

РЕЦЕНЗІЯ

Доктора біологічних наук, старшого дослідника, провідного наукового співробітника відділу молекулярної онкогенетики ІМБГ НАН України
ГЕРАЩЕНКО Ганни Володимирівни

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 теми.

Карциноми нирки – один з агресивних типів злоякісних новоутворень людини. Хоча 5-тирічний прогноз виживання таких хворих не є песимістичним, однак це дійсно тільки для осіб, у яких дана патологія виявлена на перших стадіях розвитку і які не зазнають серйозного хірургічного втручання з резекцією великої ділянки або повної нефректомії ураженого органу, що призводить до інвалідизації пацієнтів або смерті. Виявлені на пізніх стадіях пухлини у більше ніж 30% пацієнтів дають метастази, що підвищує ризик смертності хворих, або появи рецидивів хвороби. На жаль, дане онкозахворювання є хемо- та радіорезистентним. Тож хірургічне втручання та післяопераційна терапія залишаються єдиними типами лікування для хворих зі злоякісними новоутвореннями нирки.

Найбільш поширений та найагресивніший тип карцином нирки – світлоклітинна карцинома нирки (~75%). Вона займає третє місце по частоті захворюваності серед урологічних пухлин, після раку простати та раку сечового міхура. Це захворювання характеризується негативним прогнозом, тому діагностика і лікування світлоклітинної карциноми нирки залишається складною проблемою як в Україні, так і в світі.

Тож рак нирки залишається складною проблемою, і дослідження особливостей канцерогенезу на молекулярному рівні, визначення генетичних та епігенетичних змін, що впливають на регуляцію генів у клітинах пухлин шляхом порівняння їх статусу як на пухлинній ДНК так і

на пкДНК плазми крові, є важливим для виявлення нових специфічних онкомаркерів цього новоутворення.

Ідентифікація найбільш характерних для пухлини нирки молекулярних біомаркерів, визначених в результаті проведення даного дослідження, сприятиме розвитку підходів для діагностики, у тому числі неінвазивних методів та допоможе у виборі оптимального лікування та подальшому контролю захворювання.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

При роботі над дисертацією Катерина Онищенко приймала участь у багатьох науково-дослідних тематиках відділу функціональної геноміки та лабораторії біосинтезу нуклеїнових кислот цього відділу Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, зокрема «Втрата гетерозиготності і метилювання генів-імуносупресорів в карциномах нирки і сечового міхура» (2016, 2017 рр., номери державної реєстрації 0116U007719 та 0117U002802), «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), «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).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, та їх достовірність.

Наукові положення, висновки та рекомендації, сформульовані у дисертаційній роботі, є цілком обґрунтованими. Вони базуються на самостійно зібраному і коректно опрацьованому науковому матеріалі. Мета та завдання логічно пов'язані між собою, а практична частина роботи виконана з використанням сучасних методів дослідження і враховуючи сучасні науково-практичні підходи. Висновки, зроблені на основі аналізу отриманих автором результатів досліджень, є цілком аргументованими та охоплюють усі положення, що розглядаються у дисертації.

Наукова новизна отриманих результатів.

В дисертаційній роботі Онищенко Катерини Вікторівни визначено низку епігенетичних та генетичних порушень, які потенційно слугувати молекулярними маркерами класифікації підтипів нирково-клітинної

карциноми, ранньої діагностики раку на позаклітинній ДНК (пкДНК) крові, використовуватися для розробки терапії раку, вибору оптимальної схеми лікування та моніторингу перебігу захворювання.

У дисертації вперше одержані такі нові наукові результати:

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

Вперше, на великій вибірці зразків 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 світлоклітинною карциномою нирки 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 мікроРНК *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 мікроРНК, які можуть бути використані для уточнювальної діагностики новоутворень нирки за клініко-морфологічними показниками: стадія, класифікація TNM, атипія клітин за Фурман:

1. Вперше показано достовірне зниження мікроРНК miR-30a-5p у пацієнтів з II стадією хвороби, на відміну від I стадії (AUC=0,7552)

2. 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.

3. 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)).

4. 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.

Теоретичне та практичне значення результатів дисертації. Виявлені порушення у складі позаклітинних нуклеїнових кислот (пкДНК та пкмикроРНК) плазми хворих на скРН свідчать про можливість застосування цих генів як компонентів мультимаркерної панелі ранньої діагностики даного типу раку. Визначення концентрації мікроРНК (miR-30a/c-5p, miR-138-1, miR-200a-3p), пкДНК та статусу метилювання 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 мікроРНК miR-138-1 та прогресією пухлини за Фурман (G2>G3) може бути використана для неінвазивного моніторингу адьювантної терапії хворих.

Використання результатів роботи.

За результатами роботи зроблено два дослідних впровадження 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.).

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

Також отримані результати 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 ім.Т.Г.Шевченка та використовуються у курсі лекцій для аспірантів «Молекулярні основи канцерогенезу» кафедри біології ІМБГ НАН України.

Повнота викладу основних результатів у наукових фахових виданнях.

Ознайомлення з публікаціями К.В. Онищенко свідчить про високий ступінь висвітлення матеріалів дисертації в наукових публікаціях. За результатами досліджень 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); інші статті - у фахових виданнях України). Також за темою дисертації опубліковано 23 тези усних та стендових доповідей в збірниках матеріалів конференцій та отримано 1 патент на корисну модель.

Розглянувши звіт подібності щодо перевірки на плагіат, та спираючись на опубліковані здобувачем матеріали, 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.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій.

Наукові положення, висновки та рекомендації, сформульовані у дисертаційній роботі, є цілком обґрунтованими. Вони базуються на самостійно зібраному і коректно опрацьованому науковому матеріалі з використанням сучасних методів досліджень. Висновки, зроблені на основі аналізу отриманих автором результатів досліджень, є цілком аргументованими та охоплюють усі положення, що розглядаються у дисертації.

Аналіз структури дисертації та результатів наукових досліджень:

Структура дисертаційної роботи побудована за загальноприйнятою схемою, має всі необхідні складові елементи і підпорядкована досягненню мети. Робота складається зі вступу, чотирьох розділів, висновків, списку використаних літературних джерел та додатків.

У вступі розглядається актуальність проблеми, ступінь її розробленості, зв'язок з науковими програмами і темами, сформульовано

мету і завдання дисертаційного дослідження, визначено його об'єкт і предмет, наведено наукову новизну одержаних результатів та їх практичну значимість. Також у вступі висвітлена наукова новизна і практичне значення роботи, наведена інформація про апробацію і публікації, у яких висвітлено основний матеріал дисертації, показано особистий внесок здобувача.

Розділ 1 – Огляд літератури, що містить дані щодо загальної характеристики злоякісних пухлин нирки і світло клітинних карцином зокрема. Детально розглянуто всесвітні розробки тест-систем для ранньої діагностики раку нирки, що базуються на детекції молекулярних маркерів, в тому числі метилювання генів. Висвітлено їх переваги та недоліки. Також розділ присвячений висвітленню ролі позаклітинних нуклеїнових кислот як маркерів пухлиноутворення. Описано роль метилювання, мікросателітного дисбалансу та зміни експресії мікроРНК у процесах канцерогенезу. Також надані характеристики генам та мікроРНК, що стали предметами досліджень даної роботи.

У **Розділі 2** – викладено методологію дослідження, описано обладнання, реактиви і матеріали, детально викладено спеціальні методики досліджень та статистичні методи аналізу результатів. Також викладена інформація щодо використаного матеріалу хворих, зокрема клініко-патологічні показники, TNM класифікація, стадія захворювання, вік, стать пацієнтів, визначення атипії клітин за Фурман.

Розділ 3 – присвячений безпосередньо викладенню результатів проведених досліджень. В ньому висвітлено результати з визначення концентрації (27 пацієнтів) та індексу цілісності (50 пацієнтів) пкДНК плазми крові. Проведено порівняльний аналіз різних методик визначення концентрації пкДНК, Визначено що ці показники можуть бути використані в якості маркерів неінвазивного визначення пухлинного процесу, а метод кількісної ПЛР визначено більш чутливим для дослідження концентрації пкДНК, ніж метод інтеркаляції флуоресцентного барвника.

Крім того, проводячи комплексний аналіз стану метилювання генів-супресорів на зразках 89 пацієнтів з новоутворенням нирки (пухлина, умовно здорова тканина нирки, плазма крові пацієнтів, взято до і після (5-7 днів) операції) було визначено не тільки комплекс генів, епігенетичні порушення яких спостерігаються в пухлинах та на пкДНК плазмі крові хворих на рак нирки, але й визначити панель генів, метилювання яких з великою достовірністю можна використовувати для діагностування раку

нирки в крові вже на перших стадіях захворювання (*RASSF1A*, *GPX3*, *APC* та *CDKN2A(p14ARF)*).

Велика частина роботи присвячена визначенню змін експресії мікроРНК у пухлинах хворих на рак нирки (50 пацієнтів). Отримані дані допомогли виявити мікроРНК, зміна експресії яких асоційована з клініко-морфологічними даними пацієнтів (стадія, ступінь поширеності пухлини, атипія за Фурман). Також показано, що мікроРНК *miR-200a-3p* може в подальшому слугувати в якості маркера для визначення злоякісних пухлин нирки. Крім того, визначено мікроРНК, зміни яких асоційовані з віком хворих та статтю. Це стане в пригоді, коли будуть проводитися дослідження з вибору маркерів для діагностичних панелей неінвазивних тест-систем на основі визначення біомаркерів у крові. Можливо буде розробити тест-системи для різних груп з урахуванням як статі, так і віку для більш точного діагностування хвороби.

У **Розділі 4** досить детально проведено узагальнення та аналіз отриманих результатів досліджень.

Дисертаційна робота присвячена визначенню генетичних та епігенетичних порушень при світлоклітинній карциномі нирки людини для пошуку потенційних маркерів цієї хвороби та розробки підходів до неінвазивної діагностики даного типу захворювання.

Дисертація характеризується єдністю змісту та відповідає вимогам щодо її оформлення.

Висновки сформульовані у відповідності до поставлених завдань і базуються на достовірному фактичному матеріалі дослідження, дані яких в достатній мірі висвітлені в опублікованих наукових працях.

Дискусійні питання, зауваження щодо оформлення та змісту дисертації.

Незважаючи на цілком позитивне враження від дисертації, слід навести низку зауважень:

Слід звернути увагу на оформлення дисертаційної роботи та виправити численні друкарські помилки у тексті.

Змінити фразу «показано комплекс порушень пухлин карциноми нирки, що зустрічаються в українській популяції хворих» – краще було б написати про «групу хворих з української популяції», стор. 31 та 111

Результати:

Перевірити та співставити результати де тільки нирково-клітинні карциноми, а де світлоклітинні карциноми нирки, а де пацієнти з новоутвореннями нирки (рис.3.21).

Рис.3.20, 3.21- вісь У – метилування.

Зустрічаються невдалі вирази «умовно здорової тканини», «нормальні донори». Тканини є «умовно-нормальними», а донори – «здоровими».

У Таблиці 3.7 не ясно що за показники для параметра X^2 ?

У додатках:

Додаток В. Назва Таблиці В.1 «Розподіл пацієнтів з раком нирки за віком та стадією розвитку хвороби» - це клініко-патологічні характеристики зразків пацієнтів. Крім того у зразка 1 дивна стать пацієнта «1» - мабуть це ступінь диференціювання за Фурман. Крім того ніде немає пояснення скорочення що таке «RCC».

Додаток Г – під таблицею необхідно дати підпис «Примітки» та в них додати що означають дані «0» або «1» - швидше за все наявність або відсутність метилування. І в таблиці не повинно бути порожніх клітин.

Внести до ПЕРЕЛІКУ УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ: AUC, LHR+, LHR-

При Продовженні таблиці Д.1 не треба знову повторювати назву таблиці.

Додати Примітку до Додатку Е – з описом що є що та прибрати порожні клітини.

Вищенаведені недоліки не знижують наукову цінність дисертаційної роботи.

Питання до дисертантки:

- 1) Як Ви вважаєте, чи змінюється метилування пухлино-асоційованих генів під час прогресії пухлин?
- 2) Чи можна вважати, що зміни експресії мікроРНК, що були визначені у пухлинах світлоклітинної карциноми нирки будуть специфічними тільки для цієї патології?
- 3) На Вашу думку, з огляду на ваш досвід в цій роботі по визначенню біомаркерів ранньої діагностики скННК, чи можна в перспективі знайти найбільш специфічні показники, що можна буде використовувати у якості маркерів карциноми нирки, як це розроблено EpiGenomics (Epi proColon) для визначення колоректального раку?

Дисертація ОНИЩЕНКО Катерини Вікторівни «Ідентифікація генетичних та епігенетичних змін при світлоклітинній карциномі нирки людини для розробки підходів неінвазивної діагностики захворювання» оформлена відповідно до вимог наказу МОН України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації». Вважаю, що дана 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 її авторка - ОНИЩЕНКО Катерина Вікторівна заслуговує присудження їй ступеня доктора філософії у даній галузі наук.

Рецензент

Провідний науковий співробітник
відділу молекулярної онкогенетики
ІМБГ НАН України,
доктор біологічних наук,
старший дослідник



Ганна ГЕРАЩЕНКО