

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу
Задворного Тараса Володимировича
«Молекулярно-біологічні ознаки, асоційовані із ступенем злоякісності
раку передміхурової залози»,
поданої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю 14.01.07 – онкологія

Актуальність теми дисертації. Рак передміхурової залози (РПЗ) знаходиться на другому місці по частоті первинних випадків діагностованих новоутворень у чоловіків після раку шкіри. Так, 1 особа із 9 отримує такий діагноз за життя. На жаль, РПЗ знаходиться також на другому місці по кількості смертей від захворювання на рак, поступаючись лише раку легені. Проте статистичні дані свідчать, що лише 1 чоловік із 41 може померти від РПЗ. Тобто, довгий час більшість хворих на РПЗ навіть не знають про наявність своєї хвороби. Це свідчить про те, що захворювання перебігає латентно і не впливає на якість та тривалість життя хворих хоча, якщо воно виявляється на пізніх клінічних стадіях, тоді лікування є, як правило, дороговартісним і малоефективним. Дуже небезпечним фактором, що впливає на виживаність пацієнтів, є висока частота розвитку рецидиву захворювання, особливо протягом перших 3-х років після хірургічного втручання, причому рецидиви виникають безсимптомно.

Ще однією проблемою є те, що вибір стратегії лікування, зроблений на основі оцінки лише клінічних показників, таких, як рівень простатичного специфічного антигена (ПСА), стадія пухлини за системою TNM і сума балів за шкалою гістологічної класифікації Глісона (індекс Глісона) у половині випадків призводить до хибного шляху. Тому пошук факторів, які можна використовувати для оцінки агресивності РПЗ, а тим більше, неінвазивних методів аналізу, безумовно, є пріоритетним напрямком досліджень.

Такими факторами можуть бути позаклітинні мікроРНК, рівень експресії яких можна аналізувати у сироватці крові хворих а РПЗ, а також

інші генетичні та протеїнові маркери. Можливою є детекція пухлинних клітин із характеристиками стовбурових клітин для оцінки агресивності пухлини.

Вищеописане вказує на те, що розширення молекулярно-генетичних досліджень на експериментальному та клінічному матеріалі з урахуванням показників мікроРНК, лактоферину, а також маркерів стовбурових клітин у тканині РПЗ на клінічному матеріалі забезпечать об'єктивну оцінку агресивності РПЗ, що стане підґрунтям для предиктивного прогнозу перебігу хвороби та розробки нових програм персоналізованої терапії хворих.

Дисертаційна робота Задворного Т.В. присвячена саме цій проблемі – дослідженню факторів, які впливають на агресивність РПЗ та створенню предиктивної панелі маркерів для прогнозу перебігу хвороби та розробки нових алгоритмів персоналізованої терапії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в лабораторії механізмів медикаментозної резистентності відділу моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії відповідно до плану науково-дослідних робіт Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України за такими темами: «Молекулярна епідеміологія металовмісних білків у взаємовідносинах пухлини та організму» (2012-2016 рр., номер державної реєстрації 0112U002197), «Роль лактоферину в ініціації та перебігу найбільш розповсюджених гормонзалежних злоякісних новоутворень» (2017-2021 рр., № держреєстрації 0115U005381), «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (2017-2021 рр., № держреєстрації 0117U002034), «Роль епітеліально-мезенхімального переходу у механізмах формування медикаментозної резистентності клітин раку передміхурової залози людини» (2017-2018, № державної реєстрації 0117U006124).

Достовірність та ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Метою роботи

було виявлення молекулярно-генетичних та епігенетичних біомаркерів РПЗ людини, асоційованих із агресивністю перебігу пухлинного процесу. Мету роботи повністю розкривають поставлені задачі.

Робота виконана на клінічних парних зразках сироватки периферичної крові і пухлинної тканини 113 хворих на РПЗ, а також ретроспективно на зразках пухлинної тканини 120 хворих на РПЗ. Також було проведено експериментальні дослідження на модельних лініях клітин, отриманих від зразків РПЗ, а саме LNCaP та DU-145, яким властиве формування пухлин із різною агресивністю у експериментальних тваринах.

Дисертант застосував сучасні методи дослідження, включаючи молекулярно-біологічні (виділення РНК, синтез кДНК, визначення рівня експресії генів і мікроРНК за допомогою кількісної ПЛР в реальному часі), клітинної біології (Transwell assay, культури клітин), імунологічні (імуноцитохімічний та імуногістохімічний аналіз), морфологічні та методи статистики.

Достовірність наукових положень, висновків і практичних рекомендацій дисертаційної роботи повністю обґрунтовано вдало обраним комплексом методологічних підходів для досягнення поставленої мети та вирішення завдань дослідження.

Новизна та практичне значення одержаних результатів. Наукова новизна результатів дисертації Задвального Т.В. полягає в тому, що автором на модельних клітинних системах вперше показано, що для ліній клітин, отриманих із більш агресивних пухлин, характерна висока експресія маркерів стовбурових клітин CD44 та *NANOG*, а також низький рівень експресії лактоферину. Також вперше показано, що рівень експресії онкогенних мікроРНК, таких, як мікроРНК-21, -199a, -205 та 214, підвищується, в той час, як експресія онкосупресорної мікроРНК-320 знижується.

Важливо відзначити, що на клінічному матеріалі показано, що високий рівень лактоферину визначається в пухлинних клітинах хворих на РПЗ при

відсутності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів, причому також детектується низький рівень ПСА у сироватці крові.

Автором встановлено, що високий рівень експресії гена *NANOG* корелює з регіонарним метастазуванням, а наявність у пухлині клітин з фенотипом стовбурових клітин (висока експресія *CD44* і *NANOG* та низька - *CD24*) прямо корелює із показниками злоякісності РПЗ, такими, як розмір та ступінь диференціювання пухлини, а також рівень ПСА у сироватці крові. Більше того, наявність у пухлині клітин з фенотипом стовбурових клітин та відсутність експресії лактоферину була показана для хворих із короткою безрецидивною виживаністю хворих.

Автором вперше продемонстровано, що підвищені рівні експресії циркулюючих та пухлинних мікроРНК-205 та мікроРНК-214 асоційовані із високим ступенем злоякісності РПЗ, тобто із наявністю метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів, низьким ступенем диференціювання новоутворень та високим рівнем ПСА у сироватці крові хворих.

Слід відзначити, що вищеописані експериментальні дані відкривають широку перспективу для практичного використання отриманих автором результатів. Практична значимість роботи полягає в тому, що автором комплексно обґрунтовано можливість використання показників експресії лактоферину і позаклітинних мікроРНК-205 та мікроРНК-214 у сироватці хворих, а також маркерів стовбурових клітин у пухлинних тканинах для прогнозування агресивності перебігу РПЗ.

Так, автором запропоновано спосіб прогнозування перебігу РПЗ шляхом імуногістохімічного дослідження експресії *CD44* і *CD24* у пухлинних клітинах операційного матеріалу. Це приводить до своєчасного виявлення рецидиву та дає можливість корекції схем лікування, що може збільшити виживаність хворих.

Також розроблено спосіб оцінки ризику розвитку рецидивів у хворих на РПЗ шляхом імуногістохімічного дослідження рівня експресії ЛФ в

пухлинній тканині в комплексі з індексом Глісона, що може підвищити якість прогнозування перебігу РПЗ та підбору індивідуалізованої терапії. Важливо відмітити, що результати дисертаційної роботи вже впроваджено у клінічну практику, про що свідчить інформаційний лист «Спосіб оцінки ризику розвитку рецидивів у хворих на рак передміхурової залози» (Інформац. лист / В.Ф. Чехун, Н.Ю. Лук'янова, Т.В. Задворний // Київ. – МОЗ України. – 2018. - № 353).

Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях.

Основні положення та результати дисертації повністю висвітлені у 29 наукових роботах - 7 статтях, 5 з яких у фахових наукових виданнях, рекомендованих МОН України (у тому числі 2 статті у журналах, що входять до міжнародних наукометричних баз), одному патенті України на корисну модель, одному інформаційному листі про нововведення в системі охорони здоров'я та у 19-и тезах у збірках наукових конференцій та з'їздів, як вітчизняних - «Персоніфікація лікування гормонозалежних пухлин» (Яремче, 2015), "Перспективи діагностики та лікування онкологічної патології" (Київ, 2016), "XIII з'їзд онкологів та радіологів України" (Київ, 2016), «Інтегральні клініко-патогенетичні підходи в діагностиці і терапії раку» (Київ, 2016), Scientific Conference "Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy" (Kyiv, 2017), "Онкологія сьогодні: від діагностики до лікування" (Київ, 2017), XVI міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/bioscience advances» (Київ, 2018), 6 th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation (Yaremche, 2019), «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/bioscience advances» (Київ, 2019), «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (Київ, 2019), «Інноваційні технології скринінгу, діагностики та персоніфікованої терапії раку» (Київ, 2019) так і закордонних конференціях - «IX Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии» (Минск, 2016), 12th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference (Strbske Pleso,

2016); 13th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference "Molecular Determinants of T-Cell Immunity" (Štrbské Pleso, 2018), 5th European Congress of Immunology - ECI 2018 (Amsterdam, 2018), а також на 1 літній школі 10th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (Yerevan, 2018). Основний зміст дисертаційної роботи повністю відображено в опублікованих наукових працях.

Оцінка змісту дисертації та автореферату. Дисертація загальним обсягом 185 сторінок оформлена із дотриманням існуючих правил, побудована за традиційною схемою, складається з Вступу, Огляду літератури, розділу Матеріали та методи досліджень, чотирьох розділів по результатам власних досліджень, розділу Узагальнення та обговорення результатів дослідження та Висновків. Список використаних джерел містить 255 найменувань, із яких 180 латиницею і 75 кирилицею. Текст супроводжується 35 рисунками і 27 таблицями.

У вступі автор ґрунтовно означив актуальність обраної теми, сформулював мету і задачі, розкрив її наукову новизну і практичне значення.

Огляд літератури структурований і складається із 3-х підрозділів, у яких автор проаналізував майже всі вагомні літературні першоджерела за темою дослідження. Так, у першому підрозділі, автором детально проаналізовано патерн експресії генів, які асоційовані із розвитком РПЗ, і беруть участь у процесах онкогенезу, включаючи порушення клітинного циклу або репарації ДНК, запальних реакцій і метаболізму. Також обговорено роль хромосомних делецій (6q, 8p, 10q, 13q, що включають гени *NKX3-1*, *PTEN*, *BRCA2* і *RB1*) і ампліфікацій (хромосоми X, 7, 8q і 9q, які включають гени рецепторів андрогенів та онкогену *MYC*) у розвитку РПЗ. Автор підсумовує дані по експресії і ролі рецептора андрогену і гена *NANOG*, який зазвичай експресується у ембріональних стовбурових клітинах. Автором описано утворення химерних (гібридних, злитих) генів, що виникають у результаті хромосомних перебудов. У другому підрозділі обговорено роль епігенетичних змін у розвитку РПЗ, таких, як метилювання промоторної

області генів, зміни експресії у мікро РНК, тощо. Також підсумовано літературні дані щодо епігенетичної складової у патогенезі та формуванні ступеня злоякісності РПЗ. У третьому підрозділі детально описано протеомні маркери, які асоційовані з агресивністю перебігу РПЗ, а саме ПСА, калікреїн 2 (hK2), рецептор андрогена, поверхневі маркери стовбуровості клітин CD24 і CD44, маркери проліферації клітин PCNA, Ki67, тощо.

В цілому, цьому розділі було проаналізовано майже всі вагомі наукові джерела за останніх 5 – 10 років. Огляд літератури змістовний, логічно побудований, аргументовано викладений.

У другому розділі **«Матеріали та методи досліджень»** автор детально описав клінічні парні зразки сироватки периферичної крові і пухлинної тканини 113 хворих на РПЗ та ретроспективні зразки пухлинної тканини 120 хворих на РПЗ, а також всі застосовані методи та оцінку результатів дослідження, використаних для експериментальних досліджень клінічного матеріалу та культур клітин. Так, детально описано використання сучасних методів молекулярної біології, експериментальної онкології та клітинної біології, за допомогою яких комплексно обґрунтовано можливість використання показників експресії лактоферину і позаклітинних мікроРНК-205 та мікроРНК-214 у сироватці хворих, а також маркерів стовбурових клітин у пухлинних тканинах для прогнозування агресивності перебігу РПЗ. Всі дані і клінічні характеристики хворі ретельно проаналізовано детально описаними методами математичної статистики.

Загалом, алгоритм дослідження є вдалим та цілком виправдовує поставлену мету.

У третьому розділі **«Фенотипові та молекулярно-біологічні ознаки клітинних ліній РПЗ різного ступеня злоякісності»**, який складається із чотирьох підрозділів, детально проаналізовано цитоморфологічні, фенотипові та молекулярно-біологічні характеристики клітинних ліній РПЗ людини LNCaP і DU-145, а також вивчено патерн експресії онкогенних та онкосупресорних мікроРНК. Так, в клітинах лінії DU-145, що

характеризується високим ступенем злоякісності, детектували нижчий рівень експресії N-кадгерину і онкосупресорної мікроРНК-320, і вищий - CD44 і онкогенних мікроРНК-214, -21, -199a та 205.

Далі, у четвертому розділі **«Зв'язок експресії лактоферина з клініко-патологічними особливостями»**, який складається із двох підрозділів, автором проаналізовано топологію експресії лактоферину у пухлинній тканині хворих на РПЗ та проведено кількісну оцінку його експресії. Показано, що рівень експресії лактоферина знижується у пухлинних клітинах у порівнянні з клітинами умовно нормальної тканини. В результаті кореляційного аналізу автор показав, що рівень експресії лактоферину у тканині РПЗ обернено корелює з такими клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу, як стадія захворювання, розмір пухлини, наявність метастазів в регіонарних лімфатичних вузлах та рівень ПСА в сироватці крові хворих.

У п'ятому розділі **«Оцінка клінічного значення наявності маркерів ПСК та рівня мРНК *NANOG* у пухлинній тканині для прогнозування агресивності перебігу РПЗ»**, який складається із двох підрозділів, показано, що експресія маркера стовбурових клітин CD44 визначалась за наявності високого доопераційного рівня ПСА в сироватці крові, у пацієнтів з РПЗ IV стадії, у пухлинах з високим індексом Глісона. Найвищі показники експресії гена *NANOG* виявляли у хворих з метастатичним РПЗ, з високим індексом Глісона (більшим, ніж 7) та високим доопераційним рівнем ПСА. Тобто, наявність у пухлині клітин із фенотипом стовбурових клітин та високий рівень мРНК *NANOG* асоціюється з несприятливим перебігом і високим ступенем злоякісності РПЗ.

У шостому розділі **«Особливості експресії пухлинних та циркулюючих мікроРНК-205 та -214, асоційованих зі ступенем злоякісності РПЗ»** дисертантом було встановлено, що розвиток злоякісних новоутворень у передміхуровій залозі супроводжується зміною рівнів експресії онкогенних мікроРНК-205 та -214 як на рівні пухлини, так і

організму. Так, було показано, що рівень експресії циркулюючих та пухлинних мікроРНК-205 та мікроРНК-214 підвищується при РПЗ та прямо корелює з такими показниками злоякісності, як стадія, наявність метастазів, індекс Глісона та рівень ПСА у сироватці крові.

В цьому розділі «Узагальнення та обговорення результатів дослідження» дисертаційної роботи проведено аналіз отриманих результатів. Автор, інтегруючи результати власних досліджень, зводить їх у єдину систему, зіставляє із даними літератури, а також висловлює власні міркування з приводу перспективного персоніфікованого лікування хворих на РПЗ. Обговорюються наявні методи лікування, а також, на основі власного комплексного дослідження молекулярно-біологічних характеристик РПЗ в системах *in vitro* та *ex vivo* запропоновано власний алгоритм прогнозування перебігу захворювання на РПЗ, із урахуванням ступіні злоякісності новоутворення, який обумовлений його молекулярними характеристиками. У цьому розділі автор надає можливість у цілому охопити масштабну наукову роботу, простежити за умотивованою послідовністю реалізованих дослідницьких кроків, усвідомити основні положення, їх інтерпретацію та з'ясувати зв'язок з наступними висновками, які сформульовано в 9 пунктах, які повністю відповідають меті, задачам та результатам проведеного дослідження. Вірогідність одержаних результатів підтверджена їх адекватною та ретельною статистичною обробкою.

В авторефераті з оптимальною повнотою відображено зміст усіх розділів дисертації, її наукові положення і висновки, а його зміст беззаперечно відповідає змісту дисертації.

В дисертації мають місце окремі орфографічні та стилістичні помилки, які, втім, не перешкоджають адекватному сприйняттю результатів роботи, не впливають на загальну високу оцінку дисертаційної роботи у розв'язанні важливого наукового завдання щодо виявлення молекулярно-генетичних та епігенетичних біомаркерів РПЗ людини, асоційованих із агресивністю перебігу пухлинного процесу.

Втім, для з'ясування можливості застосування результатів дослідження для обґрунтування розробки панелі нових молекулярно-генетичних та епігенетичних біомаркерів РПЗ людини, асоційованих із агресивністю перебігу пухлинного процесу, виникло кілька запитань:

1. Згідно вашого алгоритму, наведеного на рис. 7.1, ви не плануєте брати до уваги такі клінічні показники, як рівень ПСА у сироватці крові, експресію Ki67 та/або PCNA у пухлинній тканині? Чи у вашу панель маркерів будуть входити ці або інші відомі фактори та/або гени?

2. Чим ви керувались при виборі онкогенних та онкосупресорних мікроРНК? Мається на увазі, чому були вибрані саме ці мікроРНК для вивчення при РПЗ?

3. Стосовно біоінформатичного аналізу за допомогою алгоритму STRING. Чи є дані літератури, де показано, що рецептор андрогену (AR) може зв'язуватись із промотором гена *NANOG* та активувати його транскрипцію? Чи показана фізична взаємодія між фактором транскрипції *NANOG*, який в основному локалізується у ядрі, і з глікопротеїном CD44?

Таким чином, дисертація Задворного Т.В. є закінченим науковим дослідженням, в якому автором комплексно обґрунтовано можливість використання показників експресії лактоферину і позаклітинних мікроРНК-205 та мікроРНК-214 у сироватці хворих, а також маркерів стовбурових клітин у пухлинних тканинах для прогнозування агресивності перебігу РПЗ.

Висновок

Дисертація Задворного Тараса Володимировича «Молекулярно-біологічні ознаки, асоційовані із ступенем злоякісності раку передміхурової залози» є закінченим, самостійно виконаним науковим дослідженням, яке присвячене дослідженню факторів, що впливають на агресивність РПЗ та створенню експериментально обґрунтованої предиктивної панелі маркерів для прогнозу перебігу хвороби та розробки нових алгоритмів

персоналізованої терапії. Автором комплексно обґрунтовано можливість використання показників експресії лактоферину і позаклітинних мікроРНК-205 та мікроРНК-214 у сироватці хворих, а також маркерів стовбурових клітин у пухлинних тканинах для прогнозування агресивності перебігу РПЗ.

Дисертація відповідає вимогам п. 11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 (зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 14.01.07 – онкологія.

Офіційний опонент

Завідувач відділу молекулярної
онкогенетики Інституту молекулярної
біології і генетики НАН України
доктор біологічних наук, професор



В.І. Кашуба

Підпис: *Кашуба В.І.*
посвідчується
Зав. Кабін. МЗ-Молодцова