

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Соловьевой Натальи Александровны

на тему: «Протеомные сигнатуры внеклеточных везикул аденокарциномы легкого и колоректального рака», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

1.5.4. – «Биохимия»

Диссертационная работа Соловьевой Н.А. направлена на поиск белков, ассоциированных с внеклеточными везикулами (ВнВ) рака легких (РЛ) и колоректального рака (КРР). Эти два типа рака являются одними из ведущих причин смертности от злокачественных новообразований, а разработка методов ранней диагностики и мониторинга прогрессирования болезни крайне важна для повышения выживаемости пациентов. Исследование ВнВ актуально с точки зрения фундаментальной биологии опухолей, поскольку они играют роль в межклеточной коммуникации, передаче сигнальных молекул и модификации опухолевого микроокружения. С практической точки зрения, ВнВ могут быть использованы как источники биомаркеров для диагностики и прогноза течения РЛ и КРР, а также как возможные терапевтические мишени для лечения этих заболеваний. В свете современных тенденций развития методов жидкостной биопсии работа Соловьевой Н. А. направлена на решение одной из ключевых задач — поиска потенциальных биологических маркеров РЛ и КРР, которые можно детектировать в плазме крови человека.

Диссертационная работа Соловьевой Н.А. изложена на 170 страницах и содержит 38 рисунков и 8 таблиц, построена по стандартному принципу и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список используемой литературы и приложения.

В первой главе отмечена актуальность работы, ее теоретическая и практическая значимость, степень разработанности темы, а также поставлены цель, задачи работы, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

«Обзор литературы» состоит из трех частей. В первой части рассматривается история исследований ВнВ, их состав и физико-химические свойства, а также

возможности применения в биомедицине. Вторая часть посвящена методам выделения ВнВ и подходам к их анализу. В третьей части рассматривается роль внеклеточных везикул в онкологических заболеваниях, с особым акцентом на РЛ и КРР. Обзор, основанный на современных исследованиях, демонстрирует критический подход автора к существующим данным и глубокое знание литературы по теме, что свидетельствует о его высокой научной компетентности.

Успешное решение задач, поставленных в диссертационной работе, стало возможным благодаря использованию широкого спектра современных методов биохимии и протеомики, в том числе различных типов масс-спектрометрического анализа. Раздел «Материалы и методы» детально описывает примененные в работе подходы, включая культивирование клеточных линий РЛ (A549 и NCI-H23) и КРР (Caco-2, HCT116 и HT29), получение клинических образцов, выделение ВнВ из среды культивирования модельных линий клеток и из плазмы крови человека, визуализацию везикул с помощью криоэлектронной микроскопии, пробоподготовку для протеомного масс-спектрометрического анализа, панорамный и направленный масс-спектрометрический анализ, а также биоинформатическую обработку масс-спектрометрических данных. Эксперименты с модельными клеточными линиями были выполнены в биологических повторах. Клинические образцы, полученные от больных РЛ и КРР, исследовались в сравнении со здоровым контролем. Это демонстрирует высокий научно-методический уровень работы и подтверждает достоверность полученных результатов.

Глава «Результаты» содержит основные полученные автором результаты. Во-первых, с применением направленного масс-спектрометрического метода в режиме мониторинга выбранных реакций с использованием изотопно-меченых пептидных стандартов (SRM/SIS) была проведена оптимизация метода выделения ВнВ из плазмы крови человека. Кроме того, были измерены общепринятые белковые маркеры экзосом (HSPA8, CD9, CD82, CD63). Во-вторых, по результатам панорамного масс-спектрометрического профилирования ВнВ, выделенных из среды культивирования модельных линий клеток РЛ (A549 и NCI-H23) и КРР (Caco-2, HCT116 и HT29) удалось зарегистрировать 850 и 2464 белков, в ВнВ и цельном лизате клеток, соответственно. Затем с помощью полуколичественного анализа МС-данных без использования изотопных меток автором были определены

универсальная, ткане- и линия-специфичные протеомные сигнатуры, ассоциированные с АКЛ и КРР, которые включали 11, 8 и 29 белков, соответственно. Для валидации автором был разработан метод SRM/SIS для измерения ВнВ-ассоциированных белков в образцах плазмы крови, полученных от больных с РЛ и КРР, а также от здоровых добровольцев. Было показано, что протеомные сигнатуры, включавшие 7 белков (FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PACSIN2) и 10 (FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8, TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1 и GNAI2) белков для РЛ и КРР, соответственно, позволяют отличить больных с онкологическими заболеваниями от здоровых добровольцев. Данные масс-спектрометрического анализа были депонированы в базу данных ProteomeXchange (идентификаторы PXD020467 и PXD020454) и находятся в свободном доступе для научного сообщества. Примененный в работе двухэтапный подход к поиску потенциальных белковых маркеров КРР и РЛ представляет научную новизну.

В главе «Обсуждение результатов» представлена интерпретация полученных результатов, их сравнение с данными других современных исследований на аналогичные темы, приводятся биологические характеристики молекул, представляющий наибольший интерес на основании проведенного исследования.

Таким образом, достоверность результатов работы обеспечена применением высокотехнологичных методов протеомного анализа, а также использованием принятых современным научным сообществом протоколов, в том числе требований Международного сообщества по исследованию везикул, и международных баз данных для биоинформатической обработки результатов. Выводы диссертации базируются на тщательном анализе полученных данных с использованием методов количественной и качественной оценки белков, что позволяет говорить о точности и надежности результатов. Выводы диссертации согласуются с известными теоретическими и практическими знаниями в области молекулярной онкологии.

По теме диссертации опубликовано 10 работ, из которых 7 статей в рецензируемых научных журналах и 4 публикации в трудах конференций. Автореферат полностью отражает результаты и выводы работы.

Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне, полученные Соловьевой Н.А. результаты не вызывают сомнений, выводы работы надежно подкреплены экспериментальными данными и являются обоснованными.

Однако к работе есть некоторые вопросы и замечания, которые не снижают ценности диссертационной работы.

1. Какой объем культуральной жидкости и сыворотки использовали для выделения ВнВ (первый этап ультрацентрифугирования)?
2. Не удалось найти информацию, каким методом были выделены ВнВ, использованные для анализа методом криоэлектронной микроскопии.
3. Размер ВнВ приблизительно определен с помощью криоэлектронной микроскопии. Обычно, при исследовании ВнВ измеряют их концентрацию и распределение их по размеру.
4. С чем связан тот факт, что оптимальным методом выделения оказался метод ультрацентрифугирования на сахарозной подушке?
5. По мнению автора, с чем связано отсутствие сигнала SRM для пептидов, картированных на общепринятый маркер CD82 в образцах ВнВ и ЦЛ? Кроме того, сигнал от пептида, картируемого на белок CD63, также не был зарегистрирован ни в одном образце ВнВ.
6. Почему для получения ВнВ использовали среду с добавлением фетальной сыворотки? Несмотря на то, что содержащиеся в фетальной сыворотке ВнВ были предварительно удалены путем ультрацентрифугирования, высокое содержание основных белков сыворотки (например, альбумина) может влиять на результат масс-спектрометрической идентификации. Для инкубации клеток в течении 24 часов, по моему мнению, вполне можно использовать бессывороточную среду.

Диссертационная работа Соловьевой Натальи Александровны на тему «Протеомные сигнатуры внеклеточных везикул аденокарциномы легкого и колоректального рака» является завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне и отвечающей требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением

Правительства РФ от 24.09.2013 №842 (в ред. От 25.01.2024) «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор Соловьева Наталья Александровна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – биохимия.

Официальный оппонент,
доктор биологических наук
Лазарев Василий Николаевич,
заместитель генерального директора по научной работе
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России
заведующий лабораторией генной инженерии
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России
Специальность: 03.01.03 – «Молекулярная биология»
Почтовый адрес: 119435, г.Москва, ул. Малая Пироговская, д.1а
Телефон: +7(916)6352455
Адрес электронной почты: lazarev@rcpcm.org

 /В.Н. Лазарев/

Данные Лазарева В.Н. подтверждаю
Ученый секретарь
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России
кандидат биологических наук

/Е.С.Кострюкова/

«08» ноября 2024 г.

