

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу Іномістової Марії Володимирівни
"ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ ЗАЛУЧЕНИХ В РЕГУЛЯЦІЮ ШЛЯХУ p53 ПРИ
НЕЙРОБЛАСТОМІ",

представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

Актуальність теми дисертації.

Нейробластома відноситься до найбільш поширених пухлинних захворювань дитячого віку. Перебіг хвороби є досить гетерогенним, від спонтанної регресії до агресивного, з масивним метастазуванням. Тому пошук нових прогностичних та стратифікаційних генетичних маркерів при нейробластомі є актуальною проблемою дитячої онкології. Дисертант зосередив увагу на визначенні порушень в системі p53-опосередкованого сигнального шляху як одного з найбільш часто задіяних при злоякісній трансформації. Це обумовило *мету* дисертаційної роботи - дослідити експресію генів, що залучені в регуляцію функціонування шляху p53 при нейробластомі.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій з їх критичною оцінкою порівняно з відомими рішеннями

Дисертант використав при виконанні роботи значну кількість сучасних методів дослідження в галузі генетики, переважно молекулярно-генетичних. Дослідження виконані на високому професійному рівні, отримані результати оброблені сучасними статистичного аналізу, обговорені у співставленні з існуючими літературними даними. Це свідчить на користь достовірності теоретичних та експериментальних результатів і обґрунтованості наукових висновків.

Достовірність і новизна отриманих результатів

В роботі проведено обстеження значної кількості пацієнтів на нейробластомі – 358 хворих. Вперше досліджено характер експресії в пухлинній тканині при нейробластомі гена *TP53*, його антагоніста гена *MDM2*, та гена глутатіон-S-трансферази *P1*, який є транскрипційною мішенню для *TP53*. За допомогою регресійного аналізу встановлені граничні показники експресії генів, що були асоційовані з перебігом захворювання. Встановлено, що рівень експресії гена *MDM2* в зразках первинних пухлин, вищий за граничний показник, підвищує ризик розвитку рецидивів захворювання. Навпаки, пацієнти з експресії гена *TP53* вище за граничний показник та рівнем експресії *MDM2* нижчим за граничний показник мають сприятливий прогноз захворювання. Вперше в

Україні досліджено розподіл поліморфних варіантів A313G гена глутатіон-S-трансферази у хворих на нейробластоми та встановлено, що прогноз захворювання у гомозигот за поліморфною алеллю гірший, ніж у носіїв інших генотипів. Вперше встановлено критерії прогнозування перебігу захворювання при НБ, що включають визначення в пухлинній тканині пацієнтів експресії низки мікроРНК (мікроРНК-34а, мікроРНК-137, мікроРНК-380-5р, мікроРНК-885-5р).

Висновки та наукові положення, наведені в дисертаційній роботі, обґрунтовані результатами експериментів.

Методи, обрані для виконання завдань дисертаційної роботи – адекватні та сучасні, завдяки чому результати досліджень є достовірними.

Якість використаних для дослідження методів, репрезентативність отриманих результатів.

Для досягнення мети і реалізації поставлених завдань дослідження використані сучасні методи молекулярної генетики та статистичного аналізу, проведено значну кількість досліджень. Обрані мети відповідають меті дослідження. Результати ретельно оброблені статистичними методами і є репрезентативними.

Рекомендації з подальшого використання результатів роботи та доцільність продовження і розвитку відповідних досліджень.

Отримані дисертантом нові дані є, перш за все, важливими для практичного використання при оцінці прогнозу перебігу захворювання у конкретного хворого. Вони дозволяють стратифікувати хворих на групи низького та високого ризику щодо розвитку рецидивів захворювання, імовірності розвитку резистентності до хіміотерапевтичних засобів. Крім того, виявлені взаємозалежності між експресією окремих генів p53-асоційованого шляху відкривають нові можливості для пошуку нових механізмів контролю транскрипційної активності p53 та впливу на них. Дослідження в цьому напрямку доцільно продовжувати.

Оцінка наукової та літературної якості складу матеріалу і стилю дисертації та автореферату

Дисертаційна робота побудована за стандартною схемою, викладена на 156 сторінках, містить 25 рисунків, 15 таблиць. Список використаної літератури охоплює 278 найменувань, переважна яких – сучасні зарубіжні роботи (275 найменувань).

Огляд літератури розпочато з історичних відомостей про відкриття нейробластоми як пухлини дитячого віку, надана її клінічна характеристика, методи діагностики захворювання, клінічні показники стадіювання та визначення прогнозу. Особливу увагу

приділено молекулярно-генетичним маркерам захворювання (хромосомним перебудовам, ампліфікації гена *MYCN*), які є важливими показниками прогнозу.

Наведено сучасні дані літератури щодо функції білка p53 та його регуляції під впливом генів *MYCN* і *MDM2*, комплексу мікроРНК. Проаналізовано зв'язок глутатіон-S-трансферази з p53-опосередкованим сигнальним шляхом.

Як підсумок огляду літератури, дисертант робить висновок про доцільність ідентифікації нових генів та їхніх регуляторів, сигнальних шляхів, що відповідають за злоякісну трансформацію клітин при нейробластомі для визначення груп ризику пацієнтів на молекулярній основі.

Розділ «Матеріал і методи дослідження» написаний ретельно, за стилем написання стає очевидним володіння дисертантом сучасними і складними методами, що використовувались у роботі. В першій таблиці цього розділу вказана загальна кількість пацієнтів, які були обстежені тими чи іншими методами.

В першому підрозділі «Власних досліджень» узагальнені результати визначення ампліфікації гена *MYCN*. В зразках пухлинної тканини 75 хворих (22,5 %) було встановлено наявність більше ніж 9 копій гена на клітину, що свідчить про несприятливий перебіг захворювання, визначає групу високого ризику та доцільність призначення більш агресивної тактики лікування. Делеції 17p хромосоми, де локалізований ген *TP53*, не виявлено.

За допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі визначено рівень експресії гена *MDM2* та встановлено, що він був достовірно вищим у пацієнтів з розповсюдженими стадіями захворювання та ампліфікацією гена *MYCN*. Методом регресійного аналізу визначено граничний рівень експресії гена *MDM2*, який становив 0,0822 у.о. Стратифікація хворих за цим критерієм виявилась корисною для прогнозу тривалості безрецидивного періоду.

Інтерес представляють дані щодо спільного визначення рівня експресії генів *TP53* і *MDM2*, яке також мало високу прогностичну цінність.

Відповідно до результатів регресійного аналізу було визначено оптимальний критерій для розподілу пацієнтів відносно рівня експресії гена глутатіон-S-трансферази, що становить $>0,7715$ у.о., і визначено, що його можна використовувати в якості незалежного маркера прогнозування перебігу нейробластоми та стратифікації хворих за групами ризику. У порівнянні з контрольною групою 158 осіб без онкологічної патології визначено розподіл генотипів за поліморфізмом гена глутатіон-S-трансферази (A313G) методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі з використанням TaqMan зондів. Розбіжності між хворими та контролем були статистично невірні, проте носії окремих

генотипів розрізнялись за тривалістю безрецидивного виживання, тому дисертант робить слушний висновок про можливість визначення цього поліморфізму як маркера прогнозу перебігу нейробластоми.

Окремий розділ присвячено аналізу експресії мікроРНК. Встановлено, що зміни їх експресії можуть служити додатковим маркером для оптимізації стратифікації пацієнтів за групами ризику. Останній фрагмент «Власних досліджень» містить результати факторного та кластерного аналізу асоціацій генів залучених в регуляцію шляху p53 при нейробластомі. Встановлено, що експресія мікроРНК і експресія генів *MDM2*, *GSTP1* та ампліфікація гена *MYCN* згідно з цією вибіркою можуть бути незалежними один від одного, але обидва дають внесок в експресію *TP53*.

Відповідність автореферату змісту дисертації та повнота опублікування результатів досліджень по темі

Автореферат повністю відображає зміст дисертаційної роботи. За темою дисертації опубліковано 39 друкованих праць, зокрема 8 статей у фахових наукових виданнях та тези 31 доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях, конгресах та семінарах.

Окремі дискусійні питання і зауваження

Дисертаційна робота отримала загалом позитивну оцінку, проте є деякі зауваження стосовно змісту роботи:

1. На погляд опонента, мета роботи «дослідити експресію генів, що залучені в регуляцію функціонування шляху p53 при нейробластомі», сформульована невдало. Визначення експресії генів це спосіб для вирішення наукового завдання, яке доцільно було б сформулювати як: «проаналізувати особливості функціонування p53-опосередкованих сигнальних шляхів в клітинах нейробластом на основі дослідження експресії генів, залучених в його регуляцію, та їх значення для розвитку і прогресування захворювання»

2. В огляді літератури занадто багато уваги приділено опису клініко-лабораторних показників, екскурсу в історію вивчення клініки нейробластоми, що не є безпосередньо пов'язаним з метою дисертаційної роботи.

3. Зазвичай в літературі використовують словосполучення «експресія гена», а не «експресія мРНК гена»

4. Переклад ген «домашнього господарства» - не кращий переклад. Доцільно використовувати термін «контрольний», або «референтний» ген.

5. За допомогою регресійного аналізу визначені граничні рівні експресії генів, однак перевищення цього рівня не є показником високої експресії або гіперекспресії. В роботі не було проведено дослідження контрольних клітин з дійсно гіперекспресією генів

TP53 та MDM2, а рівень експресії вищий за 0,08 у.о. навряд чи можна вважати гіперекспресією. Краще вживати термін «експресія вища за граничний показник»

6. Дисертант проводив Кокс-регресійний аналіз для визначення прогностичного значення експресії окремих генів. Не наведений показник співвідношення ризиків, тільки вірогідність та 95% довірчий інтервал. Не зрозуміло, був проведений уніваріантний чи мультіваріантний аналіз. Якщо проводився останній, то не вказано, які саме показники додатково були включені в аналіз, відсутні показники співвідношення ризиків для кожного з маркерів прогнозу.

Запитання до дисертанта:

1. В якій кількості обстежених Вами хворих можна говорити про порушення функціональності p53?

2. Як визначений Вами рівень експресії мікроРНК в пухлинних клітинах співвідноситься до рівня експресії у нормальних тканинах?

3. Яку частину дисперсії пояснювали виділені Вами фактори при проведенні факторного аналізу і які були статистично значущі навантаження на фактори з боку змінних, які враховували при проведенні аналізу?

Зазначені зауваження не зменшують цінності роботи і не впливають на загальну позитивну оцінку.

Висновок.

1. Дисертація ІНОМІСТОВОЇ Марії Володимирівни "Експресія генів залучених в регуляцію шляху p53 при нейробластомі" є завершеною роботою в актуальній області пошуку нових генетичних маркерів прогнозу перебігу нейробластоми та розкриття механізмів функціонування p53-залежного шляху прим цьому захворюванні.

2. Дисертаційна робота за своєю актуальністю, об'ємом, науково-практичною значимістю, новизною отриманих результатів та всебічним аналізом відповідає вимогам постанови Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор ІНОМІСТОВА Марія Володимирівна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Офіційний опонент, доктор медичних наук,
професор, головний науковий співробітник
лабораторії молекулярної біології відділу
клінічної імунології Національного наукового
центру радіаційної медицини НАМН України

