

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

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

Актуальність роботи.

Протягом останнього десятиліття як в Україні, так і у світі зафіксоване зростання захворюваності на рак передміхурової залози (РПЗ). Основними причинами незадовільних результатів лікування хворих на РПЗ є здатність до метастазування, хіміо- і гормонорезистентність, а також відсутність досконалих алгоритмів прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу. На сьогодні остаточно доведено, що варіабельність РПЗ за молекулярно-біологічними і клінічними даними, а також за відповіддю на проведену терапію пов'язані з біологічними особливостями новоутворень. Наведені дані переконливо демонструють необхідність пошуку і впровадження в клінічну практику нових, більш чутливих, специфічних і ефективних діагностичних та предиктивних маркерів РПЗ. Враховуючи зазначене, актуальність дисертаційної роботи не викликає сумнівів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами

Дисертаційна робота виконана у лабораторії механізмів медикаментозної резистентності відділу моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України відповідно до плану науково-дослідних робіт за темами: «Молекулярна епідеміологія металовмісних білків у взаємовідносинах пухлини та організму» (2012-2016 рр.; № 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 гормонзалежних пухлин» (2017-2021 рр., № держреєстрації 0117U002034), «Роль епітеліально-мезенхімального

переходу у механізмах формування медикаментозної резистентності клітин раку передміхурової залози людини» (2017-2018 рр., № державної реєстрації 0117U006124).

Наукова новизна одержаних результатів

На підставі комплексного дослідження в системі *in vitro* та *ex vivo* на клінічному матеріалі автором наведено нове рішення актуальної задачі онкології - ідентифіковано молекулярно-біологічні ознаки, асоційовані зі ступенем злоякості РПЗ та поглиблено знання про міжпухлинну гетерогенність цих новоутворень, яка проявляється у неоднаковій експресії молекулярно-біологічних маркерів, що відображають різні характеристики пухлинного росту. Комплекс таких змін та їх варіабельність і обумовлюють індивідуальний клінічний перебіг пухлинного процесу.

Експериментальними дослідженнями в системі *in vitro* встановлено, що клітини РПЗ людини ліній LNCaP та DU-145 мають різний потенціал злоякості за показниками інвазивної та проліферативної активності, а також маркерів адгезії. Встановлено, що визначальною ознакою клітин РПЗ високого ступеня злоякості лінії DU-145 є наявність клітин з експресією маркерів пухлинних стовбурових клітин (ПСК) та низький рівень експресії лактоферину (ЛФ).

Вперше в системі *in vitro* ідентифіковано профіль експресії мікроРНК у клітинах ліній РПЗ людини різного ступеня злоякості. Встановлено, що у лінії DU-145 високого ступеня злоякості спостерігається підвищення рівня експресії онкогенних мікроРНК-21, -199a, -205 та зниження рівня онкосупресорної мікроРНК-320 порівняно з клітинами РПЗ низького ступеня злоякості лінії LNCaP.

На клінічному матеріалі доведено та підтверджено власні експериментальні дані відносно зв'язку експресії ЛФ і маркерів ПСК зі ступенем злоякості РПЗ. Доведена можливість використання показників експресії ЛФ та маркерів ПСК у пухлинній тканині в якості прогностичного фактора виживаності хворих на РПЗ: безрецидивна 2-річна виживаність хворих на РПЗ є значно меншою за

наявності експресії маркерів ПСК та відсутності експресії ЛФ.

Вперше встановлено, що високий ступінь злоякісності РПЗ асоціюється зі збільшенням рівня експресії циркулюючих та пухлинних мікроРНК-205 та мікроРНК-214, що беруть участь у регуляції експресії ЛФ та маркерів ПСК. Показано, що агресивність РПЗ ґрунтується на змінах комплексу молекулярно-біологічних маркерів - наявності ПСК, нижчим рівнем експресії ЛФ у пухлинних клітинах та високими показниками мікроРНК-205 та мікроРНК-214 на рівні пухлини та організму.

Практичне значення одержаних результатів

На підставі комплексного дослідження проведеного в системі *in vitro* та *ex vivo* на клінічному матеріалі обґрунтовано можливість використання показників експресії ЛФ, мікроРНК-205, мікроРНК-214 та маркерів ПСК для прогнозування агресивності перебігу РПЗ. Одержані результати мають суттєве практичне значення і можуть бути використані у роботі онкоурологічних відділень та патоморфологічних лабораторій онкологічних закладів України, з метою прогнозування перебігу РПЗ та оцінки ризику розвитку рецидивів у хворих на РПЗ шляхом імуногістохімічного дослідження показників експресії маркерів ПСК ($CD44^{+high}CD24^{-low}$) та рівня експресії ЛФ в пухлинній тканині хворих на РПЗ. Прикладне значення результатів дисертаційної роботи підтверджене інформаційним листом «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. - № 2018-353). Також, на основі проведених досліджень було отримано патент України на корисну модель № 120395 "Спосіб прогнозування ризику виникнення рецидивів у хворих на рак передміхурової залози".

Отримані фундаментальні дані розширюють існуючі уявлення про гетерогенність РПЗ і можуть бути представлені у матеріалах лекцій лікарям на курсах підвищення кваліфікації з онкоурології, студентам біологічних факультетів та медичних університетів.

Все наведене дає підстави вважати дану дисертаційну роботу важливим і своєчасним науковим дослідженням, результати якої мають як наукову новизну, так і перспективу до практичного застосування в онкологічній практиці.

Особистий внесок здобувача

Дисертантом спільно з науковим керівником сформовано мету і завдання, розроблено дизайн та план дослідження. Здобувачем особисто виконано експериментальну частину роботи, зокрема дослідження в системі *in vitro* та *ex vivo*, проведено визначення молекулярно-генетичних та епігенетичних біомаркерів РПЗ людини, асоційованих із агресивністю перебігу пухлинного процесу. Автором здійснено аналіз, та проведено узагальнення отриманих результатів, сформульовано висновки дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації

Основні положення виконаного і представленого дисертаційного дослідження представлені та обговорені на численних закордонних і вітчизняних наукових форумах: «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), «IX Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии» (Минск, 2016), 12th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference (Strbske Pleso, 2016), Scientific Conference "Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy" (Kyiv, 2017), «Онкологія сьогодні: від діагностики до лікування» (Київ, 2017), 13th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference "Molecular Determinants of T-Cell Immunity" (Štrbské Pleso, 2018), 5th European Congress of Immunology - ECI 2018 (Amsterdam, 2018), 1 літній школі 10th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (Yerevan, 2018), XVI міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / bioscience advances» (Київ, 2018), 6th 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 персоналізованої терапії раку» (Київ, 2019).

**Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень,
висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації**

Дисертаційна робота Задворного Т.В. є закінченим науковим дослідженням, яке виконано на високому методичному рівні. Високий рівень обґрунтованості наукових положень та висновків сформульованих у дисертації, забезпечені професійним вирішенням автором низки наукових завдань, що сприяло реалізації поставленої мети дослідження, та адекватністю структурно-логічної схеми дослідження визначеній меті: кожен наступний розділ чи підрозділ органічно пов'язаний з попереднім і доповнює його.

Автором дисертації чітко окреслені і логічно побудовані мета та завдання дослідження, обґрунтовано теоретичні та методичні підходи щодо їх виконання, розроблено і апробовано відповідні пропозиції.

Робота виконана на експериментальному матеріалі (клітини 2 ліній РПЗ людини) та клінічному матеріалі 233 хворих на РМЗ II-IV стадії відповідно до основних біоетичних норм та правил міжнародних і вітчизняних положень та принципів, які використовують у наукових цілях.

Дисертантом у роботі використано культуральні, морфологічні, імуноцитото- та імуногістохімічні, молекулярно-біологічні, біоінформатичні та статистичні методи дослідження. Для оцінки достовірності одержані експериментальні дані оброблено методами варіаційної статистики із використанням t-критерію Стьюдента або U-критерію Манн-Уїтні, коефіцієнту кореляції Спірмена, аналізу за методами Каплана-Мейєра та методу Хі-квадрат. Об'єм проведених досліджень, їх інформативність дозволили досягти високого ступеня обґрунтованості наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.

Результати роботи чітко характеризують молекулярно-біологічні ознаки, асоційовані зі ступенем злоякісності РПЗ. Автором проведено детальне обговорення положень дисертації з використанням сучасних літературних відомостей. Отже, наукові положення і висновки дисертаційної роботи є обґрунтованими.

Повнота викладу результатів роботи у наукових публікаціях

Основні результати дисертації опубліковано у 29 наукових роботах, з яких 1 глава монографії, 7 статей, 5 з яких у фахових наукових виданнях, рекомендованих МОН України (у тому числі 2 статті у журналах, що входять до міжнародних наукометричних баз), 1 патент України на корисну модель, 1 інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я та 19 тез у збірках наукових конференцій та з'їздів.

Публікації та автореферат у повній мірі відображають зміст дисертаційної роботи. Аналіз публікацій автора дозволяє зробити висновок про повноту викладу основних наукових положень дисертаційного дослідження у науковій літературі. Кількість публікацій є достатньою для висвітлення результатів дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук відповідно до вимог.

Структура та загальна характеристика роботи

Дисертація складається з таких розділів: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, 4 розділів власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки та список використаних джерел (255 посилань). Роботу викладено на 185 сторінках, проілюстровано 35 рисунками та 27 таблицями.

Структура та загальна характеристика роботи

Дисертація складається з таких розділів: анотація, вступ, огляд літератури, матеріалів і методів досліджень, 4 розділів результатів власних досліджень, узагальнення та обговорення результатів дослідження, висновків та списку

використаних джерел, що налічує 255 посилань. Роботу викладено на 185 сторінках, проілюстровано 35 рисунками та 27 таблицями.

У «Вступі» аргументовано актуальність роботи, сформульовано мету і наукові завдання, висвітлено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, особистий внесок дисертанта, апробацію результатів.

В огляді літератури Задворний Т.В. виділив три підрозділи, де охарактеризував сучасний стан досліджуваної проблеми, акцентувавши увагу на ролі генетичної та епігенетичної компоненти у розвитку та прогресії РПЗ, а також проблемі використання у клініці уже відомих протеомних марків перебігу РПЗ.

У розділі 2 «Матеріали і методи досліджень» охарактеризовано експериментальні моделі, описано методи дослідження в системах *in vitro* та *ex vivo* та описано методи досліджень, використані для вирішення поставлених завдань.

Експериментальна частина дисертаційної роботи побудована за логічною схемою, виконана на високому науково-методичному рівні з використанням сучасного обладнання. Результати власних досліджень представлені у чотирьох розділах (3-6) дисертаційної роботи.

Розділ 3 «Фенотипові та молекулярно-біологічні ознаки клітинних ліній РПЗ різного ступеня злоякісності» присвячений дослідженню молекулярно-біологічних ознак клітин ліній РПЗ людини різного ступеня злоякісності в системі *in vitro*. Автором показано, що високі показники експресії Ki-67 та CD44 на тлі високого ступеня інвазії, які визначено у клітинах лінії РПЗ людини DU-145, свідчить про високий потенціал злоякісності цих клітин порівняно з клітинами лінії LNCaP. Виявлено, що ступінь злоякісності у клітинах ліній РПЗ людини асоціюється з рівнем експресії маркерів ПСК та ЛФ. Встановлено, що в клітинах РПЗ людини високого ступеня злоякісності лінії DU-145 спостерігається вища експресія онкогенних мікроРНК-21, -199a, -205, та -214, а також нижчий рівень експресії онкосупресорної мікроРНК-320a порівняно з клітинами низького ступеня злоякісності лінії LNCaP.

Розділ 4 «Зв'язок експресії ЛФ з клініко-патологічними особливостями РПЗ та показниками безрецидивної виживаності хворих» присвячений вивченню

зв'язку експресії ЛФ зі ступенем розповсюдженості РПЗ та показниками безрецидивної виживаності хворих. Автором охарактеризовано топологію експресії ЛФ у тканині РПЗ та встановлено особливості кількісних характеристик його експресії. Визначено, що клітини РПЗ характеризуються низьким рівнем цього протеїну, який визначався у 63,3% досліджених випадків. Продемонстровано, що рівень експресії ЛФ у тканині РПЗ корелює з такими клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу як стадія захворювання, розмір пухлини, наявність метастазів в регіонарних лімфатичних вузлах та рівень простатоспецифічного антигену (ПСА) в сироватці крові хворих.

Розділ 5 «Оцінка клінічного значення наявності маркерів ПСК та рівня мРНК NANOG у пухлинній тканині для прогнозування агресивності перебігу РПЗ» присвячений дослідженню клінічного значення ПСК ($CD44^{+}CD24^{-low}$ та мРНК NANOG) у хворих на РПЗ. Отримані дані свідчать, що наявність клітин із фенотипом ПСК та рівень мРНК NANOG у пухлинній тканині асоціюється з несприятливим перебігом РПЗ, який за клініко-патологічними показниками відрізняється високим ступенем злоякісності. Здобувачем встановлено, що загальна 2-річна безрецидивна виживаність хворих на РПЗ є достовірно меншою за наявності експресії маркерів ПСК та відсутності експресії ЛФ у пухлинних клітинах

Розділ 6 «Особливості експресії пухлинних та циркулюючих мікроРНК-205 та -214, асоційованих зі ступенем злоякісності РПЗ» присвячений вивченню особливостей експресії мікроРНК-214 та -205 в пухлинній тканині та сироватці крові хворих на РПЗ. Доведено існування зв'язку між показниками експресії досліджених мікроРНК зі ступенем злоякісності РПЗ та такими клініко-патологічними показниками як стадія пухлинного, наявність метастазів у регіонарні лімфатичні вузли, сума балів за Глісоном та передопераційний рівень ПСА в сироватці крові.

У розділі 7 «Узагальнення та обговорення результатів дослідження» дисертантом проведено аналіз і узагальнення власних результатів дослідження з урахуванням літературних даних. На основі отриманих даних у результаті комплексного дослідження у системі *in vitro* та *ex vivo* на клінічному матеріалі

ідентифіковано молекулярно-біологічні та епігенетичні маркери, асоційовані зі ступенем злоякісності РПЗ. Обґрунтовано можливість використання показників експресії ЛФ, маркерів ПСК та пухлино-асоційованих мікроРНК-205 та -214 для більш детальної характеристики пухлинного процесу у передміхуровій залозі та в якості об'єктивних критеріїв для прогнозування агресивності перебігу РПЗ. Зроблені автором висновки та положення, що виносяться на захист, обґрунтовані, логічно випливають із отриманих даних і відповідають поставленим меті і задачам.

Автореферат дисертації повністю відповідає її змісту, адекватно відображає зміст усіх розділів дисертації і висновків.

Зауваження до дисертації

У тексті дисертації зустрічаються невдалі вислови, стилістичні вирази, граматичні, синтаксичні та технічні помилки.

У огляді літератури занадто велику увагу приділено значенню рівня ПСА в сироватці крові хворих на РПЗ для діагностики та прогнозування перебігу пухлинного процесу, що і так є загальновідомим.

У розділі 4 великий масив даних представлений у вигляді гістограм, що займають значний об'єм, але мають обмежену інформативність. Вважаю, що деякі результати, наведені у цьому розділі, варто було представити у вигляді таблиці.

У розділі «Узагальнення та обговорення результатів дослідження» варто було більше уваги приділити аналізу даних, щодо зв'язку маркерів ПСК з молекулярним профілем РПЗ.

Запитання до дисертанта

У роботі ви значну увагу приділяєте дослідженню експресії ЛФ у пухлинній тканині хворих на РПЗ проте відсутня інформація про його рівень в сироватці крові. Чи проводили ви дослідження у цьому напрямку та що відомо про його показники на рівні організму у хворих з цією онкопатологією за даними літератури?

Які з досліджених Вами молекулярно-генетичних та епігенетичних маркерів можуть бути використані для визначення чутливості до хіміотерапії і моніторингу її ефективності при лікуванні хворих на РПЗ?

Ваша робота, окрім фундаментального має також і прикладний аспект, чи плануєте ви далі проводити дослідження і якщо так, то в якому напрямку?

В той же час, слід відмітити, що наведені зауваження не мають принципового характеру, не знижують високого наукового рівня дисертації, а спрямовані тільки на її доповнення та вдосконалення.

Висновок

За своєю актуальністю, науковою новизною, методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, теоретичною і практичною значимістю отриманих результатів, логічністю та обґрунтованістю висновків представлена на захист дисертаційна робота **Задворного Тараса Володимировича «Молекулярно-біологічні ознаки, асоційовані зі ступенем злоякісності раку передміхурової залози»** 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

старший науковий співробітник
науково-дослідного відділення
хіміотерапії солідних пухлин
Національного інституту раку МОЗ України
кандидат медичних наук,
старший науковий співробітник

С.А. Лялькін

