

## **ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА**

доктора біологічних наук, професора, професора кафедри екології та зоології  
ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету  
імені Тараса Шевченка

**ГАРМАНЧУК ЛЮДМИЛИ ВАСИЛІВНИ**

на дисертаційну роботу

**ОНИЩЕНКО Катерини Вікторівни**

**«ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНЕТИЧНИХ ТА ЕПІГЕНЕТИЧНИХ ЗМІН ПРИ  
СВІТЛОКЛІТИННІЙ КАРЦИНОМІ НИРКИ ЛЮДИНИ ДЛЯ РОЗРОБКИ  
ПІДХОДІВ НЕІНВАЗИВНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЗАХВОРЮВАННЯ»,**

представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії

зі спеціальності 091 «Біологія»

**Актуальність теми дисертації.** Серед злжкісних пухлин нирки найпоширенішим є підтип світлоклітинної карцинома нирки (СКН). За своєчасного встановлення діагнозу СКН можливе збереження життя близько 90% пацієнтів. Проте розвиток цих новоутворень часто носить прихований характер, внаслідок чого захворювання виявляється на більш пізніх стадіях, коли у 30-40% хворих вже розвинені метастази. Це значно ускладнює лікування СКН та погіршує прогнози на повне одужання та хороший прогноз для пацієнтів. Отже, для збереження життя пацієнтів взагалі та його якості у післяопераційний період необхідно розробити маркери ранньої діагностики раку та моніторингу за станом пацієнтів в післяопераційний період, а також визначити маркери, що допоможуть у визначенні стадії хвороби, оцінці її перебігу, виборі мішеней таргетної терапії. В даному аспекті особливо важливим є створення неінвазивних тест-систем для виявлення біомаркерів захворювання у біологічних рідинах організму (плазма чи сироватка крові, сеча, лімфа).

Таким чином, дисертаційна робота Онищенко Катерини Вікторівни «Ідентифікація генетичних та епігенетичних змін при світлоклітинній карциномі нирки людини для розробки підходів неінвазивної діагностики

захворювання» присвячена пошуку та характеристиці низки молекулярних змін, що можуть бути використані в якості маркерів у плазмі крові для неінвазивної діагностики раку нирки та для уточнення діагнозу.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота охоплює здобутки, отримані Катериною Онищенко під час участі у багатьох науково-дослідних тематиках відділу функціональної геноміки та лабораторії біосинтезу нуклеїнових кислот, 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), «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 кислот.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, та їх достовірність.** Запропоновані в дисертаційній роботі Онищенко К. В. наукові положення, висновки і рекомендації є обґрунтованими та достовірними. Вони базуються на аналізі великого об'єму опрацьованого первинного матеріалу літературних джерел та баз даних, логічністю постановки завдань, застосуванні великого обсягу сучасних методів дослідження, урахуванні світового теоретичного і практичного досвіду та використанні системного підходу, статистичним аналізом та узагальненням отриманих даних.

**Новизна наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.** В дисертаційній роботі Онищенко Катерини Вікторівни визначено молекулярно-генетичні зміни як у біопсіях пухлин нирки, так і на позаклітинних нуклеїнових кислотах в плазмі крові, що можуть бути використані в якості маркерів світлоклітинного підтипу карциноми нирки.

Встановлено, що використання таких показників як концентрація та індекс цілісності позаклітинної ДНК (пкДНК), рівні експресії пкміРНК, а також гіперметилування генів *APC*, *RASSF1A*, *GPX3*, *PCDH8*, *RUNX3* можна використовувати як потенційні маркери для ранньої діагностики раку нирки на пкДНК, виділеній з плазми крові пацієнтів.

Вперше, на великій вибірці зразків від тих самих пацієнтів (пухлина, умовно здорова тканина нирки, плазма крові пацієнтів до і після хірургічного втручання), було визначено статус метилування CpG-острівців генів-супресорів *RASSF1A*, *RASSF1C*, *LRRC3B*, *GPX3*, *PCDH8*, *RUNX3*, *APC*, *TIMP3*, *VHL*, *p14ARF*, *p16INK4a* та визначено, що гіперметилування генів *RASSF1A*, *GPX3*, *APC* та *p14ARF* на пкДНК плазми крові може бути використано для ранньої діагностики раку нирки. Було детектовано мікросателітні зміни STR-маркерів генів *RASSF1* у 68,3%, *VHL* – у 48,2%, *CDKN2A* – 32,7% інформативних зразків досліджуваної групи хворих на рак нирки навіть на перших стадіях розвитку пухлини, що підтверджує їхню роль у розвитку цієї патології і, найбільше, гена *RASSF1*.

Встановлено зростання концентрації пкДНК у плазмі крові пацієнтів зі СКН на відміну від контрольної групи донорів та показано, що використання для цього методу кількісної ПЛР у реальному часі, є більш точним для діагностики захворювання, ніж метод інтеркаляції флуоресцентного барвника.

Показано збільшення індексу цілісності пкДНК, отриманої з плазми крові пацієнтів з раком нирки, що вказує на доцільність використання цього показника для попередньої діагностики раку, а також можливість для моніторингу наявності в організмі пацієнта метастатичних клітин, не видалених під час операції.

Виявлено зміни експресії мікро РНК hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p; hsa-miR-138-1, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-181a-5p та hsa-miR-200a-3p у новоутвореннях нирки в порівнянні зі здоровою контрольною тканиною. Вперше визначено набори міРНК, які можуть бути використані для уточнювальної діагностики новоутворень нирки за клініко-морфологічними показниками: стадія, класифікація TNM, атипія клітин за Фурман. Вперше показано достовірне зниження мікроРНК miR-30a-5p у пацієнтів з II стадією хвороби, на відміну від I стадії (AUC=0,7552). Вперше показана доцільність використання показників для мікроРНК miR-30a-5p (AUC=0,8229), miR-138-1 (AUC=0,8889) та miR-200a-3p (AUC=0,8229) для можливості встановлення I стадії чи доброякісності пухлин нирки. Вперше було з'ясовано, що hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p та hsa-miR-138-1 мають достовірне зниження експресії у порівнянні зі здоровим контролем для визначення пухлин нирки перших стадій (розміром до 7 см (T1N0M0) та понад 7 см (T2N0M0)). Вперше показана кореляція зниження кількості мікроРНК hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-138-1, hsa-miR-200a-3p та hsa-miR-324-5p в пухлинах нирки з градаціями атипії клітин за Фурман.

**Практичне значення дисертаційної роботи.** Важливість отриманих в ході виконання дисертаційної роботи результатів дослідження підтверджується впровадженням теоретичних та практичних висновків роботи у практику. Зокрема, результати роботи були впроваджені в практику на базі Державної установи «Інститут урології НАМН України» м. Києва у 2017 («Спосіб використання молекулярних маркерів в ранній діагностиці нирково-клітинного раку») та у 2020 роках («Спосіб використання мікроРНК в ранній діагностиці нирково-клітинного раку»).

За результатами досліджень було отримано патент на корисну модель: «Спосіб ранньої діагностики раку нирки» у співавторстві з ДУ «Інститут урології НАМН України» м. Києва.

Отримані дані щодо визначення генетичних та епігенетичних біомаркерів в плазмі крові були використані 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 та у курсах лекцій для аспірантів «Молекулярні основи канцерогенезу» кафедри біології ІМБГ НАН України, лекціях для студентів магістратури кафедри молекулярної біології та біотехнології Київського Академічного університету «Головні аспекти молекулярно-біологічних досліджень» та «Епігенетична регуляція експресії».

**Повнота викладу основних результатів у наукових фахових виданнях.**

Основні положення дисертації висвітлено у 32 наукових працях, серед них 8 статей у наукових виданнях, 2 з яких у виданнях, що входять до міжнародної наукометричної бази SCOPUS, одна з них (Disease Markers, Q1) також індексована у WoS; 1 патент і 23 тези доповідей у збірках вітчизняних та зарубіжних міжнародних наукових конференцій.

**Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності.** У дисертаційній роботі відсутні порушення академічної доброчесності. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

**Структура і обсяг дисертації, оцінка її змісту, завершеності та відповідності встановленим вимогам.** Дисертація Онищенко Катерини Вікторівни оформлена відповідно до вимог наказу МОН України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації». Повний обсяг роботи викладений на 222 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, розділів результатів власних досліджень, їх обговорення, висновків та додатків. Список цитованої літератури включає 271 посилання, більшість яких датовані в останні 5 років. Робота містить також 42 рисунки та 15 таблиць.

В розділі **Огляд літератури** Катерина Вікторівна висвітила сучасний стан проблеми, детально охарактеризувала гени, що залучені у канцерогенез нирки. При цьому авторкою було детально проаналізовано досить велику кількість закордонних публікацій, які мають безпосереднє відношення до теми дисертації. Даний розділ доречно структурований, містить сучасні дані світової

літератури щодо існуючих маркерних молекул, генетичних та епігенетичних змін, характерних для патофізіології раку в цілому, та карциноми нирки зокрема. Детально розглянуто всесвітні розробки тест-систем для ранньої діагностики раку нирки, висвітлено роль позаклітинних нуклеїнових кислот як маркерів пухлиноутворення, вказано найбільш значимі діагностичні та прогностичні маркери. Наприкінці даного розділу вказано щодо актуальності та мети, покладених в основу дисертаційного дослідження. *Однак, варто було б зазначити в кінці даного розділу щодо необхідності удосконалення існуючих тест-систем, і зокрема, з використанням неінвазивних методів за допомогою легкодоступного біоматеріалу такого як сеча, сироватка/плазма крові чи лімфа пацієнтів.*

Розділ **Матеріали та методи дослідження** побудовано за традиційною схемою, складається із переліку використаного обладнання, реактивів і матеріалів, спеціалізованих молекулярно-біологічних методики досліджень в поєднанні із аналізом клініко-патологічних станів хворих з анамнезом скННК. Методичні прийоми та підходи детально описані, надано послідовності праймерів для проведення ПЛР, детально описані різнопланові методи виділення нуклеїнових кислот, ПЛР-діагностики, надано методи статистичного аналізу. До даного розділу є декілька незначних зауважень:

- Підпис до таблиці 2.1 звучить некоректно «Медичні дані хворих з раком нирки – загальні клініко-патологічні характеристики», можливо варто було б зазначити «Клініко-лабораторна характеристика хворих на рак нирки»
- За якими параметрами було охарактеризовано умовно-нормальну тканину хворих з раком нирки?

Розділ **результати експериментальних досліджень** представлено 6 підрозділами, в яких детально описано послідовність проведеного дослідження щодо змін експресії мікроРНК, геномної ДНК у зразках біопсій пацієнтів з раком нирки у порівнянні з умовно здоровою тканиною нирки для визначення можливих молекулярних маркерів уточнювальної діагностики у біопсійному матеріалі хворих. Основна частина досліджень була зосереджена

на визначенні зміни концентрації та індексу цілісності пкДНК в плазмі крові пацієнтів з РН в порівнянні з здоровими донорами. Важливо відмітити, що при визначенні маркерів розвитку світлоклітинного раку нирки на пкДНК було проведено порівняння статусу метилювання CpG-острівців промоторних ділянок обраних генів на зразках геномної ДНК, виділеної з пухлин та пкДНК плазми 86 крові від одних і тих же пацієнтів. В якості негативного контролю гДНК було використано біопсії прилеглих до пухлини тканин відповідних пацієнтів. Для контролю метилювання генів на пкДНК використовували зразки плазми здорових донорів. Проте варто зазначити, деякі некоректні підписи до підрозділів, таблиць та рисунків, такі як, наприклад:

- *Таблиця 3.1 підписана некоректно Гени, задіяні у процесах канцерогенезу, що можуть регулюватися обраними мікроРНК,*
- *рис. 3.1 варто було б Електрофореграма розділення РНК у денатуруючих умовах*
- *Таблиця 3.3 Детекція втрати гетерозиготності по STR-маркерам у пацієнтів з тяжким перебігом нирково-клітинного раку*

*В одному із заключень зазначено:*

*«Отримані нами дані показують, що вміст високомолекулярної пкДНК в плазмі крові пацієнтів з раком нирки більший, ніж в плазмі крові здорових донорів і підтверджують теорію про некротичне походження пкДНК» - Поясніть, що це за теорія? І яке тоді походження високомолекулярної пкДНК в здорових донорів?*

Незначні уточнення та зауваження до даного розділу не впливають на значимість отриманих результатів, які розкривають суть неінвазивної тест-системи для підтвердження найбільш значимих діагностичних маркерів раку нирки і світлоклітинного, зокрема., а також на біопсійному матеріалі хворих при аналізі мікроРНК, які можуть бути використані для уточнювальної діагностики новоутворень нирки за такими клінікоморфологічними показниками: стадія, класифікація TNM, атипія клітин за Фурман.

**В Розділі 4 Аналіз результатів та узагальнення** проведено системний аналіз щодо сучасних діагностичних та терапевтичних засобів для успішного

лікування онкологічних захворювань. Наголошується на актуальності сучасних молекулярно-генетичних методів діагностики таких як пошук та ідентифікація генів та їх продуктів, що приймають участь в злоякісній трансформації клітини та на їх основі використанню індивідуальних підходів до лікування новоутворень. І в даному аспекті рання діагностика захворювання, а для діагностики раку – саме неінвазивна діагностика, що заснована на визначенні біомаркерів у кров'яному руслі є надзвичайно значимою і актуальною. Порівняльний аналіз проведений за матеріалами дисертаційної роботи опирається на сучасні результати, представлені в світовій науковій літературі, датовані в основному в останні 5 років. В прикінцевому заключенні авторкою стверджується, що «впровадження результатів розробки панелей маркерів для діагностики раку нирки в клінічну практику матиме суттєвий соціальний та економічний ефект. Рання діагностика раку нирки і, зокрема, світлоклітинної карциноми, що є найагресивнішим підтипом, забезпечить запобігання прогресії хвороби, вчасне та більш ефективне лікування, швидше одужання та збереження життя працездатного населення», з чим повністю погоджуюсь.

Наведені **Висновки**, повністю відображають мету та завдання даного дослідження, логічно випливають із проведеного дослідження, сформульовані чітко і ясно, вони цілком відповідають поставленим завданням та повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Наукові положення, наведені в дисертації Онищенко Катерини Вікторівни, є достовірними, що підтверджується використанням великого обсягу експериментальних досліджень, логічністю постановки завдань, статистичним аналізом та узагальненням отриманих даних. Дисертація виконана з дотриманням усіх вимог біоетики (протокол №2 від 07.04.2020).

Таким чином, дисертаційна робота Катерини Вікторівни заслуговує на позитивну оцінку, незважаючи на ряд запитань та зауважень, які виникли в процесі рецензування роботи, і, загалом, не знижують наукової цінності роботи.

**Висновок.** Дисертаційна робота ОНИЩЕНКО Катерини Вікторівни «Ідентифікація генетичних та епігенетичних змін при світлоклітинній карциномі нирки людини для розробки підходів неінвазивної діагностики



захворювання» є завершеною науковою працею, яка за актуальністю теми, новизною досліджень, теоретичними і практичними значеннями отриманих результатів, а також сучасним методичним рівнем проведених досліджень, свідчить про високі наукові досягнення здобувачки. Базуючись на вищевказаному, вважаю, що дана дисертаційна робота Онищенко К. В., подана на здобуття ступеня доктора філософії, 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 No 44 від 12 січня 2022 року.

Тому вважаю, що здобувачка, ОНИЩЕНКО Катерина Вікторівна, заслуговує на присудження їй ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

**Офіційний опонент:**

Доктор біологічних наук, професор,

проф. кафедри зоології та екології

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка



Людмила ГАРМАНЧУК