

## РЕЦЕНЗІЯ

Доктора біологічних наук, старшого наукового співробітника, провідного наукового співробітника відділу генетики людини ІМБГ НАН України

**ПІВЕНЬ Оксани Олександрівни**

на дисертаційну роботу **ОНИЩЕНКО Катерини Вікторівни**

*«Ідентифікація генетичних та епігенетичних змін при світлоклітинній карциномі нирки людини для розробки підходів неінвазивної діагностики захворювання»* на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія

**Актуальність вибраної теми.** У сучасному світі онкологічні захворювання є суттєвим викликом для медичної та соціальної сфери, становлячи загрозу життю хворих, призводячи до погіршення якості їхнього життя та втрати працездатності. Усе це спонукає до вивчення молекулярних механізмів розвитку злоякісних новоутворень, ідентифікації епігенетичних та генетичних маркерів. Розвиток знань та методологічних підходів нині дає таку змогу. У даному дисертаційному дослідженні авторка зосередилась на вивченні карциноми нирки, а саме на найбільш поширеному та найагресивнішому типі карцином нирки – світлоклітинній карциномі нирки. Саме цей тип онкологічних захворювань посідає третє місце за частотою захворюваності серед урологічних пухлин, після раку простати та раку сечового міхура. Окрім того, світлоклітинна карцинома нирки характеризується негативним прогнозом, що робить своєчасну діагностику та персоналізований підхід у терапії цього захворювання дуже важливим та актуальним завданням. Дослідження молекулярних механізмів, епігенетичних та генетичних змін, притаманних цьому типу канцерогенезу, є важливим підґрунтям для розуміння генетичної еволюції клітини при злоякісній трансформації, а також для ідентифікації нових специфічних онкомаркерів для ранньої діагностики та персоналізації терапії.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційне дослідження Катерини Онищенко виконане в рамках дослідницьких тематик проектів Інституту молекулярної біології та генетики НАН України «Ідентифікація генів-супресорів, картованих на 3-й хромосомі для створення маркерів – ключових для певних видів злоякісних пухлин епітеліального походження» (2007-2011 рр., номер державної реєстрації 0107U000337) та «Втрата гетерозиготності і метилювання генів-імуносупресорів в карциномах нирки і сечового міхура» (2016, 2017 рр.,

номери державної реєстрації 0116U007719 та 0117U002802) відділу функціональної геноміки, «Ідентифікація генетичних та епігенетичних змін на позаклітинній ДНК крові хворих на рак нирок та рак молочної залози, як діагностичних та прогностичних маркерів ранньої неінвазивної діагностики» (2015-2019 рр., номер державної реєстрації 0115U002951) відділу функціональної геноміки та лабораторії біосинтезу нуклеїнових кислот, «Розробка та дослідне впровадження панелі мікроРНК для ранньої неінвазивної діагностики та персоналізованого хірургічного лікування у хворих на локалізовані новоутворення нирки» (2020, номер державної реєстрації 0120U100649) лабораторії біосинтезу нуклеїнових

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій.** Дисертаційне дослідження Катерини ОНИЩЕНКО базується на результатах аналізу значного масиву власних даних, отриманих за допомогою сучасних і класичних методів молекулярної, та коректно опрацьованих дисертанткою. Поставлені завдання відповідають меті дослідження, а висновки, сформульовані дисертанткою, є логічними та обґрунтованими, та охоплюють основні положення і результати висвітлені у експериментальних розділах.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Результати дисертаційного дослідження містять значну наукову новизну, загалом дисертанткою було вперше проведено комплексне порівняльне визначення статусу метилювання генів (*APC*, *RASSF1*, *LRRC3B*, *GPX3*, *PCDH8*, *RUNX3*, *TIMP3*, *VHL*, *CDKN2A*) та рівнів експресії мікроРНК (miR-324-5p, miR-181a-5p, miR-30a/c-5p, miR-138-1 та miR-200a-3p) у пухлинах та плазмі крові хворих. Виявлено та доведено, що рівні концентрації та «індекс цілісності» пкДНК плазми крові можуть слугувати у якості достовірних маркерів новоутворень нирки. Продемонстровано, що метод детекції кількості пкДНК у плазмі крові шляхом кПЛР більш чутливий, ніж метод визначення інтерналізації флуоресцентного барвника. Вперше показане достовірне зниження мікроРНК miR-30a/c-5p, miR-138-1 та miR-200a-3p як у біопсіях пухлин новоутворень нирки, так і у плазмі крові хворих вже на перших стадіях захворювання. Визначено, що CpG-острівці промоторних ділянок *APC*, *RASSF1A*, *GPX3*, *PCDH8*, *RUNX3* гіперметиловані у біопсіях пухлин та плазмі крові пацієнтів на рак нирки. Ідентифіковано втрату гетерозиготності STR-маркерами гена *RASSF1* у 34.7%, *VHL* – у 41.7%, *CDKN2A* – 20,7% інформативних зразків досліджуваної популяції хворих на рак нирки України.

**Теоретичне та практичне значення результатів дисертації.** Виявлені порушення у складі позаклітинних нуклеїнових кислот (пкДНК та пкміРНК) плазми хворих на скРН свідчать про можливість застосування цих генів як компонентів мультимаркерної панелі ранньої діагностики даного типу раку. Визначення концентрації міРНК (miR-30a/c-5p, miR-138-1, miR-200a-3p), пкДНК та статусу метилування промоторних ділянок транскриптів (*RASSF1A*, *GPX3*, *APC* та *CDKN2A(p14ARF)*) може використовуватись в якості маркерів плазми крові для діагностики раку нирки, рецидиву пухлин після оперативного втручання та пошуку нових мішеней таргетної терапії таких хворих. Крім того, кореляція між рівнем міРНК miR-138-1 та прогресією пухлини за Фурман (G2>G3) може бути використана для неінвазивного моніторингу адьювантної терапії хворих.

**Науково-практична цінність роботи та конкретні шляхи використання результатів дослідження.** Результати досліджень використовуються у навчальному процесі, а саме: при проведенні «Лабораторного практикуму з молекулярної біології» для бакалаврів кафедри біохімії зі спеціальності молекулярна біологія, НЦЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, у курсі лекцій для аспірантів «Молекулярні основи канцерогенезу» кафедри біології ІМБГ НАН України та у курсах лекцій «Головні аспекти молекулярно-біологічних досліджень» і «Основи генної інженерії та біоінформатичного аналізу» кафедри молекулярної біології та біотехнології Київського академічного університету.

Окрім того результати досліджень впроваджені на базі Державної установи «Інститут урології НАМН України» м. Києва «Спосіб використання молекулярних маркерів в ранній діагностиці нирково-клітинного раку» (2017 р.) та «Спосіб використання мікроРНК в ранній діагностиці нирково-клітинного раку» (2020 р.). Також оформлено патент, у співавторстві, на корисну модель: «Спосіб ранньої діагностики раку нирки».

Розглянувши звіт подібності щодо перевірки на плагіат, та перелік опублікованих дисертанткою праць, можна стверджувати, що дисертаційна робота Онищенко Катерини є результатом самостійних досліджень і не містить елементів плагіату та запозичень. Використані ідеї, результати і тексти інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

**Повнота викладу основних наукових результатів у опублікованих наукових працях.** Результати дисертаційного дослідження широко представлені у публікаціях та тезах доповідей, загалом опубліковано 32 наукові праці, у тому числі 8 статей у наукових фахових виданнях (5- з них

відносяться до фахових видань зі спеціальності Біологія, 2- медицина). З них: 2 статті у виданнях, що входять до WoS та Scopus (з них 1 стаття відноситься до 2-го квартилю); та 23 тези усних та стендових доповідей в збірниках матеріалів конференцій.

#### **Аналіз структури дисертації та результатів наукових досліджень:**

Структура дисертаційної роботи побудована за класичною схемою, та містить ступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів, висновки та список використаних джерел. Загальний обсяг дисертації – 222 сторінки. Робота містить 42 рисунки, 15 таблиць, 8 додатків. Список використаної літератури налічує 271 джерело.

Аналіз матеріалу проведених досліджень в цілому дозволяє зробити висновок про достатньо повне теоретичне та експериментальне обґрунтування положень, висунутих в роботі. Разом з тим до дисертаційної роботи виникли деякі зауваження і запитання.

В тексті дисертації зустрічаються деякі невдалі вислови, так

1. Стор. 31 та 111 – говориться про дослідження в даній роботі про «популяції хворих на рак нирки України». Краще було б говорити про «групу хворих з української популяції», як це написано на сторінці 30.
2. Стор. 34 – В назві Таблиці 2.4 «мікроРНК» написано з помилкою, окремо «мікро РНК»
3. Стор. 92, – в підпису рисунку 3.5 в назві мікроРНК hsa-miR-200a-3p відсутня приставка «hsa». Хоча це не є суттєвою помилкою, адже раніше при описі вибору мікроРНК вказувалося, що це мікроРНК людини (*Homo sapiens microRNA*), проте в тексті легше сприймати уніфіковане написання назв. Подібні описки зустрічаються і в назвах інших мікроРНК на стор.96 (miR-30a-5p) та стор.97 (miR-30a-5p, miR-138-1 та miR-200a-3p).
4. В деяких місцях поряд з правильним написанням «умовно-здорової тканини» зустрічається невдале написання «умовно-нормальні тканини» (Стор 32, 69, 87, 88, 92, 93, 96, 97, 99, 101, 105, 106, 108, 112, 113, 124,128, 129, 131-133, 137, 139, 157).
5. Стор.140 – «Рис. 3.40. Порівняння відсотка метильованих CpG-острівців промоторів генів на геномній ДНК пухлин і пкДНК плазми крові **хворих** у зразках...» - не вказано хворих на який тип раку, скНKK чи НКК. Очевидно, як вказано вище у описи, скНKK, але краще для сприйняття вказувати це у підпису до рисунку.

6. Так само на Стор. 122 – «Рис. 3.24. Результати ROC-аналізу індексу цілісності позаклітинної ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів з (n =50)» - пропущено уточнення з плазмі крові пацієнтів якого саме типу раку, хоча з тексту и з попередніх рисунків можна зрозуміти що «пацієнтів з скНKK»
7. У Таблицях Додатків (Таблиця Г.1, Таблиця Е.1, Таблиця Ж.1) відсутні «Примітки» під таблицею з розшифровками що означають дані «0» або «1» або «NA», пусті клітинки - швидше за все «наявність або відсутність або невизначеність параметру, параметр не визначався», як це прийнято позначати у публікаціях, але це бажано було додати для кращого розуміння представлених даних.

Питання до автора дисертаційної роботи:

- 1) В даному дослідженні ви запропонували низку біомаркерів для неінвазивної діагностики світлоклітинного раку нирки. Скажіть, будь ласка, чи ці маркери є специфічними тільки для раку нирки?
- 2) В даній роботі представлено результати по визначенню мікроРНК в пухлинах. Чи плануєте Ви продовжити роботу по визначенню експресії запропонованих вами для діагностики світлоклітинної карциноми нирки мікроРНК і в плазмі крові? Адже, судячи з отриманих результатів, вони є хорошими кандидатами для доповнення неінвазивної тест-системи.

**Висновок.** Дисертація ОНИЩЕНКО Катерини Вікторівни «Ідентифікація генетичних та епігенетичних змін при світлоклітинній карциномі нирки людини для розробки підходів неінвазивної діагностики захворювання» оформлена згідно вимог за наказом МОН України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації». Дисертаційна робота Онищенко К.В., подана на здобуття ступеня доктора філософії, за своїми актуальністю, науковим рівнем, теоретичною практичною цінністю, використанням сучасних методів досліджень, змістом та об'ємом опублікованих результатів повністю відповідає вимогам «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 № 44 від 12 січня 2022 року, та напряму наукового дослідження освітньо-наукової програми ІМБГ НАН України зі

спеціальності 091 «Біологія», а дисертантка - ОНИЩЕНКО Катерина Вікторівна заслугоує присудження їй ступеня доктора філософії.

Рецензент

Провідний науковий співробітник

відділу генетики людини

ІМБГ НАН України, доктор біологічних

наук, старшій науковий співробітник

Оксана ПІВЕНЬ

