

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора біологічних наук, професора, професора кафедри екології та зоології
ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

ГАРМАНЧУК ЛЮДМИЛИ ВАСИЛІВНИ

на дисертаційну роботу

ГУБЕРНАТОРОВОЇ АНАСТАСІЇ ОЛЕКСАНДРІВНИ

**«РОЛЬ ТРИСТЕТРАПРОЛІНУ В РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ
ЛЮДИНИ»,**

представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії

зі спеціальності 091 «Біологія і біохімія»

Актуальність теми дисертації. За даними ВООЗ поширеність захворювань на рак грудної залози зростає у всьому світі. Причинами цьому є несприятливі умови навколишнього середовища, паління, алкоголізм, наркоманія, а також безліч фізіологічних причин, пов'язаних з народжуваністю та вигодовування новонароджених грудним молоком. Пошук ранніх діагностичних та прогностичних маркерів, в більшості випадків сприяє виявленню захворювання на початкових стадіях захворювання та успішній терапії. Найбільш значні загрози прогресування новоутворень є поширення пухлинних клітин та метастазування. Для виходу метастатично активних клітин із первинної пухлини важливим є перебудова цитоскелету та набуття мезенхімального фенотипу. Тому інгібування даного процесу може бути асоційовано з пригніченням метастазування. Серед різних молекулярних шляхів пригнічення метастатичного клону розглядають гени супресори перебудови цитоскелету пухлинних клітин. такими генами є ZFP36, що кодує РНК-зв'язувальний протеїн, що належить до родини тристетрапролінів. Незважаючи на численні дослідження ролі ТТР в інгібуванні канцерогенезу та інвазивності, механізми клітинної рухливості та інвазійного потенціалу і досі залишається обмеженим. В даному дослідженні авторкою було поставлено запитання чи може ТТР впливати на компоненти цитоскелету, що задіяні в

модифікації морфогенетичних реакцій, пов'язаних із метастатичним фенотипом клітин.

Отже, дисертаційна робота Губернаторової Анастасії Олександрівни «Роль тристетрапроліну в раку молочної залози людини» присвячена з'ясуванню ролі TTP, та чи може цей протеїн впливати на міграцію та інвазію пухлинних клітин шляхом регуляції експресії генів, залучених до реорганізації цитоскелету. Відповідно, за мету дослідження було поставлено вивчення особливостей впливу TTP на експресію SH3PXD2A, SH3PXD2B, CTTN, WIPF1 та WASL, морфологію, рухливість та інвазивність клітин на моделі раку молочної залози людини, профіль його експресії в різних субтипах пухлин молочної залози людини, а також вивчення впливу DXR на експресію ZFP36, SH3PXD2A, SH3PXD2B, CTTN, WIPF1 та WASL, морфологію і рухливість клітин, а також можливість його застосування як біомаркера РМЗ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота Губернаторової Анастасії Олександрівни виконана у співпраці з великою кількістю співавторів та колективів, *однак не зазначено в рамках яких тематик проводились ці дослідження?*

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, та їх достовірність. Запропоновані в дисертаційній роботі Губернаторової А.О. наукові положення, висновки і рекомендації є обґрунтованими та достовірними. Вони базуються на аналізі сучасного первинного матеріалу літературних джерел та баз даних, застосуванні великого обсягу сучасних методів дослідження, урахуванні світового теоретичного і практичного досвіду та використанні системного підходу, статистичним аналізом та узагальненням отриманих даних.

Новизна наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації. В дисертаційній роботі Губернаторової Анастасії Олександрівни вперше виявлено, що надекспресія TTP значно знижує рівень мРНК SH3PXD2A та CTTN, а також значно підвищує рівень мРНК SH3PXD2B на моделі ТНРМЗ людини. Вперше за допомогою конфокальної мікроскопії живих клітин безпосередньо показано інгібуючий вплив надекспресії TTP на

рухливість клітин та їх здатність до направленого руху. Описано вплив надекспресії ТТР на морфологію клітин, а також показано, що вона призводить до зменшення кількості актинових філаментів і значно знижує здатність клітин до інвазії.

Практичне значення дисертаційної роботи. Отримані в дисертаційній роботі Губернаторової А.О. дані вказують на те, що описаний інгібуючий вплив ТТР на міграцію та інвазію клітин реалізується, зокрема, впливом на фундаментальні функції клітин, а саме на рухливість і здатність до направлених рухів, що відбуваються завдяки цитоскелет-асоційованим протеїнам. Ці дані сприяють кращому розумінню молекулярних механізмів, які залучені до захисних функцій клітин, що стоять на шляху злоякісного переродження. Матеріали дисертації можуть бути використані як з метою оптимізації підходів до персоналізованої медицини та розробки лікарських засобів, спрямованих на таргетну терапію раку, так і для підготовки лекційних та практичних занять для студентів.

Повнота викладу основних результатів у наукових фахових виданнях.

Основні положення дисертації висвітлено в 4 статтях у наукових фахових виданнях, що цитуються в наукометричних базах Скопус Q2 та Q4 квартилей та 6 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних та міжнародних наукових з'їздів та конференцій.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності.

У дисертаційній роботі відсутні порушення академічної доброчесності. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело. Виконані спільні дослідження з іншими авторами відмічені в спільних публікаціях та подяках.

Структура і обсяг дисертації, оцінка її змісту, завершеності та відповідності встановленим вимогам.

Дисертація Губернаторової Анастасії Олександрівни оформлена відповідно до вимог наказу МОН України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації». Дисертація складається зі

вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел, який охоплює 277 найменувань. Дисертація викладена на 165 сторінках стандартного машинопису і містить 26 рисунків та 5 таблиць

В розділі **Огляд літератури** висвітлено сучасний стан проблеми щодо захворюваності на рак грудної залози та поширення цього захворювання. В 6 підрозділах **Огляду літератури** обговорюються питання щодо сучасного стану молекулярно-діагностичних маркерів та їх використання в діагностиці та прогнозуванні раку грудної залози. Відомо, що метастатична поведінка клітин реалізується за допомогою численних сигнальних каскадів, які впливають на реорганізації цитоскелету. Міграція клітин реалізується за допомогою перебудови актинових філаментів, а саме завдяки утворенню специфічних актин-збагачених протрузій плазматичної мембрани так званих подосом. Гетерогенізація пухлин призводить до виходу метастатично активного клону з первинної пухлини і направленого руху до органів-мішеней метастазування. В даному процесі задіяно різну кількість протоонкогенів, онкогенів а також онкосупресорів. В переважній більшості малігнізація супроводжуються мутаціями, які порушують гомеостаз та/або онкосупресивні сигнальні шляхи. Останніми роками одним із найбільш перспективних аспектів для досліджень механізмів реорганізації цитоскелету є вивчення шляхів посттранскрипційної регуляції його компонентів. Серед перспективних напрямків є дослідження молекул, що задіяні в порушеннях функцій реорганізації цитоскелетальних молекул. З'ясовано, що можливу роль в пост-транскрипційної регуляції експресії таргетних генів можуть бути тристетрапроліни. Ці протеїни вважаються ключовими регуляторами багатьох клітинних процесів, пов'язаних з малігнізацією, а їх експресія є дисрегульованою в багатьох типах раку та часто асоційована з клінічними характеристиками та прогнозами для пацієнтів, особливо при застосуванні хіміопрепаратів і, зокрема, доксорубіцину.

- До даного розділу є уточнюючі зауваження та побажання: так в Огляді літератури наведено сучасні дані щодо молекул, задіяних в

реорганізації цитоскелету метастатично активного пухлинного клону, проаналізовано вплив доксорубіцину як хіміопрепарату на ефективність протипухлинної терапії, зокрема його впливу на інвазивний та метастатичний потенціал, однак авторкою наприкінці даного розділу не наголошено щодо актуальності власного дослідження за обраною тематикою; чому власне такі молекули як тристетрапроліни потребують більш глибокого вивчення в якості мішеней, що задіяні в реорганізації цитоскелету клітин метастатичного клону

- *Також даний розділ переобтяжено скороченнями, які не наведено у Переліку умовних скорочень, що утруднює сприйняття матеріалу.*

Розділ **Матеріали та методи дослідження** побудовано за традиційною схемою, складається із переліку використаного обладнання, реактивів і матеріалів, спеціалізованих молекулярно-біологічних, біохімічних, клітинно-біологічних, біоінформативних та генетичних методик досліджень. Методичні прийоми та підходи детально описані, надано послідовності праймерів для проведення ПЛР, детально описані різнопланові молекулярні методи культивування клітин та трансфекції генів, виділення нуклеїнових кислот, експресії та очистки рекомбінантних білків, методи конфокальної мікроскопії, вестерн блот аналізу, надано методи статистичного аналізу.

Проте варто було б надати більш уточнюючу назву деяких підрозділів:

Наприклад, 2.2.Біоінформатичний аналіз нуклеотидних послідовностей ЧОГО? 2.9. Аналіз експресії (???) методом кількісної ПЛР в реальному часі

Також для кращого сприйняття необхідності застосування методів дослідження варто було б навести в підрозділах для чого використовувались ті або інші методи?

В розділі **результати експериментальних досліджень та обговорення** представлено результати власних досліджень, які починаються із підрозділу «Біоінформатичний пошук регуляторних елементів в мРНК генів, залучених до реорганізації цитоскелету», в якому надано ґрунтовну інформацію щодо генів задіяних в реорганізації цитоскелетальних актинових мікрофіламентів.

Представлено пошук регуляторних елементів, які б сприяли інгібуванню протоонкогенів та прозапальних сигнальних шляхів, і найбільшу увагу зосереджено на тристетрапроліні, який дестабілізує таргетні мРНК, та демонструє антионкогенний потенціал, шляхом пригнічення експресії генів, залучених до процесів запалення, метастазування, проліферації та виживання клітин. Більшість проаналізованих цитоскелет-асоційованих генів, мають спільні регуляторні елементи, серед яких сайти зв'язування для протеїнів Musashi, K-box, AU-збагачені елементи. Методом біоінформативного аналізу було проаналізовано задіяність тристетрапроліну (ТТР) як регуляторного мотиву в експресії цитоскелет-асоційованих генів, до яких, зокрема, належать SH3PXD2A, SH3PXD2B, CTTN, WIPF1 та WASL.

У наступному підрозділі описано результати проведені на клітинах лінії клітин MDA-MB-231, яка є естроген, прогестерон та Е-кадгерин негативною та експресує мутований p53. Геном клітини MDA-MB-231 кластеризується з базальним підтипом раку молочної залози, а також відсутність рецептору фактора росту другого типу HER2, дають підстави використовувати ці клітини як модель потрійного негативного раку молочної залози та досліджувати здатність до інвазії *in vitro*, а при ортотопічній імплантації на утворених ксенотрансплантах – вивчати спонтанне метастазування у лімфатичні вузли. У представленому дослідженні з використанням клітин MDA-MB-231 показано, що надекспресія ТТР значно знижує рівень мРНК SH3PXD2A та CTTN, одночасно підвищуючи рівень мРНК SH3PXD2B, але не впливає на рівні мРНК WIPF1 і WASL, що на морфофункціональному рівні призводить до значного зменшення площі клітин, кількості полімеризованих філаментів, а також збільшення їх товщини. Це призводить до зниження рухливості клітин, здатності до направлених рухів та інвазії.

У наступному підрозділі виявлено, що рівень експресії ZFP36 значно підвищений у зразках пухлин молочної залози людини з підвищеним рівнем HER2- субтипу, порівняно з іншими субтипами, і корелює з рівнем ампліфікації HER2, що дозволило дисертантці припустити використання високого рівня ZFP36 як біомаркера HER2-збагаченого РМЗ.

Далі висвітлено результати, згідно яких було встановлено, що хіміопрепарат доксорубіцин індукує експресію ZFP36 як на рівні мРНК, так і на рівні протеїну в моделях люмінального А та тричі-негативного раку молочної залози, та поставлено під сумнів його діагностичну цінність як біомаркера серед пацієнтів, які отримували цей препарат. Показано, що доксорубіцин також підвищує або не впливає на рівні мРНК SH3PXD2A, SH3PXD2B, CTTN, WIPF1 та WASL у моделях люмінального А та тричі-негативного РМЗ.

У підсумковому підрозділі описано результати експериментів, де показано зміни площі та форми клітин тричі-негативного РМЗ, ширини, довжини та кількості актинових філаментів, їх рухливості та здатності до направлених рухів, та показано, що направленість цих змін залежить від концентрації хіміопрепарату.

Щодо даного розділу виникало ряд запитань та зауважень

- 1. Представлені дослідження показують, що рівень експресії тристетрапроліну значно підвищений у пухлинах усіх субтипів, порівняно із умовно-здоровими прилеглими тканинами, хоча він і вищий у зразках HER2-збагаченого субтипів. За таких умов як ви оцінюєте реальну можливість використання експресії TTP як діагностичного маркера HER2-збагаченого субтипу?*
- 2. І в продовженні попереднього запитання хотілося б з'ясувати, яким чином і в співпраці з якими клінічними базами проводились дослідження на матеріалі пацієнтів з РМЗ? Також не прописані протоколи щодо відбору клінічного матеріалу та не вказано щодо поінформованих добровільних згод пацієнтів для використання їх біологічного матеріалу?*
- 3. Чи відомо Вам наскільки ефективна доксорубіцин-терапія для форм РМЗ з відсутніми рецепторами естрогенів, рецепторами HER2?*
- 4. Чи відомі вам якісь діагностичні підходи, які включають в себе використання TTP як діагностичного або прогностичного маркера? Можливо, для якихось типів раку TTP вже використовується в клінічній практиці? Наприклад за інших форм раку з високою ступінню інвазії?*

5. На рис. 3.22, де ви описуєте вплив доксорубіцину на морфологію клітин, на мікрофотографіях видно деяку кількість некротичних клітин. Чи враховували ви це під час інтерпретації результатів? Чи були ці клітини виключені із аналізу?
6. На блотограмах (рис. 3.15 та 3.16), а саме в панелях із TTP, чітко видно по дві смуги. Як Ви це можете інтерпретувати?

Наведені **Висновки**, відображають мету та завдання даного дослідження, логічно випливають із проведеного дослідження, вони цілком відповідають поставленим завданням та повністю ґрунтуються на отриманих результатах. Однак у формулюваннях висновків є неточності та граматичні помилки, наприклад: *Показано, що більшість з проаналізованих транскрипційних ізоформ цитоскелет-асоційованих генів, включених до даного дослідження, мають спільні регуляторні елементи, а саме: сайти зв'язування протеїнів Musashi, K-box та AU-збагачені елементи, а також можуть що SH3PXD2A, SH3PXD2B, CTTN, WIPF1 та WASL можуть бути таргетними мРНК РНК-зв'язувального протеїну TTP.*

Також неточності та граматичні помилки зустрічаються в тексті дисертації.

Проте наведені зауваження не знижують цінність проведеного фундаментального дослідження, що має науково-практичну цінність щодо залучення ще одного біомаркеру – тристетрапроліну до діагностики та прогнозування агресивних форм раку молочної залози з високою ступінню інвазії та нечутливістю до класичних схем хіміотерапії.

Отже, наукові положення, наведені в дисертації Губернаторової Анастасії Олександрівни «Роль тристетрапроліну в раку молочної залози людини», є достовірними, що підтверджується використанням великого обсягу експериментальних досліджень, логічністю постановки завдань, статистичним аналізом та узагальненням отриманих даних. Дисертація виконана з дотриманням усіх вимог біоетики.

Висновок. Дисертаційна робота Губернаторової Анастасії Олександрівни «Роль тристетрапроліну в раку молочної залози людини» є завершеним

науковоим дослідженням, що за актуальністю теми, новизною досліджень, теоретичним і практичним значенням отриманих результатів, а також сучасним методичним рівнем проведених досліджень, свідчить про високі наукові досягнення здобувачки. Базуючись на вищевказаному, вважаю, що дисертаційна робота Анастасії ГУБЄРНАТОРОВОЇ подана на здобуття ступеня доктора філософії, повністю відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року.

Тому вважаю, що здобувачка, ГУБЄРНАТОРОВА А.О., заслуговує на присудження їй ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія та Біохімія

Офіційний опонент:

Доктор біологічних наук, професор,
професор кафедри зоології та екології
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

Людмила ГАРМАНЧУК