

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Розенберг Євгенії Едуардівни

на тему: “Диференційно експресовані гени та генетичні й епігенетичні зміни у пухлинах простати людини” на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

зі спеціальності 03.00.03 – молекулярна біологія

Актуальність теми.

За даними світової статистики рак передміхурової залози (РПЗ) займає перші позиції в структурі захворюваності серед чоловіків і продовжує зростати в економічно розвинутих країнах. Згідно даних національного канцер-реєстру України протягом останніх 5 років показник щорічно діагностованих випадків РПЗ зріс на 1,6% і склав у 2010 та 2015 роках, відповідно 4185 та 6898 випадків.

Загальною особливістю онкоепідеміологічних досліджень є збільшення частки хворих на РПЗ середнього віку, що безумовно відбивається на демографічній ситуації. Наведене переконливо свідчить, що РПЗ є як медичною, так і соціальною проблемою, актуальність і важливість якої аргументує необхідність своєчасної діагностики передпухлинних та пухлинних процесів передміхурової залози. Один із шляхів реалізації цієї задачі полягає у пошуку найбільш інформативних показників, що об'єктивно визначають характер патологічного процесу в передміхуровій залозі, і які повинні ґрунтуватись на нових молекулярних маркерах, що відображають ключові особливості новоутворення: проліферацію, диференціювання та набуття клітинного метастатичного фенотипу.

Складність вирішення цих питань пов'язана з біологічною гетерогенністю РПЗ, що обумовлює необхідність системного підходу при дослідженні цієї форми раку з урахуванням молекулярної природи процесів малігнізації та прогресії пухлини.

Наведене ще раз свідчить про актуальність рецензованої роботи, мета якої полягала у ідентифікації генів, що беруть участь у виникненні та прогресуванні РПЗ.

Дисертація побудована за традиційним монографічним планом, викладена на 217 сторінках комп'ютерного набору, її структура складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу “Матеріали і методи досліджень”, експериментальної частини, що містить 5 підрозділів та узагальнення результатів дослідження, 7 висновків, списку з 404 використаних джерел літератури, з яких 3 слов'янською і 401 – англійською мовами, чотирьох додатків. У роботі є 19 рисунків, 17 таблиць.

Анотація оформлена українською та англійською мовами згідно останніх вимог містить перелік друківаних наукових робіт за авторством здобувача.

“**Вступ**” має усі відповідні підрубрики згідно вимог ДАК МОН України, що є достатньо інформативними і заповненими у чинному порядку. Автор аргументує необхідність проведення даної роботи наводить її мету і завдання, використаний клінічний матеріал і методи дослідження, змістовно викладаючи особливі застосовані методики.

У першому розділі “Генетичні та епігенетичні зміни у клітинних лініях та пухлинах передміхурової залози” (огляд літератури) автором висвітлені питання сучасної морфологічної класифікації доброякісних та злоякісних пухлин передміхурової залози, детально проаналізовані генетичні та епігенетичні зміни РПЗ, значна увага приділена ролі генів 3-ї хромосоми в онкогенезі пухлин різних нозологічних форм, в т. ч. РПЗ. Дисертантом критично проаналізовані підходи до ідентифікації на основі експресії пухлино-асоційованих генів найбільш значимих маркерів злоякісної трансформації епітеліальних клітин, переконливо аргументована необхідність використання клітинних ліній для скринінгу біомолекулярних маркерів.

У другому розділі “Матеріали і методи” викладена характеристика клітинних ліній, загальна інформація щодо використаного матеріалу хворих, зокрема клініко-патологічні показники, TNM класифікація, стадія захворювання, рівень суми балів за Глісоном, рівень ПСА. Крім того, детально описані використані молекулярно-біологічні методи дослідження, серед яких кількісна та мультиплексна ПЛР, трансфекція, імуноцитохімія, NotI – мікрочіпування та ряд інших. Розділ закінчується переліком широкого спектру методів статистичної обробки даних.

У розділі 3 підрозділ 3.1 “Визначення диференційно експресованих генів у клітинних лініях передміхурової залози з різною чутливістю до андрогенів” розглянуто наступні питання: скринінг бази даних NCBI Geo Datasets для визначення генів, що змінюються у пухлинах передміхурової залози, представлено аналіз експресії 65 генів, що є складовими спектру сигнальних шляхів Wnt, NF- κ B, p53, ангіогенезу, метастазування та інших, які відзначають ключові характеристики пухлин – проліферацію, диференціювання та інвазивний потенціал.

Дисертантом визначено 14 вибірково експресованих генів між андроген-чутливою клітинною лінією LNCaP та андроген-нечутливими лініями DU145 та PC3 порівняно з лінією нормального епітелію PNT2. Ці гени визначають адгезивні, інвазивні та метастатичні властивості клітин (*TAGLN*, *EFNA5*, *GLCE*, *SERPINE2b*), контролюють ангіогенез (*IL8*, *MME*, *CXCL1*, *CXCL2*) та клітинний цикл (*P16*, *CCNE1*).

У підрозділі 3.2 “Зміни експресії генів в андроген-нечутливій клітинній лінії PC3” автором проведено зіставлення відносної експресії у клітинах з низьким (LNCaP) та високим потенціалом до метастазування. Було оцінено експресію 84 генів (використано мікрочип Cancer Path Finder RT2 Profiler PCR array), серед яких в клітинній лінії PC3 11 генів експресувались на більш високому рівні, а 26 на низькому порівняно з клітинною лінією LNCaP. Підсумовуючи отримані результати дисертант підкреслює зміну експресії 14 генів, що асоціюються з інвазивністю та метастазуванням

пухлин передміхурової залози (*BCL2*, *BCL2L1*, *PIK3R1*, *FOS*, *ITGA3*, *EPDR1*, *TGFB1*, *VEGFA*, *MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINE1*).

Важливим у підрозділах 3.1 та 3.2 є зіставлення детектованих змін експресії генів з наявністю секретованого протеїну згідно результатів наведених у базах даних COMPARTMENTS та NCBI Gene, оскільки це відкриває перспективу щодо визначення як діагностичних, так і прогностичних сурогатних маркерів.

У підрозділі 3.3 “Визначення впливу ектопічної експресії гена *GLCE* на експресію генів у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози із різною чутливістю до андрогенів” представлені результати експресії ряду генів у клітинних лініях LNCaP та PC3 трансфікованих плазмідним вектором, що містить послідовність гена *GLCE*. Показано, вплив гена *GLCE* на експресію генів сигнальних шляхів ангіогенезу та метастазування.

Підрозділ 3.4 “Визначення рівнів відносної експресії генів *EFNA5*, *TAGLN*, *FOS*, *PLAU*, *EPDR1*, *TGFB1*, *IL1B* у клінічних зразках аденокарцином передміхурової залози”. У цьому підрозділі автором детально проаналізовані зміни експресії семи генів у клітинах хворих на доброякісну гіперплазію передміхурової залози (ДГПЗ) та РПЗ. Встановлено вірогідне підвищення експресії генів *EFNA5*, *FOS* та *IL1B* у клітинах аденокарциноми передміхурової залози порівняно з таким при ДГПЗ. Визначена асоціація експресії цих генів зі ступенем диференціювання пухлин згідно шкали Глісона. Поряд з цим при ДГПЗ зменшується експресія *TGFB1* порівняно з контролем.

Підрозділ 3.5 “Генетичні та епігенетичні зміни генів 3-ї хромосоми у пухлинах передміхурової залози” присвячений дослідженню причинно-наслідкового зв'язку змін 3-ї хромосоми у маніфестації пухлинного процесу у передміхуровій залозі. Автором визначено дев'ять генів (*LOC440944/SETD5*, *OSBPL10/ZNF860*, *CLCN2*, *PRSS42/MYL3*, *VHL*, *BBX*, *LMCD1*, *CMTM6*, *FAM19A4*) із статистично значущою різницею між

частотами метилювання/делецій в аденокарциномах передміхурової залози з високим ризиком прогресування (сума за шкалою Глісона більше 7) порівняно з аденокарциномами з сумою за шкалою Глісона, яка була менше чи дорівнювала семи, і ДГПЗ. Окремо визначено різниця у метилюванні генів *CAND2*, *GATA2*, *FAM19A4*, *KY*, *ALDH1L1*, *MAP4* при ДГПЗ та РПЗ (сума за шкалою Глісона менше 7).

У синтетичному розділі 4 “Аналіз та узагальнення результатів дослідження” підсумовано результати проведених досліджень, здійснено детальний аналіз отриманих результатів і зіставлення їх із даними інших авторів.

Висновки у кількості семи відображають ідеї та сутність дисертаційної роботи, відповідають задачам і розкривають їх зміст.

Завершують дисертаційну роботу список використаних джерел та 4 додатки.

В основу дисертаційної роботи покладені результати молекулярно-генетичного дослідження експресії 143 генів у модельних клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози та клітинах хворих на ДГПЗ і РПЗ. Використано 3 клітинні лінії раку передміхурової залози (LNCaP, DU145 і PC3) і клітинну лінію нормального епітелію передміхурової залози та 86 зразків пухлин хворих на ДГПЗ і РПЗ.

Логічно вибудований дизайн досліджень полягає у визначенні експресії низки генів як з онкогенними, так і супресорними функціями у культурах клітин передміхурової залози різного ступеня злоякісності. Такий підхід дозволив автору визначити панель генів асоційованих з прогресуванням пухлинного процесу у передміхуровій залозі. Чимало уваги у роботі приділено дослідженню генетичних/епігенетичних змін і експресії генів у хворих на доброякісні та злоякісні пухлини передміхурової залози.

Застосування високотехнологічної методології сприяло розширенню уявлень щодо механізмів розвитку та прогресії РПЗ. Поряд з цим коректно проведена статистична обробка результатів дослідження, використання

спектру тестів і баз даних створили обґрунтоване підґрунтя для ідентифікації генів, що мають перспективу використання в диференційній діагностиці та визначенні прогнозу перебігу РПЗ. Комплексний підхід до проблеми розвитку та прогресії РПЗ і систематизація одержаних результатів дозволили дисертанту отримати нові наукові факти, які характеризуються науковою новизною і мають практичне значення.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у тому, що в модельних клітинних лініях передміхурової залози LNCaP, DU145, PC3 автором виявлено 14 генів, експресія яких асоціюється з чутливістю до андрогенів та визначено зв'язок експресії 36 генів з високим потенціалом до інвазивності і метастазування. Доведено модулюючий вплив експресії гена *GLCE* на експресію генів ангіогенезу і метастазування у клітинних лініях передміхурової залози. Крім того у вибірці зразків ДГПЗ, аденокарцином та умовно-нормальних тканин (УНТ) передміхурової залози українських пацієнтів визначено експресії на рівні мРНК генів *EFNA5*, *TAGLN*, *EPDR1*, *FOS*, *PLAU*, *TGFB1*, *IL1B* та виявлено делеції/метилування 50 генів/локусів третьої хромосоми у пухлинах передміхурової залози.

Наведене дозволяє подивитись на проблему діагностики та прогнозу перебігу РПЗ у новому ракурсі, який дає можливість нового бачення її вирішення шляхом використання визначених біомолекулярних маркерів при верифікації характеру патологічного процесу в передміхуровій залозі та оцінки прогнозу захворювання.

Практичне значення отриманих результатів свідчить про перспективність технології NotI-мікрочипів для скринінгу геному з метою пошуку потенційних пухлино-асоційованих генів для ранньої діагностики аденокарцином передміхурової залози. В даній роботі було виявлено низку генів, асоційованих з ДГПЗ та аденокарциномами передміхурової залози. Ці диференційно експресовані гени можуть бути використані для створення наборів маркерів для виявлення та розрізнення доброякісних та злоякісних пухлин передміхурової залози.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках наукових проектів відділу молекулярної онкогенетики Інституту Молекулярної біології і генетики НАН України “Вивчення генетичних та епігенетичних змін в злоякісних пухлинах епітеліального походження” (державний реєстраційний номер № 0110U000691, 2011-2015), “Ідентифікація нових біомаркерів для діагностики злоякісних новоутворень та розробка підходів до генотерапії пухлин у модульних системах” (державний реєстраційний номер № 0115U003742, 2016-2020), цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України “Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій”, проекту “Ідентифікація молекулярно-генетичних маркерів для діагностики злоякісних новоутворень епітеліального походження” (державний реєстраційний номер №0110U000691, 2009-2014 та № 41/14б 2015), цільового тематичного конкурсу Ф46 ДФФД науково-навчального центру “Державна ключова лабораторія молекулярної та клітинної біології” – “Макромолекули та їх комплекси в реалізації генетичної інформації” (№ F46.1/011, 2011-2012) та за підтримки гранту Державного агенства з питань науки, інновацій та інформатизації № 0111U005988.

Основні положення дисертації викладено у 12 наукових працях: 5 статей у профільних виданнях, затверджених ДАК України і які входять до міжнародних наукометричних баз, 7 тез доповідей у збірках українських та міжнародних науково-практичних конференцій.

Автореферат дисертації повністю відповідає її змісту, адекватно відображає зміст усіх розділів дисертації, висновки та практичні рекомендації.

Загалом результати дисертаційного дослідження Розенберг Є.Є. характеризується актуальністю і мають вагоме значення для молекулярної біології та експериментальної онкології, а саме для розкриття молекулярно-генетичних механізмів злоякісної трансформації епітеліальних клітин передміхурової залози та прогресування пухлинного процесу.

Робота вирішує на сучасному етапі розвитку молекулярної біології теоретично та практично проблему ідентифікації маркерів для своєчасної діагностики новоутворень передміхурової залози та визначення прогнозу захворювання. Одержані результати безумовно є суттєво новими, достовірними, свідчать про ефективність та безпечність авторських упрощень.

Позитивно оцінюючи дисертаційну роботу в цілому, хочу зробити зауваження і задати питання.

Зауваження:

1. **Розділ “Огляд літератури”**, в якому наведені характеристики клітинних ліній використаних у дослідженні слід було представити у розділі “Матеріали і методи дослідження”.
2. У підрозділі **3.4. “Результати власних досліджень”** не зрозуміла табл.3.6, в якій треба було навести результати експресії генів у групах ДГПЗ, РПЗ і УНТ (згідно назви таблиці). Але представлені результати лише у групі ДГПЗ?
3. У підрозділі **3.5.** у табл.3.8 наведені результати частоти метилювання/делеції у двох групах аденокарцином передміхурової залози з сумою балів за Глісоном більше та менше семи. Проте у останню групу були включені хворі на ДГПЗ, що є не коректним.
4. У роботі містяться окремі стилістичні, граматичні та орфографічні помилки. Іноді автор використовує надуже вдалі терміни. Наприклад “здорова клітина”, “надмірне лікування”, “тип РПЗ”.

Запитання:

1. Чи сприяли експериментальні дослідження проведені на модельних клітинних лініях аденокарциноми передміхурової залози виділенню найбільш значимих генів, що можуть бути використані для уточнюючої діагностики і визначення прогнозу перебігу захворювання у хворих на РПЗ?

2. Що слугувало аргументацією для дослідження саме семи генів у клінічних зразках ДППЗ та РПЗ?
3. При розподілі пухлин на дві групи дисертант враховує суму балів за шкалою Глісона “менше/дорівнює семи та більше семи”. На основі чого було визначено такий критичний рівень – сім балів?
4. У науковій новизні автор робить акцент на виявлених змінах саме в українській популяції. Вірогідно в інших популяціях зміни інші?

Висунуті зауваження і питання не мають принципового значення і не зменшують загальної позитивної оцінки проведеного дослідження.

ЗАКЛЮЧЕННЯ:

Мета дослідження досягнута, його задачі у належний спосіб повністю виконані. За актуальністю, обсягом експериментального та клінічного матеріалу, застосованими сучасними методами дослідження, отриманими важливими результатами, науково-теоретичною новизною, практичною значимістю, самостійністю, завершеністю і оригінальністю дисертаційна робота Розенберг Євгенії Едуардівни “Диференційно експресовані гени та генетичні й епігенетичні зміни у пухлинах простати людини” – дає змогу зробити висновок, що робота відповідає вимогам п.13 “Порядку присудження наукових ступенів і вченого звання старшого наукового співробітника”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. №567 щодо дисертацій, поданих на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – “молекулярна біологія”, а автор заслуговує на присвоєння наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Завідувачка лабораторії генетики раку,
заступник директора з наукової роботи
Інституту експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України,
доктор біологічних наук



Л.Г. Бучинська

Л.Г. Бучинська

Підпис *Л.Г. Бучинської*
АСВІДЧУЮ
Учений секретар
Ін-ту *Л.Г. Бучинська*