

ВІДЗИВ

офіційного опонента

на дисертаційну роботу РУДЕНКО Євгенії Євгеніївни
"Пошук потенційних генів-супресорів пухлинного росту для світлоклітинної карциноми нирки людини", представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика

Вивчення молекулярних механізмів канцерогенезу та генетичної супресії росту пухлин є надзвичайно важливим напрямком сучасної молекулярної біології і генетики, який має велике значення для розробки методів боротьби з онкологічними захворюваннями. Дисертаційна робота Є. Є. Руденко присвячена пошуку генів-супресорів росту пухлин для світлоклітинної карциноми нирки людини і вивченню особливостей експресії таких генів. Оскільки, з одного боку, світлоклітинна карцинома нирки займає третє місце по частоті захворювань серед урологічних пухлин, а з іншого – молекулярні механізми онкосупресії залишаються недостатньо з'ясованими, тому дисертаційної роботи слід визнати **актуальною** – перш за все, з прикладної точки зору.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділів функціональної геноміки і молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Дисертація, що побудована за загальноприйнятою схемою, містить 134 сторінки основного тексту, ілюстрована 16 рисунками і 10 таблицями, список використаних джерел містить 288 посилання, серед яких переважають роботи останніх років. В цілому дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 11 публікацій, в тому числі 7 статей у фахових наукових журналах. При цьому 6 статей надруковано в журналах, що входять до наукометричної бази даних Scopus (серед них одна публікація в журналі з імпаکت-фактором на рівні 2). Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо молекулярних основ канцерогенезу і онкосупресії, а також нових молекулярно-біологічних підходів в онкологічних дослідженнях, є стислим, але змістовним – таким, що демонструє належний рівень теоретичної підготовки автора.

У роботі використано широкий набір сучасних методів молекулярної біології і генетики, описаних у Розділі 2: гібридизація ДНК на NotI-мікрочіпах, кількісна полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі (кПЛР), зворотньо-транскриптазна кПЛР, метил-специфічна ПЛР, аналіз кількості тринуклеотидних повторів, біоінформатичні і статистичні методи.

Робота Є. Є. Руденко мала на меті встановити потенційні гени-супресори світлоклітинної карциноми нирки людини, вивчити рівні їхньої експресії, статус метилування ДНК у промоторних ділянках і з'ясувати наявність делецій таких генів у пухлинних тканинах. Отримані результати представлені у трьох підрозділах розділу 3.

Перший підрозділ присвячено аналізу делецій/ампліфікацій і метилування ДНК у NotI-сайтах хромосоми 3 людини у 23 зразках пухлинних тканин за допомогою NotI-мікрочіпів. Було знайдено 22 гени, зміни в яких (делеції та/або підвищення ступеня метилування) спостерігались більш ніж у 17% зразків. Частина цих генів була відома раніше як такі, що асоційовані з різними типами карцином. На основі отриманих даних і біоінформатичного аналізу автор відібрала 8 генів для подальших досліджень.

Результати таких більш детальних досліджень 6 відібраних генів представлено у другому підрозділі (2 інші гени виявились такими, що не експресуються). Для кожного з цих генів проведено аналіз його експресії в пухлинних зразках за допомогою зворотньо-транскриптазної кПЛР, рівня метилування за допомогою метил-специфічної ПЛР, кількості копій гена за допомогою кПЛР. Представлені результати свідчать, що деякі з цих генів дійсно можуть розглядатись як потенційні гени-супресори або молекулярні маркери для світлоклітинної карциноми нирки.

Третій підрозділ присвячено аналізу бази даних, що містить інформацію про рівень експресії досліджених автором генів у зразках пухлин. Загалом, біоінформатичний аналіз підтверджує отримані автором експериментальні результати.

У Розділі 4, який присвячено обговоренню отриманих результатів, автор, аналізуючи їх у загальному контексті даних інших дослідників, обґрунтовує можливу участь досліджених нею генів у канцерогенезі і можливість їхнього використання у якості молекулярних маркерів.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи Є. Є. Руденко полягає в тому, що в ній отримані нові результати щодо потенційних генів-супресорів світлоклітинної карциноми нирки людини – проаналізовано зміни їхньої експресії та кількості копій цих генів у пухлинних зразках та деякі інші характеристики. Представлені у роботі дані збагачують знання щодо генів, пов'язаних із зазначеним онкологічним захворюванням. Отримані результати можуть також сприяти з'ясуванню механізмів онкологічних захворювань і пошуку нових терапевтичних препаратів для їхнього лікування. Наведені у дисертації результати і висновки знайдуть застосування перш за все в наукових дослідженнях у галузі молекулярної онкогенетики, а також у практичних розробках, що проводяться в академічних, освітніх та медичних установах, які працюють над вивченням канцерогенезу і пошуком нових підходів у лікуванні онкологічних захворювань.

Використання сучасних експериментальних методів, застосування експериментальних підходів, що доповнюють один одного, узгодження отриманих результатів з існуючими експериментальними даними і висновками інших авторів дозволяють констатувати загальну **достовірність експериментальних результатів та обґрунтованість наукових висновків.**

Проте, до дисертаційної роботи Є. Є. Руденко виникли наступні зауваження та запитання.

1. Незрозуміло, до чого відноситься підрозділ 2.8 у "Матеріалах і методах". У його назві йдеться про аналіз поліморфізму деяких локусів, про які не згадується далі.

2. Некоректною є назва підрозділу 3.1: "Широкомаштабний аналіз змін експресії генів при раку нирки" (в усіх цитатах збережено орфографію автора). У підрозділі йдеться про аналіз делецій і метилування ДНК шляхом гібридизації геномної ДНК з NotI-мікрочипами, а зовсім не про аналіз експресії генів.

3. Кілька питань викликає маленький підрозділ 3.1.2 (аналіз відкритих біоінформатичних баз даних). На початку підрозділу сказано, що проаналізовано "11 баз даних". Але, судячи з наведених номерів, мова йде про набори даних (DataSets) у базі GEO на порталі NCBI – вся ця інформація у тексті відсутня, крім того, у слід було б чітко вказати всі 11 проаналізованих наборів, а не приклади. Далі незрозуміло, що за дані "гібридизації 84 зразків нормальної тканини та 83 зразків пухлини нирки", з якими порівнювались результати аналізу, маються на увазі. Які конкретно бібліотеки проаналізовано за допомогою SAGE Digital Gene Expression Displayer (на цей ресурс непогано було б дати посилання)? Які 12 генів було ідентифіковано, що їх експресія "співпадала за даними гібридизації мікрочіпів і у базах даних SAGE"?

4. Викликає подив підрозділ 3.2.1. Його назва ("Профіль метилування промоторних ділянок генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* та сімейства генів *GPX* і втрата гетерозиготності в зразках тканини СККН") є ненабагато коротшим, ніж сам підрозділ, що займає два абзаци і не містить жодних ілюстрацій. Автор зазначає, що, за отриманими нею даними (дані не наводяться), промотори досліджених генів "не метиловані ані в зразках пухлин, ані в умовно нормальних тканинах". Наступна фраза: "Тому, з метою виявлення делецій в гомо- та гетерозиготних делецій використано метод аналізу втрати гетерозиготності" є незрозумілою. Далі автор зазначає, що "досліджувані поліморфні маркери не є поліморфними". Якщо так, то про яку втрату гетерозиготності йдеться у назві підрозділу?

5. У деяких моментах не зовсім коректним виглядає обговорення результатів, що стосуються визначення рівнів експресії досліджених генів. Наприклад, стосовно гена *NKIRAS1* автор стверджує, що його експресія виявилася зниженою у 75% (9 з 12) пухлинних зразків. Формально це так (рис. 3.2), але *суттєво* зниженим (більш ніж у 10 разів) рівень експресії був тільки в одному зразку. Якби був наведений *середній* рівень експресії по пухлинних зразках (із зазначенням дисперсії), зниження цього рівня було б менш очевидним. Аналогічно, автор стверджує, що експресія гена *GPXI* була зниженою у 75% зразків (9 із 12), а незначне підвищення його експресії спостерігалось у 25% зразків (3 з 12). Але ж при цьому *незначне* зниження (не більше ніж приблизно у 2 рази) експресії спостерігається у 7 зразках з 12 (рис. 3.5).

6. В огляді літератури перелічені гени, що "задіяні в канцерогенезі": онкогени, гени-супресори, гени-мутатори і гени-блокатори апоптозу. Чи можна назвати всі ці гени онкоасоційованими? Якщо так, то до якої категорії можна віднести ген *PPM1M*, який визначено як "онкоасоційований" у висновку 2? Власне кажучи, сумнівно, що його можна віднести до якоїсь з названих категорій на підставі того, що для нього "спостерігалася як підвищена (50% зразків), так і знижена (33% зразків) експресія при СККН порівняно з умовно-нормальною тканиною".

7. У тексті дисертації відчувається тенденція пов'язати зниження експресії досліджених генів із зміною кількості їхніх копій. Але, як можна зрозуміти з тексту, для досліджень рівнів експресії та кількості копій одного й того ж гена використовувались *різні* зразки (ця обставина не зазначена чітко у Матеріалах і методах). У дисертації, дійсно, для кількох генів продемонстровано, що в пухлинних зразках (у більшості, але не в усіх) спостерігаються делеції, тоді як в інших зразках (у більшості, не в усіх) – зниження рівня експресії. Але немає жодних підстав, на основі отриманих даних, безпосередньо і однозначно пов'язувати одне з одним. Тим більше, що встановлені тенденції не завжди співвідносяться кількісно: наприклад, для гена *PRICKLE2* показано зниження експресії у 83% зразків, а делеції – у 44,4% зразків. Порівняння цих цифр

підтверджує, що однозначного зв'язку між рівнем експресії гена і кількістю його копій (хоча іноді такий зв'язок і може мати місце) у даному випадку немає. Тобто, делеції, звісно, автоматично повинні призводити до зниження рівня експресії гена, але водночас зрозуміло, що експресія може знижуватись і з багатьох інших причин. Отже, висновок, сформульований наприкінці підрозділу 3.2.5: "Ми вважаємо, що делеції цього гена є додатковим механізмом, який паралельно з регуляцією на рівні РНК та білка можуть впливати на рівень експресії *GPX1* в СККН" виглядає тривіальним. Делеції дійсно можуть бути "додатковим механізмом" зниження експресії генів, але таке твердження нічого по суті не прояснює.

8. На рисунках підрозділу 3.3 представлено результати біоінформатичного аналізу даних інших дослідників щодо кількості копій і рівнів експресії у зразках СККН генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* та *GPX1-4,6*. Залишається незрозумілим, чому кількість копій того чи іншого гена називається у назві підрозділу 3.3 і на рисунках при позначенні абсциси "гіпотетичною" при тому, що в підписах чітко вказано, що представлено рівень експресії у залежності від числа копій гена. Крім того, автор робить висновок, що результати, отримані у дисертації, добре узгоджуються з представленими у базах даних. Це дійсно так. Але тут виникає питання: навіщо взагалі було досліджувати кількість копій і рівні експресії вказаних генів у зразках СККН, якщо з цього приводу вже існує величезний масив даних? Принаймні, сумнівним виглядає твердження у вступі про те, що в дисертаційній роботі "вперше досліджено рівень експресії родини селеновмісних глутатіонпероксидаз (*GPX 1-4,6*) в карциномах нирок".

Незважаючи на наведені зауваження, загальна оцінка роботи є позитивною: в цілому, дисертація демонструє належний рівень кваліфікації автора – володіння сучасними методами, здатності аналізувати свої результати та узагальнювати їх.

Оцінюючи роботу в цілому, можна констатувати, що дисертація Є. Є. Руденко є завершеним дослідженням в актуальній області молекулярної генетики та містить ряд важливих наукових і практичних результатів.

Враховуючи актуальність та обсяг проведених досліджень, наукову новизну одержаних результатів, обґрунтованість висновків, перспективи наукового та практичного застосування, вважаю, що дисертаційна робота Руденко Євгенії Євгенівни "Пошук потенційних генів-супресорів пухлинного росту для світлоклітинної карциноми нирки людини" **повністю відповідає вимогам** постанови КМ України від 24 липня 2013 року №567 "Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника", а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук, професор,
професор кафедри загальної та молекулярної генетики
ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського
національного університету імені Тараса Шевченка



А. В. Сиволоб

Підпис проф. А. В. Сиволоба засвідчую

Заст. директора ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського
національного університету імені Тараса Шевченка

