальностями 03.00.03 – молекулярна біологія та 03.00.22 – молекулярна генетика

Актуальність теми дисертації. Дисертаційна робота Геращенко Г.В. присвячена пошуку та характеристиці порушень у раках людини на генетичному, епігенетичному та транскрипційному рівнях. Вона має актуальність як у теоретичному, так і практичному сенсі. Відомо, що онкологічні захворювання – це багатофакторні хвороби, які виникають при генетичних абераціях у пухлинних клітинах та прогресують завдяки певним порушенням на різних рівнях регуляції гомеостазу в організмі людини. На теперішній час багатьма роботами показано існування як низки загальнопухлинних порушень та механізмів ініціації та прогресії пухлин, так і пухлинно-специфічних змін, але ці порушення є досить непередбачуваними у різних індивідів. Однак, крім індивідуальних особливостей ці феномени мають й певні популяційні характеристики. Більшість з описаних в роботі порушень у функціонуванні геному виявлено у хворих на рак передміхурової залози в популяції України.

Загальна характеристика роботи. Дисертаційна робота має стандартну структуру та складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Основний зміст роботи викладено на 310 сторінках машинописного тексту. Дисертаційна робота ілюстрована 78 рисунками, 79 таблицями та 25 додатками. Список джерел охоплює 951 найменування.

Основні положення та висновки дисертаційної роботи викладено у 39 опублікованих працях, з яких 28 статей у фахових та міжнародних виданнях та 11 тез конференцій. 23 статті входять до наукометричної бази Scopus. Автореферат повно та адекватно передає зміст роботи та відповідає основним положенням дисертаційної роботи.

В розділі 1 “Сучасні уявлення про молекулярні особливості канцерогенезу та підходи до діагностики й лікування” (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ) наведено основні теорії та гіпотези канцерогенезу, найбільш поширені генетичні та епігенетичні порушення у раках людини, описано властивості найважливіших онкогенів та генів-супресорів, актуалізовано вибір для дослідження 3-ої хромосоми людини, проаналізовано метаболічні особливості та міжклітинні взаємодії у канцерогенезі та сучасні підходи до пошуку молекулярних порушень для потреб сучасної біології та медицини.

В розділі “Матеріали та методи” описано застосовані у роботі методи та методичні підходи, серед яких сучасні методи молекулярної біології та молекулярної генетики: NotI-мікропанелі, секвенування за Сенгером, ПЛР у реальному часі, метил-специфічна ПЛР, бісульфітне секвенування, втрата гетерозиготності, нозерн-блот гібридизація, методи культивування клітинних ліній, трансфекція культур клітин, тести на ріст пухлин на імунодефіцитних мишах, флуоресцентна мікроскопія, гістологічні та імуногістохімічні методи. Результати дослідження оброблені завдяки адекватному та сучасному набору статистичних методів.

У розділі 3 «Результати експериментальних досліджень» представлено результати досліджень, які дали змогу вперше виявити низку генетичних та/або епігенетичних порушень в епітелійних пухлинах, причому частина з них зустрічається в більшості досліджених пухлин, але були виявлені і такі, які притаманні конкретному типу пухлин. Так, в генах *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* та *GPX1* епітелійних пухлин виявлені гемі- та гомозиготні делеції, а для генів *ITGA9*, *LRRC3B*, *THRB*, *RBSP3B* і *SEMA3B* показано метилювання промоторів та зміни в їх експресії.

Представлені результати стосовно пухлино-супресорної функції гена *SEMA3B*, локалізованого в 3-й хромосомі людини, що відкриває можливість використовувати цей ген як біомаркер та мішень для генотерапії за умов втрати його функції клітинами епітелійних пухлин.

Найбільшу кількість пухлино-специфічних змін автором отримано для злоякісних пухлин передміхурової залози, що ініціювало пошук потенційних маркерів та мішеней для діагностики та терапії цих пухлин. В цьому плані був проведений великий обсяг роботи з клітинами ліній DU145, LNCaP і PC3 у порівнянні з умовно-нормальною лінією клітин PNT2, що дозволило виявити гени потенційних маркерів інвазивності та метастазування. Для семи із них проведено дослідження рівня їх експресії на пухлинах передміхурової залози, але ці результати лише частково співпадали з тими результатами, що були отримані на клітинних лініях. Автор висловила припущення про можливу експресію цих генів різними типами клітин у пухлинах та наявність різних молекулярних підтипів злоякісних пухлин, що було підтверджено шляхом аналізу відносної експресії 55 генів-маркерів епітелійно-мезенхімного переходу, маркерів пухлинних клітин передміхурової залози та генів-маркерів елементів стромального мікрооточення пухлин, а саме фібробластів і пухлино-асоційованих фібробластів, пухлино-асоційованих макрофагів та маркерів клітин імунної системи. Таким чином, було виявлено більше 30 генів, рівень експресії яких корелює з клініко-патологічними характеристиками і може бути основою для молекулярного профілювання пухлин передміхурової залози і відкриває можливість дослідження пухлино-стромальних взаємодій за умов прогресії пухлин передміхурової залози.

Особливий інтерес у цій роботі представляють дані стосовно потенційних рівнів фармакологічної чутливості семи біомаркерів до їх інгібіторів, які вже дозволено до використання в клініці або проходять клінічні випробування, а також розроблені автором набори потенційних ДНК біомаркерів для виявлення та розпізнавання пухлин яєчника та передміхурової залози, зокрема діагностично-профілюючий набір з 45 експресійних біомаркерів.

В дисертації є розділ “Аналіз та узагальнення результатів”, де Ганна Володимирівна досить детально аналізує отримані нею результати, порівнює їх з даними літератури і пропонує узагальнюючу модель канцерогенезу.

Таким чином, результати, отримані Ганною Володимирівною, є новими, мають наукове і практичне значення. Наукова новизна полягає у виявленні генетичних та/або епігенетичних змін в багатьох генах та локусах 3-ої хромосоми людини в пухлинах епітелійного походження яєчника, кишечника, передміхурової і грудної залоз, встановленні пухлино-супресивної ролі гена *SEMA3B* у канцерогенезі, виявленні генів, що асоціюються з різним потенціалом агресивності та метастазування в клітинних лініях злоякісних пухлин передміхурової залози, а також генів-маркерів стромальних елементів цих пухлин, і встановленню молекулярних підтипів злоякісних пухлин передміхурової залози за рівнем активації онкогенних шляхів та інактивації генів-супресорів.

Практичне значення роботи полягає в ідентифікації нових потенційних біомаркерів та розробці панелей для діагностики і виявлення підтипів пухлин яєчника та передміхурової залози, а також у встановленні специфічних молекулярних підтипів злоякісних пухлин передміхурової залози, що важливо для діагностики і лікування, в тому числі й для таргетної терапії.

Разом з тим є **зауваження** до дисертаційної роботи Геращенко Г.В.:

1. В роботі присутні невдалі вислови та орфографічні помилки.
2. В методах не обговорюються результати перевірки праймерів за допомогою спеціального алгоритму.

Поряд з наведеними позитивними сторонами дисертаційної роботи, на мій погляд доцільно почути думку Ганни Володимирівни по таким **дискусійним питанням**:

1. Чому рівень експресії генів нормалізували за різними референсними генами “домашнього господарства” *GAPDH*, *ACTB*, *TBP*, *HPRT*, *ALAS1* та *TUBA1B*? Який критерій вибору того чи іншого референсного гена для тої чи іншої групи генів, а також пухлин із різних органів?

2. Чому не використовували в якості референсного гена рРНК чи мРНК рибосомних протеїнів?
3. У злоякісних пухлинах активується гліколіз і відповідно експресія генів, що кодують ензими гліколізу, в тому числі *GAPDH*. Чим мотивований вибір гена *GAPDH* в якості референсного гена?
4. Ваша узагальнююча думка стосовно ролі експресії генів у стромальних клітинах у прогресії злоякісних пухлин та пригніченні їх росту.
5. Яка із гіпотез канцерогенезу для Вас є найбільш реальною чи Ви вже маєте свою власну гіпотезу?

Вищенаведені зауваження та питання не знижують наукової цінності дисертаційної роботи.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до докторських дисертацій. Дисертаційна робота Геращенко Ганни Володимирівни «Генетичні, епігенетичні та експресійні порушення у низці епітелійних пухлин» є цілісною закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною та практичною цінністю отриманих результатів дисертація 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 Постанови Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., №1159 від 30.12.2015 р. та №567 від 27.07.2016 р.), які пред'являються до докторських дисертацій, а Ганна Володимирівна Геращенко заслуговує присудження їй ступеня доктора біологічних наук за спеціальностями 03.00.03 – молекулярна біологія та 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент,
завідувач відділу молекулярної біології
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор

Мінченко - Мінченко О.Г.

Підпис *Мінченко О.Г.*
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
національної академії наук України
"24" 09 2019 р.

