Отзыв

официального рецензента на диссертационную работу
Айсиной Даны Евгеньевны
тему: **«Взаимодействие miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы»**,
представленную к защите на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности «6D070100 – Биотехнология»

1. Актуальность темы исследования и её связь с общенаучными и общегосударственными программами

Актуальность выбора темы диссертационного исследования не вызывает сомнения по ряду причин. Во-первых, онкологические заболевания находятся в первой тройке причин смертности во всём мире. Во-вторых, несмотря на некоторые успехи в диагностике и прогресс в терапии рака, проблема далека от разрешения. В-третьих, мультифакторность и многостадийность онкогенеза не позволяет выработать какие-либо общие методологические подходы в решении проблемы рака. В-четвёртых, зачастую длительный субклинический характер протекания болезни в значительной степени усложняет раннее выявление этой патологии, и как следствие, ухудшается прогноз исхода терапии. В-пятых, гетерогенность опухоли, её микроокружение и высокая склонность к развитию лекарственной устойчивости. И, это далеко не вся характеристика рака. Например, эпидемиология рака молочной железы в США и Японии значительно отличается. Для американской популяции (2002 год) уровень заболеваемости на 100 тыс. составляет 446,8 случаев, с пиком 75-79 лет, тогда как среди японок (2001 год) 133,7 случаев в возрасте 45-49 лет (Saika & Sobue, 2009). И таких примеров множество.

Важно отметить, что в мире огромное значение уделяется изучению рака, и по объему сопоставимо, разве что, с инфекционными заболеваниями. Действует международное агентство по исследованию рака, которое в частности представлено в виде интерактивного веб-ресурса (http://gco.iarc.fr/). В нашей стране в рамках Государственной программы развития здравоохранения Республики Казахстан «Денсаулык» на 2016 – 2019 годы выполняются работы в нескольких направлениях. Это укрепление здоровья граждан, повышение эффективности системы здравоохранения и развитие кадрового потенциала. Помимо организационно-профилактической работы, активно проводятся исследования по направлению рака вызываемого вирусом папилломы человека, предстательной железы и молочной железы. По данным КазНИИ онкологии и радиологии, вклад рака молочной железы в общую статистику смертности весьма велико – 8,8%, и уступает лишь раку лёгкого и желудка. Некоторые успехи в снижении смертности от рака молочной железы связаны с ранней диагностикой. Тем не менее, глобальные прогнозы неутешительны. К 2035 году ожидается рост до 24 миллионов больных неопластическими заболеваниями.

Одним из современных подходов в изучении рака молочной железы является исследовании роли miRNA в онкогенезе, метастазировании и развитии лекарственной устойчивости. При связывании miRNA с mRNA соответствующих генов осуществляется регуляция ключевых процессов происходящих в опухолевых клетках: пролиферация, апоптоз, клеточный цикл, миграция и дифференциация. В настоящее время установлена тесная связь между miRNA и раком. Однако, системный анализ регуляции связывания miRNA с mRNA в клинической практике до сих пор отсутствует, хотя его важность очевидна.

Диссертационная работа Айсиной Даны Евгеньевны на тему: «Взаимодействие miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы» выполнена в рамках грантового финансирования проекта по «Разработке тест-систем ранней диагностики сердечно-сосудистых, онкологических и нейродегенеративных заболеваний на основе ассоциаций miRNA и их генов мишеней» № AP05132460 МОН РК.

Вышеизложенное позволяет утверждать, что выбранная тема диссертационного исследования является актуальной.

2. Научные результаты и их обоснованность

Результаты диссертационного исследования получены в соответствии с поставленными целью и задачами, и имеют научное обоснование при помощи компьютерных вычислений, включающих различные типы проверок данных, в том числе нуклеотидных последовательностей, получаемых из таких источников, как COSMIC, miRBase и Genbank. В работе была использована программа MirTarget, которая рассчитывает свободную энергию (ΔG, кДж/моль) связывания miRNA, относительную величину свободной энергии (ΔG/ΔGm, %), положение и схемы потенциальных сайтов связывания. Изучаемые показатели эффекта выражались средней величиной энергии связывания. Достоверность обобщающих результатов подтверждается приведенными экспериментальными данными в работе.

В диссертационной работе представлены следующие научные результаты:

- созданы базы из 6266 miRNA и 602 кандидатных генов рака молочной железы для расчета характеристик взаимодействия miRNA с mRNA генов мишеней;
- созданы выборки кандидатных генов субтипов HER2, luminal A и B, triple-negative рака молочной железы;
- установлены характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов семейства транскрипционных факторов E2F, которые участвуют в регуляции клеточного цикла (E2F1-E2F3) и апоптоза (E2F4-E2F8);
- определены начало и локализация сайтов связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA, вычислены величины свободной энергии взаимодействия miRNA с mRNA, составлены схемы связывания нуклеотидов miRNA с mRNA 31 кандидатных генов субтипа HER2 рака молочной железы;

– обнаружены сайты связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA, предсказана их структурная организация, вычислены величины свободной энергии взаимодействия miRNA с mRNA и составлены схемы связывания нуклеотидов miRNA с mRNA 20 кандидатных генов субтипов luminal A и B рака молочной железы;

– вычислены величины свободной энергии взаимодействия miRNA с mRNA, определены начало и локализация сайтов связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA, составлены схемы связывания нуклеотидов miRNA с mRNA 50 кандидатных генов субтипа triple-negative рака молочной железы;

– установлена локализация сайтов связывания miRNA в mRNA 101 кандидатных генов рака молочной железы. В mRNA 25 генов выявлена организация сайтов связывания miRNA в кластеры, состоящие из сайтов связывания двух и более miRNA. Кластерная организация сайтов связывания приводит к компактизации сайтов связывания и конкуренции между miRNA за связывание в кластере;

– установлены характеристики сайтов связывания пар miRNA-5p и miRNA-3p с mRNA ортологичных генов *FOXF2, PLPPR3, KIAA2026, GLYCTK* и *CCDC42B*. Выявлены ассоциации пар miRNA-5p и miRNA-3p с mRNA генов-мишеней которые предлагаются для разработки методов диагностики рака молочной железы;

– выявленные семь, семь и одиннадцать ассоциаций miRNA и кандидатных генов соответственно субтипов HER2, luminal A и B, triple-negative рака молочной железы рекомендуются для разработки методов диагностики этих субтипов. Полученные результаты тщательно проанализированы и имеют научную обоснованность.

3. Степень обоснованности и достоверности каждого научного результата (научного положения), выводов и заключения соискателя, сформулированных в диссертации

Научные положения, выносимые на защиту, охватывают весь материал работы, и все они имеют теоретическое обоснование и экспериментально подтверждены *in silico*.

Созданы базы данных из 6266 miRNA и 602 генов связанных с раком молочной железы. Характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов субтипов HER2, luminal A и B и triple-negative рака молочной железы тщательно проанализированы и кратко представлена эволюционная оценка их последовательностей с привлечением различных источников.

Представлено обоснование использования генов-кандидатов субтипов HER2, luminal A и B и triple-negative рака молочной железы и проведена оценка связывания miRNA и mRNA выраженная соотношением $\Delta G/\Delta G_m$.

В исследованиях были использованы общедоступные базы данных нуклеотидных последовательностей, что позволяет проверить изучаемые

факты. В выводах, сформулированных в диссертации, отражены результаты исследований, проведенных согласно поставленным задачам.

4. Степень новизны каждого научного результата (положения), вывода соискателя, сформулированных в диссертации

Впервые была подготовлена база данных последовательностей miRNA человека, в результате отобраны гены-кандидаты для разработки скрининговых методов и персонализированной терапии рака молочной железы. Впервые были установлены характеристики сайтов связывания miRNA в mRNA генов, связанных с развитием рака молочной железы. Измеряя свободную энергию связывания, была количественно оценена степень взаимодействия miRNA и mRNA. Установлены, что мишенями для miR-1322 являют гены, которые участвуют в развитии рака молочной железы. Показана филогенетическая консервативность сайтов связывания в mRNA. Впервые показаны различия в сайтах связывания miRNA в mRNA генов других млекопитающих.

Новизна результатов также подтверждается публикациями в международных рецензируемых журналах.

5. Практическая и теоретическая значимость научных результатов

Полученные соискателем в ходе выполнения диссертационной работы результаты могут быть использованы в понимании процессов онкогенеза и развития лекарственной устойчивости, а также в проведении глобального анализа клинических данных по раку. Тщательно собранная и систематизированная в виде базы данных, проанализированная информация о взаимодействии miRNA и mRNA генов играющих роль в канцерогенезе, позволяет понять значение этих генов в патогенезе заболевания. Сделан один из важнейших выводов о допустимости использования линейных лабораторных животных, но не дикого типа, как экспериментальных моделей в изучении сайтов связывания miRNA с mRNA.

Результаты, основные положения и выводы диссертационной работы опубликованы в 25 научных работах, среди которых статья в международном цитируемом журнале, 9 статей из перечня Комитета по контролю в сфере образования и науки, 15 тезисов в материалах международных научных конференций.

6. Замечания, вопросы и предложения по диссертации

1. Не оценена вероятность получения ложно-положительного результата.
2. Нет чёткого обоснования, почему всё-таки были выбраны в качестве мишеней субтипы HER2, luminal A и B и triple-negative.
3. Почему, например не рассматривался в качестве мишени весьма важный белок Ki67 (MKI67 mRNA), для которого пытаются разработать

метод флуоресцентного детектирования в гистологических срезах биопсийного материала?

4. Можно ли было провести валидацию полученных данных на клинических результатах доступных в публикациях? Любой ответ обосновать.

5. В диссертационной работе и в восьмом выводе не раскрыта суть рекомендаций для разработки методов диагностики этих субтипов.

При этом указанные замечания и вопросы имеют лишь частный и уточняющий характер и не снижают общее хорошее качество и значимость полученных результатов.

7. Соответствие содержания диссертации в рамках требований правил присуждения учёных степеней ККСОН МОН РК

Диссертационная работа Айсиной Даны Евгеньевны на тему: **«Взаимодействие miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы»** полностью соответствует требованиям Правил присуждения ученых степеней ККСОН МОН РК, а соискатель заслуживает степень доктора философии (PhD) по специальности «6D070100 – Биотехнология».

Рецензент:
начальник отдела
доклинических испытаний
АО «Научный центр
противоинфекционных препаратов»,
кандидат биологических наук,
ассоциированный профессор _____ Р.А. Исламов

Подпись Исламова Р.А.
заверяю
Начальник отдела кадров
«20» ноября 2019 ж/г.

КАДР БОЛІМІ
ОТДЕЛ КАДРОВ

«20» ноябрь 2019 г.