

## ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

про дисертаційну роботу Геращенко Ганни Володимирівни  
за темою «ГЕНЕТИЧНІ, ЕПІГЕНЕТИЧНІ ТА ЕКСПРЕСІЙНІ ПОРУШЕННЯ  
У НИЗЦІ ЕПІТЕЛІЙНИХ ПУХЛИН»  
на здобуття ступеня доктора біологічних наук

за спеціальністю  
03.00.03 «Молекулярна біологія»,  
03.00.22 «Молекулярна генетика»  
091 - Біологія

### Актуальність теми дисертації.

Рак як причина смертності поступається лише серцево-судинним захворюванням. Кожен четвертий житель планети хворіє на рак, а кожен п'ятий вмирає від онкологічної патології. За прогнозами Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) захворюваність і смертність від онкологічних захворювань в усьому світі зросте в 2 рази за період з 1999 року по 2020 рік: з 10 до 20 млн. нових випадків і з 6 до 12 млн. реєстрованих смертей. Зважаючи на важкі соціальні наслідки зростання захворюваності населення на онкологічні захворювання, дослідження молекулярних механізмів їх розвитку є основою для розробки нових підходів до терапії, що є надзвичайно важливим.

Фундаментальні дослідження клітинних і молекулярних механізмів онкогенезу виявили ряд структурних генетичних і епігенетичних змін, які супроводжують процес утворення пухлин. Епігенетичні зміни у даній ділянці також відіграють важливу роль у канцерогенезі, коли відбувається одночасне метилування CpG-острівців промоторів тих генів (наприклад, *VHL*, *hMLH1*), які майже неметильовані в нормальних тканинах.

Саме тому, вкрай актуальним є пошук та ідентифікація порушень регулювання експресії генів у пухлинах епітелійного походження на різних

молекулярних рівнях, а саме генетичному, епігенетичному та експресійному, чому і присвячене виконане дисертантом дослідження.

**Загальна характеристика роботи.** Дисертація побудована за традиційною схемою та складається із наступних розділів: вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 7-и розділів результатів власних досліджень, розділу аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел, який налічує 951 посилання та 25 додатків. Роботу ілюстровано 78 рисунками та 79 таблицями.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд представляє собою ретельно підготовлений, аналітичний труд, який демонструє належний рівень теоретичної підготовки автора і відображає сучасні уявлення про молекулярні особливості канцерогенезу та підходи до діагностики й лікування онкологічних захворювань. Онкогенні властивості пухлинних клітин, основні теорії та гіпотези канцерогенезу, найпоширеніші генетичні та епігенетичні аберації при канцерогенезі низки епітелійних пухлин – це неповний перелік базових теоретичних понять і механізмів, які лягли в основу обґрунтування необхідності проведеного дослідження та дозволили проаналізувати і осмислити отримані дисертантом результати. Крім того, автором висвітлено сучасні досягнення в галузі широкомасштабного пошуку молекулярних порушень у пухлинах завдяки методам мікрочипів, секвенування нового покоління, мас-спектрометрії нового покоління. Проаналізовано підходи до виявлення біомаркерів для діагностики та мішеней для таргетної терапії епітелійних пухлин.

У Розділі 2 «Матеріали і методи» дисертант наводить вичерпний опис усіх методів, застосованих при проведенні дослідження. Для проведення дослідження автором використано широкий спектр класичних та сучасних методів: скринінг генетичних та/або епігенетичних змін з використанням NotI-мікропанелей, ПЛР та кількісна ПЛР у реальному часі, метил-специфічна ПЛР, секвенування та бісульфітне секвенування, визначення втрати гетерозиготності, нозерн-блот гібридизація, клітинні моделі *in vitro*,

трансфекція культур клітин, тести на ріст пухлин *in vivo* на мишах, флуоресцентна мікроскопія, гістологічні, імуногістохімічні, біоінформативні та статистичні методи. Вибір застосованих автором методів дослідження є повністю обґрунтованим і дозволяє з високою довірою сприймати отримані результати і їх аналіз.

У розділі власних досліджень автором отримано та проаналізовано дані NotI-мікропанелей для 180 клонів 3-ої хромосоми людини в геномній ДНК епітелійних пухлин, зокрема, яєчника, кишечника, передміхурової та молочної залози, в результаті чого виявлено 74 гени та/або локуси зі значущими генетичними та/або епігенетичними порушеннями. Показано, що найбільшу кількість індивідуальних генетичних та/або епігенетичних порушень виявлено для пухлин передміхурової залози, що свідчить про особливості канцерогенезу, відмінні від інших типів епітелійних пухлин. Ідентифіковано десятки генів та/або локусів, що мають генетичні та/або епігенетичні порушення у зразках пухлин, які свідчать про інактивацию низки генів-супресорів росту пухлин та потенційних генів-супресорів пухлин на 3p- та 3q-плечі 3-ої хромосоми людини в епітелійних пухлинах. За допомогою інших методів проведено підтвердження отриманих результатів.

Наступна частина роботи присвячена виявленню диференційно-експресованих генів у пухлинах передміхурової залози як на модельних клітинних лініях з різним потенціалом агресивності та метастазування, так і на зразках пухлин. А також встановленню особливостей пухлино-стромальної взаємодії на рівні експресії маркерів пухлинних клітин та елементів строми раку передміхурової залози, який є одним з найбільш гетерогенних.

Порівняльним аналізом відносної експресії 65 генів на модельних клітинних лініях раку передміхурової залози LNCaP, DU145, PC3 та умовно-нормальної клітинної лінії PNT2 виявлено 35 диференційно-експресованих генів, які кодують білки, що належать до сигнальних шляхів p53, NF- $\kappa$ B, Wnt, адгезії клітин, інвазивності та метастазування. Вивчення відносних рівнів

експресії 84 генів у клітинних лініях LNCaP та PC3 дозволило виявити 36 диференційно-експресованих генів, асоційованих з процесами апоптозу, адгезії, інвазивності та метастазування. Відібрані за результатами дослідів на клітинних лініях 7 пухлино-асоційованих генів: *TAGLN*, *EFNA5*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFBI*, *EPDR1* та *FOS*, показали значущі відмінності рівнів відносної експресії у групах аденокарцином на різних стадіях і з різною сумою за шкалою Глісона у порівнянні з умовно-нормальними тканинами та аденомами передміхурової залози.

Автором проведено розрахунки та експерименти для вивчення впливу різниці між рівнями експресії досліджуваних генів та референсних на статистичні показники відносної експресії генів. Важливими параметрами для вибору порогу відмінностей рівнів експресії між групами з метою правильної інтерпретації даних були рівні експресії досліджуваних генів, різниця значень експресії між досліджуваними групами, розмір вибірки та наявність високої гетерогенності даних експресії у групі.

На групі хворих з української популяції автором було виявлено гібридний транскрипт *TMPRSS2-ERG* (EF194202.1) у аденокарциномах передміхурової залози з частотою 56,8%, в умовно-нормальних тканинах з частотою 43,2% та аденомах - 20%. Аналіз частот експресії транскрипта у пухлинах з різними стадіями дав підставу стверджувати про його появу на ранніх етапах канцерогенезу передміхурової залози.

Виявлення та аналіз рівнів відносної експресії важливих у канцерогенезі передміхурової залози генів ліпідного обміну, які охоплюють різні ланки цього процесу, показав, що чотири гени з п'яти мають значні зміни відносної експресії у аденокарциномах з різними стадіями та сумою за шкалою Глісона у порівнянні з аденомами й умовно-нормальними тканинами, що свідчить про значні порушення обміну ліпідів при прогресії раку передміхурової залози, що стосуються як клітин пухлин, так і стромальних елементів.

Встановлення рівнів відносної експресії 23 генів, пов'язаних з елементами стромы пухлин (фібробластами та макрофагами) та імуноасоційованих генів у аденокарциномах в порівнянні з аденомами передміхурової залози показало наявність 11 диференційно-експресованих генів, з яких 7 генів мають підвищену експресію у злоякісних пухлинах, а чотири – знижену, що свідчить про важливу роль стромальних елементів у канцерогенезі передміхурової залози.

Базуючись на результатах визначення відносної експресії 59 транскриптів генів-маркерів пухлинних клітин, стромы та імунної системи автором було виявлено специфічні профілі експресії 37 генів у аденокарциномах передміхурової залози, що стало підґрунтям для молекулярного профілювання раку передміхурової залози і основою для розробки наборів маркерів для диференційованої діагностики пухлин яєчника, виявлення пухлин передміхурової залози, диференціації аденом та неагресивних пухлин, агресивних раків та неагресивних пухлин і аденом.

У Розділі «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» отримані автором експериментальні дані ретельно і фахово проаналізовані в контексті результатів, опублікованих іншими дослідниками. На підставі цього аналізу автором було запропоновано алгоритм для представлення даних відносної експресії генів з метою підбору панелей біомаркерів за методом машинного навчання з використанням MDR аналізу. Крім того, на основі сучасних парадигм, отриманих власних результатів та даних літератури здобувачем було запропоновано узагальнюючу (інтегративну) концепцію канцерогенезу, яка базувалась на існуванні низки ендогенних та екзогенних чинників, які з плином часу, тобто віку можуть вплинути як індуктори канцерогенезу, спричиняючи ініціацію онкологічних захворювань, які мають як загальнопухлинні, так і пухлино-специфічні порушення: генетичні та/або епігенетичні, експресійні порушення. Ці зміни призводять до гетерогенності молекулярних характеристик пухлин і формування певних молекулярних підтипів за

характеристиками та особливостями профілів експресії генів пухлинних клітин.

Висновки, зроблені здобувачем на підставі проведеного аналізу і узагальнення отриманих експериментальних даних, повністю відповідають поставленим завданням.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботу виконано в рамках бюджетних наукових проектів відділу молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України «Ідентифікація генів-супресорів, картованих на 3-й хромосомі для створення маркерів – ключових для певних видів злоякісних пухлин епітелійного походження» (2007-2011 р., державний реєстраційний номер 0107U000337), «Вивчення генетичних та епігенетичних змін в злоякісних пухлинах епітелійного походження» (2011-2015 р., державний реєстраційний номер 0110U000691), «Ідентифікація нових біомаркерів для діагностики злоякісних новоутворень та розробка підходів до генотерапії пухлин у модельних системах» (2016-2020 р., державний реєстраційний номер 0115U003742), та «Дослідження властивостей молекулярно-генетичних маркерів як основи для діагностики онкологічних патологій» (2007-2009 р., державний реєстраційний номер 0107U0004941), цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій». Проект «Ідентифікація молекулярно-генетичних маркерів для діагностики злоякісних новоутворень епітелійного походження» (2010-2014 р., державний реєстраційний номер 0110U004744, та 2015 р. № 41/146), цільового тематичного конкурсу Ф46 ДФФД науково-навчального центру «Державна ключова лабораторія молекулярної та клітинної біології» - «Макромолекули та їх комплекси в реалізації генетичної інформації» (2011-2012 р., державний реєстраційний номер №F46.1/011) та за підтримки гранту Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації (державний реєстраційний номер 0111U005988). Програма «Нанотехнології та наноматеріали» Проект «Функціональні біонаноматеріали для медичної

діагностики онкологічних захворювань» (2010-2014 р., державний реєстраційний номер 0110U004646). Державна цільова науково-технічна програма розроблення новітніх технологій створення вітчизняних лікарських засобів для забезпечення охорони здоров'я людини та задоволення потреб ветеринарної медицини «Створення та введення в експлуатацію лабораторного модуля для дизайну та застосування мікрочипів» (2012 р., державний реєстраційний номер 0112U007434). Програма «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» «Гени-супресори пухлинного росту та пухлино-асоційовані гени - як потенційні маркери для діагностики та терапії злоякісних новоутворень» (2015-2019 р., державний реєстраційний номер 0115U002950).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Дисертантом вперше здійснено дослідження генетичних та/або епігенетичних змін десятків генів та/або локусів 3-ої хромосоми людини у епітелійних пухлинах яєчника, кишечника, передміхурової та молочної залоз за допомогою технології широкомасштабного скринінгу NotI-мікрочипів. Для підтвердження виявлених генетичних порушень були використані інші незалежні методи - делеції (втрата гетерозиготності, аналіз копій генів), епігенетичні порушення – метилювання промоторів (метил-специфічна ПЛР, бісульфітне секвенування), зміна експресії генів на рівні мРНК (нозерн-блот гібридизація, ПЛР у реальному часі). Проведено порівняльний аналіз змін пухлино-асоційованих генів та потенційних генів супресорів росту пухлин в зразках епітелійних пухлин та проведено підбір панелей потенційних біомаркерів для діагностики епітелійних новоутворень, зокрема раку яєчника та передміхурової залози. У дослідах *in vitro* та *in vivo* вперше доведена пухлино-супресивна роль гена *SEMA3B* у канцерогенезі на прикладі пухлин легені.

Здійснене автором вивчення змін експресії генів (біля 200 генів) як на клітинних лініях раку передміхурової залози, так і на зразках хірургічно видалених пухлин вперше дозволило виявити диференційно-експресовані гени

у клітинних лініях з різним потенціалом агресивності та метастазування, серед яких гени *TAGLN*, *EFNA5*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFB1*, *EPDR1* та *FOS* й певні особливості пухлино-стромальних характеристик пухлин передміхурової залози, який є одним з найбільш гетерогенних видів злоякісних новоутворень. Отримані дані продемонстрували біологічно-детермінований характер змін експресії, що проявляється у високому рівні дисперсії цього показника у пухлинах. Це дозволило вперше виявити молекулярні характеристики зразків пухлин та профілі експресії як простато-специфічних генів, серед яких *AR*, *CDH1*, *KRT18*, *ESR1*, *GCR*, *PRLR*, *VDR*, *SRD5A2*, так і генів-маркерів стромальних елементів раку передміхурової залози, зокрема *ACTA2*, *CXCL14*, *CTGF*, *THY1*, *FAP*, *CCL17*, *CCL22*, *CCR4*, *CD68*, *CD163*, *NOS2A*, *CTLA4*, *IL1R1*. Вперше встановлено молекулярні підтипи раку передміхурової залози, що мають різні активовані онкогенні шляхи та інактивовані гени-супресори. Модифіковано алгоритм для розробки експресійних наборів онкомаркерів на базі MDR-аналізу та проаналізовано потенційні діапазони чутливості до таргетної терапії генів-мішеней пухлин передміхурової залози (*AR*, *FASN*, *LDLR*, *HMGCR*, *COX2*, *PTEN*, і *CTLA4*) на основі змін відносної експресії генів.

**Теоретичне значення одержаних результатів.** Отримані дисертантом результати стали підґрунтям нового концептуального погляду на канцерогенез та роль пухлино-специфічних порушень: генетичних та/або епігенетичних, експресійних порушень у формуванні певних молекулярних підтипів за характеристиками та особливостями профілів експресії генів пухлинних клітин.

**Практичне значення одержаних результатів.** Виявлення генетичних та епігенетичних порушень низки генів та/або локусів 3-ої хромосоми людини у епітелійних пухлинах за допомогою NotI-мікропанелей стало основою для ідентифікації нових потенційних біомаркерів та розробки панелей для діагностики та розрізнення пухлин яєчника та передміхурової залози. Встановлення епігенетичного характеру порушень для низки генів відкриває



можливість розробки наборів біомаркерів у біологічних рідинах для ранньої діагностики онкологічних захворювань.

Пухлино-специфічні особливості експресії генів, показані автором, створили можливість детекції специфічних клінічно-значущих молекулярних підтипів та потенційних діапазонів чутливості до таргетної терапії, які можуть бути важливими при діагностиці, прогнозуванні та підборі лікування хворих, що можливо впровадити у клінічну практику. Модифікація та оптимізація підходів для розробки експресійних панелей біомаркерів на основі методів машинного навчання сприяє створенню нових діагностикумів з високими статистичними показниками для діагностики пухлин та встановлення їх агресивності.

**Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій сформульованих у дисертації.** Для вирішення поставлених завдань автор використовує оптимальний та достатній набір методів (молекулярно-біологічні, молекулярно-генетичні, гістологічні, імуногістохімічні та біоінформативні). В залежності від даних, отриманих у експерименті, автор використовує релевантні статистичні методи для їхнього аналізу, що не залишає сумнів у їхній достовірності. Усі висновки обґрунтовані та зроблені виключно на отриманих експериментальних даних.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті.** За матеріалами дисертації опубліковано 28 статей у фахових вітчизняних та міжнародних виданнях та 11 тез доповідей на наукових конференціях.

Автореферат адекватно і повною мірою передає зміст дисертаційної роботи.

Високо позитивно оцінюючи дану дисертаційну роботу слід зазначити деякі зауваження та побажання, які не впливають на достовірність положень та висновків, сформульованих у даній роботі:

1. зустрічаються помилки друку та не зовсім коректні вирази, часто пов'язані із застосуванням певного наукового «сленгу» (напр. «3q плеча хромосоми 3»);
2. не зовсім коректно використовуються скорочення, особливо у назвах таблиць або рисунків (напр. Табл. 3.22. «Дані описової статистики ВЕ у групах П, Н та А ПЗ»).

Однак, технічні помилки та невдалі вирази не зменшують наукової цінності та актуальності роботи.

Крім того, для уточнення деяких положень, висунутих автором, хотілось би знати думку автора щодо наступного:

1. Яку саме роль грають пухлино-асоційовані фібробласти (або елементи стромы взагалі) у прогресуванні та метастазування пухлин?
2. Які функції досліджуваних вами некодувальних РНК ви вважаєте найбільш вагомими у прогресії раку передміхурової залози?
3. Яким чином можна у подальшому впровадити у клінічну медицину результати ваших досліджень стосовно епігенетичних порушень генів у пухлинах?

**Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до докторських дисертацій.** Дисертаційна робота Геращенко Ганни Володимирівни за темою «ГЕНЕТИЧНІ, ЕПІГЕНЕТИЧНІ ТА ЕКСПРЕСІЙНІ ПОРУШЕННЯ У НИЗЦІ ЕПІТЕЛІЙНИХ ПУХЛИН» є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів дисертація повністю відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, які пред'являються до докторських дисертацій, а автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук

за спеціальностями 03.00.03 «Молекулярна біологія», 03.00.22 «Молекулярна генетика» та 091 - Біологія.

Офіційний опонент,  
Головний науковий співробітник  
відділу генетичної діагностики  
ДУ «Інститут генетичної та регенеративної  
медицини НАМН України»,  
доктор біологічних наук



Н.В.Ольхович

*Підпис д.б.н. Ольхович Н.В. засвідчує.*

ДУ "ІГРМ НАМН"  
УЧЕНИЙ СЕКРЕТАР  
7 10 2015