

ВІДЗИВ

офіційного опонента

професора, завідувача відділу загальної та молекулярної патофізіології
Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

ДОСЕНКА Віктора Євгеновича

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 та зв'язок з науковими програмами.

Нирково-клітинний рак (НКТ) є відносно поширеною патологією, яка виявляється у 3% усіх випадків злоякісних неоплазій у дорослих (90% злоякісних пухлин нирки). Своєчасна діагностика, звісно, є ключем до запобігання прогресуванню НКТ та ефективного лікування. Але через відсутність остаточних та специфічних діагностичних біомаркерів НКТ та його безсимптомний характер діагностувати його на ранніх стадіях доволі складно. Надійні та чіткі молекулярні маркери можуть не тільки уточнити діагноз, але також класифікувати пухлини за підтипами, що може сприяти подальшій персоніфікованій терапії. Потенційні біомаркери можуть забезпечити більш високий рівень стратифікації пацієнтів з НКТ та допомогти адаптувати нові таргетні методи лікування. Серед найбільш перспективних біомаркерів розглядають генетичні (мутації, делеції), епігенетичні (метилування ДНК, мікроРНК і довгі некодуючі РНК) та білкові біомаркери, які, як відомо, можуть бути специфічними для прогресування та метастазування НКТ, і тим самим виступати в якості неінвазивних молекулярних маркерів при НКТ.

Дисертаційна робота Онищенко Катерини Вікторівни «Ідентифікація генетичних та епігенетичних змін при світлоклітинній карциномі нирки людини для розробки підходів неінвазивної діагностики захворювання»

присвячена саме пошуку та характеристиці низки молекулярних змін, що можуть бути використані в якості неінвазивних специфічних маркерів у плазмі крові для діагностики скНКТ, а також допомогти у класифікації пухлини за підтипами. Здобувачкою було проаналізовано велику кількість даних, Використовуючи відкриті бази даних відібрано для ряд епігенетичних та генетичних порушень, що спостерігаються при канцерогенезі скНКТ. Для визначення їхнього можливого застосування в якості діагностичних маркерів скНКТ Катериною Вікторівною було проведене комплексне молекулярно-генетичне дослідження 122 зразків пацієнтів з пухлинами нирки, куди входили біопсії пухлини (переважно I-II стадії), прилеглої умовно нормальної тканини та плазма крові пацієнтів (що збиралася до та після проведення хірургічного лікування) та здорових донорів.

Виконання дисертаційного дослідження Катериною Онищенко було пов'язано з роботою над декількома науковими та науково-практичними темами Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, в яких вона приймала участь ще за студентства: «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. Дисертанткою разом з науковою керівничкою точно і чітко сформульовано мету і відповідні до неї завдання, які полягали у визначенні ряду молекулярно-генетичних змін як у біопсіях пухлин нирки, так і на позаклітинних нуклеїнових кислотах плазми крові, що можуть бути маркерами світлоклітинного підтипу карциноми нирки. Робота виконана здобувачкою протягом тривалого часу, тому містить достатньо великий обсяг результатів експериментальних досліджень, які проводились на різних зразках пацієнтів з НКР. Поставлені завдання роботи реалізовані в повному обсязі з використанням відповідних сучасних методів досліджень. На підставі аналізу отриманих результатів досліджень із застосуванням статистичних методів були сформульовані обґрунтовані висновки та наукові положення. У тексті дисертації відсутнє порушення вимог академічної доброчесності.

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 плазми крові, що можуть бути використані в якості маркерів світлоклітинного підтипу карциноми нирки. В представленій роботі є низка висновків, практичних рекомендацій та наукових положень, які мають характер новизни та відображають особистий внесок дисертантки.

За результатами роботи, вперше, на молекулярно-генетичному рівні, показано комплекс порушень пухлин карциноми нирки, що зустрічаються в групі хворих з української популяції. Вперше проведено комплексне 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 у одних і тих самих пацієнтів з локалізованими новоутвореннями нирки. Показано, що рівні концентрації та «індекс цілісності» пкДНК плазми крові

можуть виступати як достовірні маркери новоутворень нирки. Визначено, що метод детекції кількості пкДНК у плазмі крові шляхом кПЛР більш чутливий, ніж метод визначення інтеркаляції 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* та *RUNX3* гіперметиловані у біопсіях пухлин та плазмі крові пацієнтів на рак нирки та визначено, що гіперметилування генів *RASSF1A*, *GPX3*, *APC* та *p14ARF* на пкДНК плазми крові може бути використано для ранньої діагностики НКР. Визначено втрату гетерозиготності генів *RASSF1* у 68,3%, *VHL* – у 48,2%, *CDKN2A* – 32,7% інформативних зразків досліджуваної групи хворих України на рак нирки навіть на перших стадіях розвитку пухлини, що підтверджує їхню роль у розвитку цієї патології і, найбільше, гена *RASSF1*.

Вперше визначено мікроРНК, 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 експресії 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 *miR-30a-5p*, *miR-30c-5p* та *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 *miR-30c-5p*, *miR-138-1*, *miR-200a-3p* та *miR-324-5p* в пухлинах нирки з градаціями атипії клітин за Фурман.

Практичне значення дисертаційної роботи. За результатами досліджень було отримано патент на корисну модель: «Спосіб ранньої діагностики раку нирки» у співавторстві з лікарями з ДУ «Інститут урології

НАМН України» м. Києва. Крім того, практичне значення дисертації полягає у впровадженні отриманих заключень роботи у практику, про що свідчать отримані акти впровадження в ДУ «Інститут урології НАМН України» м. Києва «Спосіб використання молекулярних маркерів в ранній діагностиці нирково-клітинного раку» у 2017 році та «Спосіб використання мікроРНК в ранній діагностиці нирково-клітинного раку» у 2020 році.

Отримані дані щодо визначення генетичних та епігенетичних біомаркерів в плазмі крові використовувалися 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, у 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, 1 патент і 23 тези доповідей у збірках вітчизняних та зарубіжних міжнародних наукових конференцій. 2 з опублікованих статей до видань з міжнародної наукометричної бази Scopus і представлені у електронній базі даних медичних і біологічних публікацій PubMed: створеній на основі розділу «біотехнологія» Національної медичної бібліотеки США: «Experimental oncology» та «Disease Markers». Міжнародне видання «Disease Markers» відноситься до публікацій з квартілю Q1 і також індексоване у WoS.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності. У дисертаційній роботі не виявлено порушень академічної доброчесності. Для всіх публікацій у співавторстві зазначено особистий внесок дисертантки.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів, що зустрічаються в тексті дисертації, мають посилання на відповідне джерело.

Структура і обсяг дисертації, оцінка її змісту, завершеності та відповідності встановленим вимогам. Дисертація Оніщенко 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, 42 рисунки та 15 таблиць.

Дисертанткою було детально проаналізовано достатньо велику кількість закордонних публікацій, що мають безпосереднє відношення до теми дослідження. Розділ **Огляд літератури** доречно структурований, охоплює висвітлення проблеми та опис клініко-морфологічних характеристик карцином нирки і світло клітинної карциноми зокрема, генетичні та епігенетичні зміни, характерні для патофізіології раку, характеристику генів і мікроРНК, що залучені у канцерогенез нирки. В даному розділі також висвітлено роль позаклітинних нуклеїнових кислот як маркерів пухлиноутворення, вказано найбільш значимі діагностичні та прогностичні маркери.

Методи дослідження: виділення нуклеїнових кислот, оцінка їх кількісних та якісних характеристик; ПЛР, метилспецифічна ПЛР (МС-ПЛР), бісульфітне секвенування, кількісне визначення ДНК методами полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (кПЛР) та за флуоресценцією інтеркалюючого барвника, кількісна полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (ЗТ-кПЛР) у реальному часі, визначення втрати гетерозиготності за STR-маркерами (LOH - аналіз) шляхом детекції у ПААГ та фрагментним аналізом, електрофорез нуклеїнових кислот, біоінформатичні та статистичні методи.

Результати власних досліджень містять 6 розділів, кожен з яких містить підрозділи і охоплює дослідження рівню експресії мікроРНК ,

виділення позаклітинної ДНК плазми крові та геномної ДНК з пухлин і навколопухлинних тканин хворих з раком нирки та оцінку їх якості, аналіз мікросателітних маркерів на геномній ДНК пухлин нирки шляхом детекції у ПААГ та за допомогою капілярного електрофорезу, визначення концентрації позаклітинної ДНК, виділеної з плазми крові, визначення «індексу цілісності» пкДНК, виділеної з плазми крові, аналіз статусу метилювання промоторних ділянок відібраних для досліджень генів та відбір потенційних ДНК маркерів на основі епігенетичних змін CpG-острівців для діагностики скННК в плазмі крові.

В розділі **Аналіз та обговорення результатів** Катериною Вікторівною детально проведено узагальнення та аналіз отриманих результатів досліджень, спираючись та порівнюючи власні отримані результати, та результати інших груп дослідників, опубліковані у міжнародних наукових фахових виданнях, завдяки чому логічно обґрунтовано отримані **висновки** дисертаційної роботи.

Загалом позитивно оцінюючи дисертаційну роботу Онищенко Катерини Вікторівни все ж виникають деякі **зауваження** та уточнюючі запитання:

1. Незрозуміло, який параметр за результатами дослідження є найбільш інформативним? Визначати рівень позаклітинної ДНК, мікроРНК чи втрату гетерозиготності? Що, на думку дослідниці, знайде застосування в практичній медицині?

2. Чи дозволяють параметри, що вимірювалися побачити патогенетичні ланцюжки при цьому захворюванні чи за його прогресування? Іншими словами, чи мають біомаркери функціональне значення, чи пов'язані між собою, наприклад, рівень певної мікроРНК із втратою гетерозиготності чи рівнем метилюванням тих чи інших генів?

3. Наскільки активними мають бути процеси апоптозу, некрозу чи виділення ДНК в кров пухлиною, розмір якої на першій стадії може становити 1-2 см? Невже розведення в ~5 літрах циркулюючої крові дозволяє виділити саме пухлинну ДНК та ще й оцінити її стан?

Проте, запитання та зауваження, які виникли під час ознайомлення з дисертацією Онищенко Катерини Вікторівни мають лише дискусійне значення і

ніякою мірою не знижують позитивної оцінки дисертації в цілому, а також викладених дисертантом основних наукових положень та висновків.

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 постановки та 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 Оніщенко 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, а здобувачка, ОНИЩЕНКО Катерина Вікторівна, заслуговує на присудження їй ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент:

професор, завідувач відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України

Віктор ДОСЕНКО

ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О.О.Богомольця
НАН України
Підпис *Досенко В.В.*
Засадиною
Вчений секретар *[підпис]*



Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 14:11:20 05.01.2024

Назва файлу з підписом: Відзив ОНИЩЕНКО.pdf.asice
Розмір файлу з підписом: 2.7 МБ

Назва файлу без підпису: Відзив ОНИЩЕНКО.pdf.asice
Розмір файлу без підпису: 2.7 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Досенко Віктор Євгенович

П.І.Б.: Досенко Віктор Євгенович

Країна: Україна

РНОКПП: 2572114996

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 15:04:00 05.01.2024

Сертифікат виданий: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг

Серійний номер: 382367105294AF9704000000BE2F29002C01B701

Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301

Серійний номер носія особистого ключа: Не визначено

Алгоритм підпису: ДСТУ-4145

Тип підпису: Кваліфікований

Тип контейнера: Підпис та дані в архіві (розширений) (ASiC-E)

Формат підпису: З повними даними ЦСК для перевірки (CAdES-X Long)

Сертифікат: Кваліфікований