

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу

**ГУБЕРНАТОРОВОЇ АНАСТАСІЇ ОЛЕКСАНДРІВНИ
«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 роботи.

Онкологічні захворювання є одними з найпоширеніших причин смертності та втрати активного здорового довголіття сучасного людства. Рак молочної залози відрізняється своєю гетерогенністю, молекулярними особливостями серед різних підтипів та необхідністю застосування різних протоколів прогнозу перебігу хвороби та лікування. Розкриття впливу участі молекулярних процесів у клітинах, зокрема посттранскрипційної регуляції експресії генів на активність канцерогенезу, онкогенні властивості ракових клітин та здатності до інвазії та метастазування є актуальною задачею сучасної молекулярної біології, експериментальної онкології та інших суміжних біологічних та медичних наук. Значна роль у посттранскрипційній регуляції експресії генів належить РНК-зв'язувальним протеїнам, які приймають участь як у модулюванні стабільності транскрипту так і в, просторово-часовій репресії трансляції.

Тристетрапролін (ТТР) відноситься до одноіменної родини РНК-зв'язувальних протеїнів, які вважаються ключовими регуляторами багатьох клітинних процесів через пост-транскрипційну регуляцію експресії таргетних генів, пов'язаних з малігнізацією та інвазією. Ця регуляція відбувається за рахунок специфічного зв'язування з AU-збагаченими елементами мРНК таргетних генів. Процеси метастазування пухлинних клітин в свою чергу тісно пов'язані зі станом цитоскелетом ракових клітин.

Результати досліджень впливу тристетрапроліну на процеси канцерогенезу мають суперечливі свідчення про роль цього протеїну. Тому актуальною є мета представленої роботи з вивченням особливостей впливу експресії тристетрапроліну на білки цитоскелету в контексті клітинної рухливості та інвазії на моделі раку молочної залози, впливу ТТР на морфологію, рухливість та інвазійний потенціал пухлинних клітин у нормальних умовах та під впливом певного виду терапії, а також пошук регуляторних елементів в мРНК генів, залучених до реорганізації цитоскелету.

Все це разом дає можливість поглибити уяву про процеси інвазії, метастазування клітин раку молочної залози та їх молекулярні механізми на різних етапах регуляції експресії генів у клітинах.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота Губернаторової А.О. виконана у рамках науково-дослідних тематик відділу функціональної геноміки та у співпраці з Інститутом молекулярної генетики Чеської Академії Наук й Інститутом фізіології та генетики тварин Чеської Академії Наук.

Оцінка обґрунтованості наукових результатів і висновків, сформульованих у дисертаційній роботі.

Матеріали дисертаційної роботи викладено згідно поставленої мети та завдань на основі обраних предмету та об'єкту дослідження. Дисертантка провела детальний огляд літератури стосовно сучасного стану проблеми дослідження раку молочної залози, молекулярних механізмів метастазування, посттранскрипційної регуляції експресії генів та ролі тристетрапроліну у цій регуляції. Завдяки глибокому аналізу сучасного стану досліджуваних питань дисертантці вдалось чітко визначити методи дослідження та необхідний об'єм даних для отримання достатньої кількості наукових результатів високої якості, які проаналізовані адекватними статистичними методами. Слід зазначити, що Губернаторовою А.О. у роботі використано як біоінформатичні методи та підходи, так і молекулярно-біологічні, клітинні, біохімічні, імуноцитохімічні, мфкроскопічні методи дослідження.

Висновки дисертаційної роботи відповідають назві, меті та завданням дослідження, повно та чітко відображають отримані дисертанткою результати. Вони є глибоко обґрунтованими та відображають основний зміст роботи.

Наукова новизна представлених результатів, повнота викладення в опублікованих працях.

Губернаторовою А.О. вперше виявлено, що надекспресія тристетрапроліну значно знижує рівень мРНК *SH3PXD2A* та *CTTN*, а також значно підвищує рівень мРНК *SH3PXD2B* на моделі тричі негативного раку молочної залози людини. Вперше за допомогою конфокальної мікроскопії живих клітин безпосередньо показано інгібуючий вплив надекспресії ТТР на рухливість клітин та їх здатність до направленого руху. Показано, що надекспресія ТТР призводить до зменшення об'ємів клітин та кількості актинових філаментів і значно знижує здатність клітин до інвазії.

Дисертанткою виконано пошук та аналіз регуляторних елементів в 3'-НТД мРНК вибраних генів, залучених до реорганізації актинового цитоскелету, та знайдено спільні: сайти зв'язування для РНК-зв'язувальних протеїнів родини Musashi, K-box та AU-збагачені елементи.

Вперше показано, вплив Доксوروبіцину на профіль експресії *SH3PXD2A*, *SH3PXD2* та *CTTN*. Показано, що цей хіміотерапевтичний препарат знижує рухливість та значно впливає на морфологію клітин моделі тричі-негативного раку молочної залози людини. Вперше детально вивчено профіль експресії ZFP36 у зразках пухлин молочної залози людини різних субтипів.

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) 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).

Теоретичне та практичне значення результатів дисертаційної роботи.

Результати дисертаційної роботи Губернаторової А.О. розкривають роль РНК-зв'язувального білку тристетрапроліну, що приймає участь у

посттранскрипційній регуляції експресії генів, зокрема цитоскелету, в раку молочної залози людини в контексті клітинної рухливості та інвазії. Змоельована авторами над експресія тристетрапроліну призводить до зниження експресії цитоскелет-асоційованих генів SH3PXD2A та CTTN в клітинах моделі TНPMЗ і супроводжується значним зниженням їх здатності до рухливості та інвазії, що розкриває нові потенційні аспекти його дії як антионкогенного протеїну. Також виявлено спірність його використання як позитивного прогностичного маркера РМЗ, оскільки його експресія варіює в зразках пухлин РМЗ різних патоморфологічних та молекулярних характеристик та може індукуватися доксорубіцином.

Отримані дані розширюють уявлення про роль тристетрапроліну у канцерогенезі раку молочної залози людини. Представлені дослідження вказують на те, що описаний інгібуючий вплив ТТР на міграцію та інвазію клітин реалізується, зокрема, впливом на рухливість і здатність до направлених рухів клітин, що відбуваються завдяки білкам цитоскелету.

Вивчення впливу доксорубіцину на рівні як мРНК, так і білкового продукту тристетрапроліну вказують на те, що необхідні подальші дослідження щодо використання його як біомаркера принаймні в тричі-негативному та люмінальному А субтипах раку. У роботі показано, що профіль експресії ТТР значно варіює в різних підтипах пухлин молочної залози людини, що також накладає обмеження на його використання як позитивного прогностичного маркера.

Оцінка змісту дисертаційної роботи, мови, стилю, дотримання норм академічної доброчесності.

Дисертаційна робота Губернаторової А.О. викладена українською мовою на 166 сторінках та має стандартну структуру й складається з анотації, вступу, огляду літератури (розділ 1), матеріалів і методів (розділ 2), результатів досліджень та їх обговорення (розділ 3), аналізу та узагальнення результатів (розділ 4), висновків, списку використаних джерел та одного додатку. Робота містить 26 рисунків та 5 таблиць, у переліку використаних джерел 277 посилань.

Більшість експериментальних результатів отримано здобувачкою особисто.

У вступі дисертаційної роботи, відповідно до вимог, викладено дані про актуальність теми дослідження, мету та завдання дослідження, об'єкт та предмет дослідження, методи, наукову новизну, практичне значення отриманих результатів, особистий внесок здобувача, дані про апробацію результатів дисертації, публікації, структуру та обсяг дисертації.

У першому розділі роботи – Огляд літератури, докладно та змістовно проаналізовано сучасний стан питань щодо досліджень раку молочної залози. Детально описана класифікація пухлин молочної залози у аспекті маркерів підтипів і прогнозів перебігу захворювання. Дуже докладно проаналізовано молекулярні механізми метастазування з етапами формування інвадоподій та участі білків цитоскелету в цьому процесі. Також охарактеризовано деякі ключовими протеїни, що є компонентами міграції та інвазії. Також детально проаналізовано етапи пост транскрипційної регуляції експресії генів на різних етапах канцерогенезу та функції РНК-зв'язувальних протеїнів, у тому числі тристетрапроліну у цих процесах. Також коротко описано загальні відомості про доксорубіцин та механізми його впливу на експресію низки генів.

Другий розділ дисертаційної роботи за вимогами присвячений матеріалам та методам дослідження. В цьому розділі вичерпно та детально описано методи та підходи, які використано у роботі Губернаторової А.О. Слід зазначити, що дисертантка використала низку сучасних біоінформатичних підходів для аналізу 3'-НТД різних транскрипційних ізоформ з метою пошуку АУ-збагачених ділянок генів для взаємодії з РНК- зв'язувальними протеїнами. Також у роботі використано методи молекулярного клонування, роботи з ДНК та РНК клітинних ліній та пухлин, методи детекції експресії генів на рівні РНК та білку, методи культивування ракових клітинних ліній та імуноцитохімічний, спектрофотометричний, мікроскопічні методи аналізу морфологічних та метаболічних показників клітин. У роботі проведено адекватний статистичний аналіз кількісних показників.

У розділі 3 дисертаційної роботи представлено власне результати експериментальних досліджень та їх обговорення. Спочатку представлено результати біоінформатичного пошуку регуляторних елементів генів, залучених до реорганізації цитоскелету, зокрема *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL*. Далі описано результати впливу ектопічної надекспресії тристетрапроліну на експресію генів цитоскелету та морфологію клітин й їх властивості до руху та інвазії.

У наступному підрозділі Розділу 3 наведено дані стосовно аналізу експресії тристетрапроліну (ZFP36) в зразках пухлин молочної залози людини різних типів та його можливого використання в якості прогностичного маркеру. Далі наведено аналіз виживаності пацієнтів з РМЗ різних субтипів у когортах з високим та низьким рівнями експресії ZFP36 згідно бази даних GEPIA та доведено, що при розділенні цих даних за різними субтипами висока експресія ZFP36 може корелювати як із сприятливим, так і з несприятливим прогнозом захворювання. У наступних підрозділах проведено дослідження впливу доксорубіцину на клітинні лінії люмінального А та тричі-негативного раку молочної залози на експресію генів цитоскелету, тристетрапроліну, проведено визначення цитотоксичності препарату на досліджувані клітинні лінії. Далі проведено вивчення впливу доксорубіцину на морфологію та рухливість клітин лінії MDA-MD-231.

Рисунки, наведені у Розділі 3 змістовні та якісні, підписи до них чіткі та зрозумілі.

Розділ 4 присвячено аналізу та узагальненню отриманих результатів дисертаційної роботи. В ньому стисло, але по суті проведено співставлення отриманих результатів з існуючими даними літератури, проведено коректне порівняння та зроблено адекватні узагальнення.

Висновки, наведені в дисертаційній роботі Губернаторової А.О., в цілому відповідають поставленій меті та завданням дослідження, адекватно та коректно висвітлюють основні результати досліджень.

Список використаних джерел складається з 277 посилань на першоджерела у вітчизняних і міжнародних виданнях.

Порушень норм академічної доброчесності, запозичень, плагіату у представленій дисертаційній роботі Губернаторової А.О. не виявлено.

Таким чином, дисертація Губернаторової Анастасії Олександрівни викладена у науковому стилі, грамотною мовою, відповідає діючим вимогам, що пред'являються до дисертаційних робіт та є завершеною науковою працею, результати якої вирішують актуальну наукову задачу сучасної молекулярної біології та мають високе теоретичне та практичне значення.

Зауваження до дисертаційної роботи:

У вступі відсутня назва про теоретичне значення роботи, хоча у пункті «практичне значення роботи» подано опис як практичного, так і теоретичного значення. Також у вступі відсутні назви конкретних тем відділу, за якими виконано представлену дисертаційну роботу.

В анотації та вступі дещо по-різному сформульовано мету дисертаційної роботи, хоча по суті вони співпадають.

С.69 «Як було зазначено в огляді літератури, реорганізація актинового цитоскелету як загалом, так і під час міграції та інвазії – тонко регульований процес, який порушується під час злоякісної трансформації клітин (66,67,201)» - не дуже вдалий вираз - у дисертаційній роботі прийнято посилались на опубліковані роботи вчених (інших, або свої), а не на свій огляд літератури. Більш коректно було б зазначити, що «аналіз сучасних даних літератури, який представлено в огляді літератури...» С.122 (Розділ 4) – подібний вираз «Як згадувалося в огляді літератури».

С.71 Таблиця 3.1. розташована на 3 сторінки, а назви регуляторних елементів є тільки на першій з них – не дуже зручно аналізувати таблицю у цьому форматі – краще було б колонки та строки поміняти місцями, щоб всі назви регуляторних елементів були на кожній сторінці.

С.76, с.88 Вираз «З літературних джерел» є невдалим, більш коректно «згідно даних літератури», бо «літературні джерела» - зазвичай художні твори, а не наукові.

С.88. У підрозділі «3.3.1. Формування вибірки зразків пухлин молочної залози людини різних типів» добре було б при описі вибірки так вказати загальну кількість зразків, щоб не шукати цю цифру в інших розділах дисертації та не здогадуватись по цифрам кількості зразків по підтипам.

У Розділі 3, де описано результати досліджень використовуються в основному назви генів цитоскелету, тоді як в Розділі 4 частіше наведено назви білків цих генів, які дуже відрізняються від назв генів – і це не дуже легко та зручно для сприйняття інформації.

Різне написання: С. 22, 37, 38, 41, 42, 69, 127 «пост-транскрипційна регуляція», тоді як на с. 2, 16, 21, 37, 38, 39 «посттранскрипційна регуляція»

Висновок 7 краще було б розділити на 2 окремих висновки.

Більшість зауважень стосується недоліків оформлення, або не зовсім вдалих виразів та не впливають на змістовну та наукову частину роботи.

Представлена дисертаційна робота має високу позитивну оцінку.

Дискусійні питання:

1. З чим, на Вашу думку, пов'язані різні рівні експресії тристетрапроліну у різних підтипах пухлин молочної залози та інших раків?

2. Який вплив на метастазування може чинити тристетрапролін при його високій та низькій експресії? Можливі молекулярні механізми.

3. Які властивості можуть бути притаманні раковим клітинам при високій та низькій експресії тристетрапроліну?

4. На основі отриманих результатів дисертаційної роботи як Ви можете описати вплив тристетрапроліну на механізм утворення інвадоподій.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Губернаторової Анастасії Олександрівни «Роль тристетрапроліну в раку молочної залози людини», представлено на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 09 - «Біологія» за спеціальністю 091 - «Біологія та біохімія» є самостійною завершеною науковою працею, що містить новітні наукові положення, які обґрунтовані отриманими результатами та не порушує принципів академічної доброчесності.

За методичним рівнем виконання, обсягом проведених досліджень, науковою новизною результатів, повнотою публікацій матеріалів дослідження, їх апробації на наукових конференціях дисертаційне дослідження повністю відповідає галузі знань 09- «Біологія», спеціальності 091- «Біологія та біохімія» та сучасним вимогам, які висуваються до дисертацій, затвердженим наказом 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.), а її авторка заслуговує присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 - «Біологія та біохімія».

Рецензент:

Провідний науковий співробітник

відділу молекулярної онкогенетики,

доктор біологічних наук,

старший дослідник ІМБГ НАН України

Ганна ГЕРАЩЕНКО