ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

кандидата біологічних наук наукового співробітника лабораторії механізмів медикаментозної резистентності

Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології

ім. Р. Є. Кавецького НАН України

ЗАДВОРНОГО ТАРАСА ВОЛОДИМИРОВИЧА

на дисертаційну роботу

ГУБЄРНАТОРОВОЇ АНАСТАСІЇ ОЛЕКСАНДРІВНИ

на тему

«РОЛЬ ТРИСТЕТРАПРОЛІНУ В РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ»

подану на здобуття ступеня доктора філософії

з галузі знань 09 «Біологія»,

зі спеціальності 091 «Біологія та біохімія»

Актуальність обраної теми досліджень

Рак молочної залози (РМЗ) є однією із ключових медико-біологічних проблем сьогодення. Дані статистики свідчать, що РМЗ займає лідируючі позиції за показниками захворюваності та смертності як в Україні так і у світі. Згідно даних ВООЗ до 2050 року прогнозується зростання захворюваності на цю онкопатологію у 1,56 рази, а смертності в 1,7 рази, до 3,6 млн та 1,1 млн нових випадків на рік, відповідно.

Основною причиною смертності від РМЗ є розвиток метастатичної хвороби. Вважається, що ключовим етапом метастазування є здатність злоякісно трансформованих клітин до інвазії, що вимагає реорганізації актинового цитоскелету за участі численних білків, таких як GTPази, кінази та інтегрини. Зазначені зміни також залежить від стабільності мРНК, що регулюється через AU-збагачені елементи (ARE) у 3'-нетрансльованих ділянках мРНК, які взаємодіють із специфічними РНК-зв'язувальними протеїнами, такими як тристетрапролін (TTP).

TTP (ZFP36) є онкосупресором, що інгібує міграційну та інвазивну активність злоякісно трансформованих клітин. Низькі рівні експресії *ZFP36* на рівні білка та/або мРНК ідентифіковано у тканині злоякісних новоутворень

різного гістогенезу. Незважаючи на значний інтерес до TTP, його роль у регуляції генів, що беруть участь у реорганізації цитоскелету, залишається недостатньо дослідженою.

Важливу роль у лікуванні РМЗ сьогодні відводиться хіміотерапії. Одними з найбільш ефективних препаратів для лікування цієї патології є антрацикліни, які широко застосовуються у клінічній практиці починаючи з 80-х років минулого століття. Одним із основних хіміотерапевтичних препаратів антрациклінового ряду є доксорубіцин (Dox), застосування якого сприяло значному покращенню результатів комплексної терапії РМЗ та підвищенню як безрецидивної, так і загальної виживаності хворих. Він діє шляхом інтеркаляції у ДНК, спричиняючи генотоксичний стрес. Dox використовується як у терапії рецептор-позитивних пухлин, так і тричі-негативного РМЗ. Однак його ефективність та вплив на молекулярно-біологічні особливості трансформованих клітин, зокрема в контексті їх міграційної та інвазивної активності, вимагають подальшого вивчення, що в перспективі може сприяти оптимізації терапевтичних стратегій.

Враховуючи зазначене, актуальність дисертаційної роботи Губернаторової Анастасії Олександрівни, яка присвячена з'ясуванню ролі TTP у виникненні та прогресії РМЗ, а також дослідженню можливості його використання в якості прогностичного маркера, не викликає сумнівів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами

Дисертаційне дослідження виконано на базі відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології та генетики НАН України в рамках вітчизняних («Роль комплексів скафолдних протеїнів родин TKS та ITSN в регуляції нормальних і патологічних процесів клітини» (державний реєстраційний номер роботи 0121U110628), «Молекулярні компоненти інвадоподій як прогностичні фактори злоякісних пухлин грудної залози людини (проєкт НФДУ № 2020.01/0021»)) та міжнародних (European Regional Development Fund, CZ.02.01.01/00/22_008/0004562 "Excellence in Regenerative Medicine та Grant Agency of the Czech Republic, Project 24-11357S.) науково-дослідних робіт. Частину дослідження проведено у тісній співпраці із

закордонними колегами із Інституту молекулярної генетики Чеської Академії Наук (Чехія) та Інституту фізіології та генетики тварин Чеської Академії Наук (Чехія). Таким чином, робота має чіткий зв'язок з науковими програмами та планами відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології та генетики НАН України , що підкреслює її актуальність та наукову значущість у контексті вирішення важливих завдань сучасної онкології.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, що має комплексний характер та виконано на високому методологічному рівні у системах *in vitro* (на клітинах ліній РМЗ людини), *ex vivo* (на клінічному матеріалі хворих на РМЗ) та *in silico*. Структура викладеної здобувачкою роботи є логічною та послідовною: кожен розділ і підрозділ пов'язані між собою та формують цілісний науковий текст. Виклад матеріалу є чітким і зрозумілим, що забезпечує легке сприйняття інформації. Наукові положення та висновки дисертації обґрунтовані та підтверджені сучасними методами дослідження, такими як електрофорез протеїнів та нуклеїнових кислот, вестерн-блот аналіз, кількісна ПЛР, рестрикційний аналіз, імуноцитохімія, культура клітин та конфокальна мікроскопія. Статистичний аналіз даних проведено із використанням методів описової та варіативної статистики для малих вибірок. Нормальність розподілу перевірено із використанням W-критерію Шапіро-Уілка та критерію Колмогорова-Смірнова. З метою порівняння двох незалежних груп за кількісною ознакою використано t-критерій Стьюдента (для параметричного розподілу) або U-критерій Манн-Уітні (для непараметричного розподілу). Для порівняння трьох і більше незалежних груп застосовно аналізу ANOVA (для параметричного розподілу) або з критерієм Краскела-Уоліса (для непараметричного розподілу).

Таким чином, обсяг проведених досліджень та їх інформативність, що підкріплюються якісною методичною складовою, дозволили забезпечити

належний рівень доказовості та обґрунтованість наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.

Новизна представлених теоретичних та експериментальних результатів проведених здобувачем досліджень, повнота викладу в опублікованих працях

Наукова новизна представлених у дисертаційному дослідженні Губєрнаторової Анастасії Олександрівни «Роль тристетрапроліну в раку молочної залози людини» беззаперечна з огляду на наступні факти:

- здобувачкою здійснено пошук регуляторних елементів у 3'-некодуючих ділянках (3'-НТД) мРНК обраних генів, залучених до реорганізації актинового цитоскелета, і виявлено спільні сайти зв'язування для РНК-зв'язуючих протеїни родини Musashi, K-box та AU-збагачені елементи (ARE).
- в системі *in vitro* на моделі тричі-негативного РМЗ вперше показано, що гіперекспресія білка ТТР сприяє зниженню рівня мРНК *SH3PXD2A* та *CTTN*, а також підвищенню рівня мРНК *SH3PXD2B* у (ТНРМЗ)
- вперше продемонстровано інгібуючий вплив гіперекспресії ТТР на рухливість клітин і їх здатність до направленого руху, а також описано морфологічні зміни клітин за наявності підвищеного рівня експресії ТТР.
- вперше в системі *in vitro* на моделі РМЗ ідентифіковано особливості експресії *ZFP36* на рівні мРНК та білка, а також профілю експресії *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B* та *CTTN* під впливом DOX.
- вперше детально досліджено особливості експресії *ZFP36* у зразках тканини РМЗ різних молекулярних підтипів та встановлено можливість його використання в якості прогностичного маркеру.

Представлені у роботі результати опубліковані у 4 статтях у наукових фахових журналах, та 6 тезах доповідей у збірках матеріалів вітчизняних та міжнародних наукових з'їздів та конференцій. Статті опубліковано у вітчизняних (Biopolymers and Cell – Q4 (2024)) та закордонних журналах, які

індексуються у міжнародних базах даних. Закордонні журнали: Cytoskeleton, який має Q2 (2023), Gene Reports – Q4 (2023), Frontiers in neurology - Q2 (2023). Опубліковані праці відповідають вимогам п.8 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 від 12 січня 2022 р. №44. Окрім цього, результати досліджень були апробовані на численних вітчизняних та міжнародних наукових форумах у вигляді усних доповідей. Все висвітлене вище дозволяє стверджувати, що результати дисертаційного дослідження належним чином були представлені науковій спільноті для ознайомлення.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження

На підставі проведеного комплексного експериментального дослідження встановлено інгібуючий вплив TTP на міграцію та інвазію клітин РМЗ. Доведено, що зазначені ефекти реалізуються через вплив рухливість клітин РМЗ та їх здатність до направленого руху, які обумовлені активністю цитоскелет-асоційованих білків.

Встановлено, гетерогенний характер експресії TTP у тканині різних молекулярних підтипів РМЗ. Разом з тим, отримані в ході дослідження впливу DOX на рівні мРНК та білкового продукту TTP дані, свідчать про перспективність та необхідність подальшого вивчення можливості використання цього маркера з метою прогнозування перебігу РМЗ та визначення чутливості до хіміотерапії.

Загалом, отримані фундаментальні дані розширюють сучасні уявлення про роль TTP у виникненні та прогресії РМЗ.

Матеріали дисертації можуть бути використані як з метою оптимізації підходів до персоналізованої медицини та розробки лікарських засобів, для таргетної терапії РМЗ. Окрім того, результати проведеного дослідження можуть бути використані у матеріалах лекцій лікарям на курсах підвищення кваліфікації, студентам біологічних факультетів та медичних університетів

Особистий внесок здобувача

Дисертанткою спільно з науковим керівником сформовано мету і завдання, а також розроблено дизайн дослідження. Планування окремих фрагментів роботи проведено спільно із колегами із Інституту молекулярної генетики Чеської Академії Наук. Аналіз рухливості та морфології клітин ліній РМЗ людини виконано у співпраці із закордонними колегами із Інституту молекулярної генетики Чеської Академії Наук. Здобувачкою було самостійно проаналізовано літературні дані за тематикою роботи та підготовано огляд. Усі результати, отримані у процесі дослідження, є результатом власної роботи здобувача або результатом спільної роботи із співавторами публікацій.

Аналіз структури дисертації

Дисертація викладена на 165 сторінках стандартного машинопису українською мовою та проілюстрована 26 рисунками та 5 таблицями. Робота складається зі анотації, змісту, переліку умовних позначень, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків. Список літературних джерел налічує 277 посилань, 53% яких опубліковані за останні 10 років.

Анотація викладена українською і англійською мовами та відображає короткий змісту дисертаційної роботи, а також наводить перелік публікацій, в яких викладені основні результати дослідження.

У ***вступі*** дисертації аргументовано актуальність теми дослідження, сформульовано мету та завдання, які необхідно вирішити для її досягнення, викладені наукова новизна і практична значимість отриманих результатів, а також відомості про особистий внесок здобувача та апробацію результатів виконаної дисертаційної роботи. Варто зауважити, що робота була успішно виконана згідно поставлених завдань, що відображено у висновках роботи.

Перший розділ – «Огляд літератури» – складається із 6 підрозділів та присвячений висвітленню сучасного стану молекулярно-біологічних досліджень при РМЗ. Дисертантка описує сучасну молекулярного-генетичну класифікацію

РМЗ на основі якої сьогодні базується визначення тактики лікування цієї онкопатології. Авторка наголошує на нагальній потребі у проведенні досліджень, спрямованих на пошук та розробку більш точних та ефективних методів діагностики та прогнозування перебігу РМЗ з метою підвищення якості життя хворих. Особлива увага приділяється молекулярним механізмам метастазування та ролі TTP у цьому процесі. Поряд з цим, здобувачем описано дію DOX на транскрипційний профіль злоякісно трансформованих клітин, як одного із основних хіміотерапевтичних препаратів для лікування РМЗ. Варто зазначити, що огляд літератури базується на аналізі великого об'єму літературних даних, що переважно представлені іноземними публікаціями останніх років.

Другий розділ – «Матеріали і методи дослідження» відображає повний арсенал методичних підходів, а також детальний перелік матеріалів та обладнання, яке було використано дисертанткою для вирішення завдань дослідження і досягнення поставленої мети. Слід зазначити, що усі застосовані при виконанні роботи методи детально описані і за потреби можуть бути відтворенні.

У ***третьому розділі – «Результати експериментальних досліджень та їх обговорення»,*** який складається із 5 підрозділів, викладено результати власних досліджень. Дисертанткою наведено результати біоінформатичного пошуку регуляторних елементів в мРНК 49 транскрипційних варіантів генів, що кодують фактори нуклеації, елонгації та реорганізації актинових філаментів, а також деяких скафолдних протеїнів, залучених до цих процесів. Представлено дані отримані в системі *in silico*, які вказують про можливу участь TTP у регуляції експресії *SH3PXD2A, SH3PXD2B, CTTN, WIPF1* та *WASL*. Детально охарактеризовано вплив TTP на морфологічні особливості клітин РМЗ, зокрема на кількість, ширину та організацію актинових філаментів, а також рухливість та здатність клітин до інвазії. У підрозділі 3.3наведено коротку клініко-патологічну характеристику хворих на РМЗ, пухлинна тканина яких була використана для аналізу профілю експресії *ZFP36*. Здобувачкою також відображено результати аналізу зв'язку між рівнями цього біомаркера та основними клініко-

патологічними характеристиками та показниками виживаності хворих, що вказує на перспективність його використання в якості прогностичного маркера HER2/neu-позитивному РМЗ. Також у цьому розділі викладено результати дослідження впливу DOX на експресію *ZFP36, SH3PXD2A, SH3PXD2B, CTTN, WIPF1* та *WASL* в клітинах ліній MCF7 та MDA-MB-231 РМЗ людини.

У четвертому розділі – «Аналіз та узагальнення отриманих результатів» авторка, обговорюючи власні дані, зіставляє їх з існуючими відомостями літератури.

Висновки, що представлені в роботі та висунуті на захист, обґрунтовані, логічно випливають із отриманих даних та відповідають поставленим меті і завданням.

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертаційної роботи були представлені та обговорені на численних вітчизняних і закордонних конференціях, зокрема: Minisympozium BIOCEV Regeneration III (Прага, Чехія, 28 листопада 2023); Конференція молодих вчених ІМБГ НАН України (Київ, Україна, 21 лютого 2023); XVI Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, Україна, 15–17 червня 2022); XV Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, Україна, 26–27 травня 2021); XIV Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, Україна, 27–28 травня 2020), XI Parnas Conference: Young Scientist Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (Київ, Україна, 3-5 вересня 2018).

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності

У дисертаційній роботі «Роль тристетрапроліну в раку молочної залози людини» під час комп'ютерного тестування електронної форми дисертації за допомогою системи Turnitin (Turnitin, LLC (США)) не було виявлено академічного плагіату, фальсифікації чи інших порушень, які могли б поставити під сумнів самостійність виконаного наукового дослідження. Текст наданих

матеріалів дисертаційної роботи є оригінальним.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувача

Загалом, представлена або рецензована Губєрнаторовою Анастасією Олександрівною на здобуття ступеня доктора філософії дисертаційна робота складає позитивне враження, результати дослідження отримані на високому методологічному рівні та доступно і логічно викладені, супроводжуються якісним ілюстративним матеріалом. Проте, під час рецензування дисертації виникли певні зауваження щодо її оформлення, які, не є суттєвими та не впливають на загальну цінність роботи, а спрямовані тільки на її доповнення та вдосконалення.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації:

- Тема дисертаційної роботи хоч є лаконічною та водночас надто загальна і могла б бути сформульована більш чітко у відповідності до загальної мети роботи, яка навпаки є надто громіздкою. Окрім того, формулювання мети роботи подані в анотації та вступі різняться.
- Завдання 4 «Визначити рівень експресії *ZFP36* в зразках пухлин молочної залози людини різних субтипів та оцінити можливість його використання як біомаркеру певних субтипів пухлин молочної залози людини» варто переформулювати у більш коректну форму.
- У вступі варто надати інформацію про розгляд Комісією з питань біоетики Інституту молекулярної біології та генетики НАН України щодо дотримання етичних принципів при виконанні дисертаційного дослідження.
- Розділ 1 «Огляд літератури» бажано завершити невеликим підсумком, що дозволить ще раз наголосити на актуальності проведеного дослідження.
- Не вказано критерії включення/виключення хворих на РМЗ у дослідження.
- У підрозділі 3.3.1. «Формування вибірки зразків пухлин молочної залози людини різних типів» відсутня інформація про гістологічний тип РМЗ та ступінь диференціювання новоутворень, хоча ці характеристики є

ключовими при виборі тактики лікування.

- У підрозділі 3.3.2. «Визначення профілю експресії *ZFP36* в зразках пухлин молочної залози людини різних типів» авторка надає інформацію про залежність рівня експресії у тканині РМЗ від стадії злоякісності, яка на Рис. 3.8. (Ст. 91) позначається як «G1, G2, G3, G4». Що мається на увазі, адже загально прийнято літерою «G» позначати ступінь диференціювання новоутворень? У підписі цього ж рисунку є ще одна помилка, а саме категорія Т відображає розмір новоутворення, а не його гістологічні характеристики.
- На рис. 3.18 та 3.21, що теплову карту кореляційних зв'язків рівнів експресії *ZFP36*, *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* у клітинах ліній РМЗ людини після їх культивування з DOX не представлено значення «p», що не дозволяє зрозуміти статистичну значущість отриманих даних.
- Номери рисунків на ст. 91 та ст.92 ідентичні – 3.8
- Підпис до рис. 3.8 на ст. 92 складається із 2 частин – а та б, хоча сам рисунок є єдиною стовпчастою діаграмою
- Таблиця 1.1, що міститься 4 сторінках, та Таблиця 3.1, що міститься на 3 сторінках мають назви строк/стовбців лише на перших сторінках, що ускладнює їх аналіз та сприйняття.
- У роботі трапляються некоректні фрази, формулювання та досить часто відмічається вживання тавтологізмів, яких бажано уникати (Наприклад, ст. 22, 38, 76, 81, 90 та ін.).
- Необхідно провести інвентаризацію використаних абревіатур, оскільки в тексті роботи часто на рівні із введеними скороченнями вживаються повні терміни (Наприклад, ст. 47, 50, 76 та ін.).

Запитання до здобувача:

1. Чи отримували хворі на РМЗ на момент забору клінічного матеріалу терапію в неоад'ювантному режимі? Який саме матеріал було використано для дослідження (біопсійний або операційний)? .
2. Якими гістологічними типами були представлені злоякісні новоутворення молочної залози? Який ступінь диференціювання пухлин переважав ?

3. Чи можна розглядати *ZFP36* в якості маркера чутливості РМЗ до DOX?
4. Чи є в доступній літературі інформація про рівні мРНК *ZFP36* в сироватці крові хворих на РМЗ, або ж, можливо, Ви маєте власні дані такого характеру?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційне дослідження Губєрнаторової Анастасії Олександрівни «Роль тристетрапроліну в раку молочної залози людини», представлене на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія» є самостійним, завершеним науковим дослідженням, що містить експериментально обґрунтовані новітні наукові положення та не порушує принципів академічної доброчесності. Актуальність теми, новизна дослідження, теоретичне і практичне значення отриманих результатів, а також сучасний методичний рівень проведених досліджень, свідчать про високі наукові досягнення здобувача, а дисертаційне дослідження повністю відповідає наказу МОН України «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» від 12 січня 2017 р. №40 та положенню Постанови Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44 «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (зі змінами, внесеними згідно із постановою Кабінету Міністрів України №341 від 21.03.2022р. та постановою Кабінету Міністрів України №502 від 19.05.2023р.). Враховуючи зазначене, здобувач заслуговує присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 - Біологія за спеціальністю 091 – Біологія та біохімія.

Офіційний опонент:
кандидат біол. наук,
науковий співробітник
лабораторії механізмів медикаментозної резистентності
ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького
НАН України Тарас ЗАДВОРНИЙ

Підпис Тараса Задворного
ЗАСВІДЧУЮ
Учений секретар
ін-ту