

«УТВЕРЖДАЮ»



Проректор по научной работе

ФГБНУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Минздрава России

(Пироговский Университет)

Д.б.н., профессор, профессор РАН

Ребриков Денис Владимирович

«07» *ноября* 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Соловьевой Натальи Александровны
«Протеомные сигнатуры внеклеточных везикул аденокарциномы легкого и
колоректального рака» представленную на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Соловьевой Натальи Александровны на тему:
«Протеомные сигнатуры внеклеточных везикул аденокарциномы легкого и
колоректального рака» посвящена актуальной и важной проблеме медицины и биологии –
изучению протеомного профиля внеклеточных везикул, ассоциированных с
аденокарциномой легкого и колоректальным раком. Исследования в этой области могут
способствовать выявлению биологических маркеров для ранней диагностики и прогноза
течения злокачественных новообразований, а также поиску новых терапевтических
стратегий

Внеклеточные везикулы (ВнВ) играют важную роль в межклеточной
коммуникации, передаче сигнальных молекул и модификации микроокружения опухоли,
что делает их перспективным объектом для исследований в области онкологии, однако
представленные в литературе публикации, посвященные протеомным сигнатурам

внеклеточных везикул, секретируемым опухолями, относительно немногочисленны, что подчеркивает актуальность и своевременность настоящей диссертационной работы.

В работе использованы современные высокотехнологичные масс-спектрометрические методы: панорамное профилирование высокого разрешения и направленный масс-спектрометрический анализ в режиме мониторинга выбранных реакций (SRM), что обеспечивают получение качественных и количественных данных о белковом составе ВнВ.

Связь работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационная работа Соловьевой Н.А. выполнена в соответствии с Программой фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы), утвержденной распоряжением РФ от 31 декабря 2020 г. №3684-р.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Исследование проведено с применением современных и высокотехнологичных методов, масс-спектрометрии, таких как панорамное профилирование с высоким разрешением на масс-спектрометре Q Exactive™ и HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ и направленный масс-спектрометрический анализ в режиме мониторинга выбранных реакций (SRM/SIS) на тройных квадрупольных масс-спектрометрах TSQ Vantage и TSQ Quantiva. Применение этих методов гарантирует высокую чувствительность и специфичность, что особенно важно для анализа низкокопийных белков, присутствующих в образцах в низких концентрациях.

Кроме того, для обработки и анализа полученных данных были использованы актуальные и признанные научным сообществом базы данных (GeneOntology, KEGG и Reactome Pathways) и биоинформатические инструменты (STRING и UALCAN). Это позволило провести биологическую и функциональную аннотацию полученных результатов, а также анализ выявленных протеомных сигнатур, что укрепляет научную обоснованность результатов, а также указывает на биологическую значимость полученных результатов.

Также важно отметить, что результаты исследования прошли апробацию на международных и всероссийских научных конференциях, и были опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, в том числе, принадлежащих квартилям Q1/Q2 в международных базах данных Scopus и WOS (Web of Science).

Новизна исследования и полученных результатов

В работе впервые применен двухэтапный подход к исследованию протеома ВнВ, ассоциированных с колоректальным раком (КРР) и раком легких (РЛ). На первом этапе, для образцов везикул и цельного лизата клеток, полученных из клеточных моделей РЛ (клеточные линии A549 и NCI-H23) и КРР (клеточные линии Сасо-2, НСТ116 и НТ29) был проведен панорамный масс-спектрометрический анализ и определены потенциальные наборы белков, являющиеся универсальными, ткане- и линиеспецифичными протеомными сигнатурами. Компоненты протеомных сигнатур были верифицированы в образцах, происходящих из клеток модельных линий, с помощью направленной масс-спектрометрии в режиме мониторинга выбранных реакций с использованием изотопно-меченных пептидных стандартов SRM/SIS. Второй этап включал валидацию сформированной панели белков SRM/SIS методом на образцах плазмы крови больных, полученной от больных РЛ и КРР и здоровых доноров. Данный подход позволил идентифицировать низкокопийные белки (MVP, TLN1, SLC2A1, TUBA4A, HSPG2, ITGB3 и CNP) находящиеся в плазме крови в низкой концентрации и ранее не описанные в контексте ВнВ при этих типах рака, что расширяет знания о биологических функциях ВнВ в опухолевом процессе, а также их роли в метастазировании и ответе на терапию. Кроме того, применение разработанного метода направленной масс-спектрометрии SRM/SIS для анализа ВнВ, позволило количественно определить содержание белков-биомаркеров (FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PACSIN2 – в случае с РЛ и FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8, TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1 и GNAI2 – в случае с КРР) в образцах плазмы крови, что имеет значительный потенциал для клинического применения.

Уникальные наборы данных, полученные с помощью панорамной масс-спектрометрии, были загружены в открытую базу данных ProteomeXchange (идентификаторы PXD020467 и PXD020454) и, где они доступны для протеомного научного сообщества.

Впервые предложены протеомные панели ВнВ, ассоциированных с РЛ и КРР, которые могут стать основой для разработки методов ранней диагностики на основе жидкостной биопсии.

Значимость для науки и практики полученных результатов.

Рекомендации по использованию результатов работы и выводов диссертации

Результаты диссертационной работы представляют собой важный научный вклад, который имеет как фундаментальное, так и прикладное значение. Выявленные в работе протеомные сигнатуры ВнВ расширяют представления о биологических функциях ВнВ и их роли в процессах онкогенеза, метастазирования и взаимодействия с микроокружением опухоли. Эти данные могут послужить основой для дальнейших фундаментальных исследований, направленных на изучение молекулярных механизмов ракового роста и межклеточного взаимодействия в опухолевой среде. Полученные данные также могут быть использованы для изучения роли ВнВ в других типах рака и патологических процессах.

Кроме того, протеомная сигнатура, включающая белки (TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PACSIN2), позволила различить, образцы плазмы крови, полученной от больных РЛ и здоровых добровольцев, а протеомная сигнатура, включающая белки (FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8, TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1 и GNAI2) различалась в образцах ВнВ, выделенных из крови больных КРР, по сравнению со здоровым контролем. Полученные в работе панели белков могут быть расширены для разработки высокоспецифичных методов жидкостной биопсии. Использование внеклеточных везикул как источника информации о состоянии опухоли может стать альтернативой или дополнением к традиционным диагностическим методам. Жидкостная биопсия на основе ВнВ может быть применена не только для диагностики, но и для мониторинга рецидивов и контроля за течением болезни.

Результаты диссертационной работы обладают высоким потенциалом для масштабирования и внедрения в практическое здравоохранение, особенно с учётом современных тенденций в разработке малоинвазивных методов диагностики. Приведённые в диссертации примеры протеомного анализа внеклеточных везикул (ВнВ) представляют ценную основу для обсуждения и развития актуальных подходов к диагностике и прогнозированию онкологических заболеваний.

Материалы диссертации также могут найти широкое применение в образовательных программах, направленных на подготовку специалистов в областях биохимии, молекулярной биологии, онкологии и биомедицинских исследований. В рамках таких программ возможно рассмотрение разделов, посвящённых протеомике, биомаркерным исследованиям и изучению внеклеточных везикул. Учебные и научные учреждения, такие как РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, МГУ им. М.В. Ломоносова, ФНКЦ ФХМ ФМБА, Институт медико-биологических проблем РАН, ИБХ им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, а также другие ведущие научные и клинические организации могут использовать эти материалы для подготовки будущих специалистов и проведения передовых исследований.

Личный вклад автора

Автором проведён глубокий анализ литературы по теме диссертации, который стал основой раздела «Обзор литературы». Соискатель участвовала в планировании и организации экспериментов. Результаты, представленные в работе, были получены либо непосредственно автором (включая культивирование клеточных линий, выделение внеклеточных везикул и цельного лизата, подготовку образцов для протеомного анализа), либо при её непосредственном участии (проведение масс-спектрометрического анализа как в режиме панорамного профилирования высокого разрешения, так и в режиме мониторинга выбранных реакций (SRM)).

Количество печатный работ, в том числе в изданиях, рекомендованных ВАК

Результаты диссертационной работы отражены в 10 печатных работах, в том числе 7 статей в рецензируемых научных журналах и 3 публикации в трудах конференций.

Структура и оформление диссертации

Диссертационная работа изложена на 170 страницах машинописного текста, содержит 8 таблиц и 38 рисунков. Состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы, Финансирование, Благодарности, Список использованной литературы и Приложения.

В разделе «Введение» автор раскрывает актуальность выбранной темы диссертационной работы, степень разработанности темы, формулирует цель и задачи исследования, а также приводит основные характеристики работы – научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов.

«Обзор литературы» включает три подраздела. В первом подразделе автор затрагивает историю изучения внеклеточных везикул, их состав и физико-химические свойства, а также перспективы использования в биомедицинских исследованиях. Второй подраздел включает информацию о методах выделения внеклеточных везикул и подходах к их анализу, рекомендуемых Международным сообществом по изучению внеклеточных везикул. Третий подраздел раскрывает тему внеклеточных везикул в контексте онкологических заболеваний, особое внимание уделено раку легких и колоректальному раку. Содержание литературного обзора свидетельствует о высоком уровне компетентности автора в изучаемой области.

Раздел «Материалы и методы» включает подробное описание используемых в работе методов: культивирования клеточных линий, получения клинических образцов, выделения образцов внеклеточных везикул, криоэлектронной микроскопии, пробоподготовки к протеомному анализу (которая включает несколько протоколов гидролиза), протеомного анализа (включающий описание твердофазного синтеза пептидных стандартов) и биоинформатического анализа масс-спектрометрических данных. С учетом описанного раздела, можно утверждать, что работа выполнена на высоком экспериментальном уровне с применением передовых современных методов, применяемых в области биохимии, онкологии и биомедицинских исследований.

Раздел «Результаты» включает основные результаты диссертационного исследования. Во-первых, результаты экспериментов по оптимизации метода выделения внеклеточных везикул, включающие подтверждение эффективности выделения везикул методом направленной масс-спектрометрии в режиме мониторинга выбранных реакций (SRM) и криоэлектронную фотографию полученных образцов, для подтверждения везикулярной природы. Во-вторых, результаты панорамного профилирования образцов везикул, полученных из среды культивирования модельных клеточных линий аденокарциномы легкого и колоректального рака, включая биологическую и функциональную аннотацию полученных данных. В-третьих, результаты направленного

масс-спектрометрического анализа клинических образцов больных с раком легких, колоректальным раком и здоровых добровольцев. Подробное описание результатов, включая таблицы и рисунки, обеспечивает наглядность и способствует лучшему пониманию значимости полученных данных.

«Обсуждение результатов» проведено с учетом современных исследований по данной тематике, что позволило автору провести всесторонний анализ полученных данных и сопоставить их с результатами других ученых, что позволяет критически оценить значимость и новизну сделанных выводов. Отдельное внимание в разделе уделено биологической роли и функциям белков, входящих в сформированные панели. Эти белки рассматриваются не только как потенциальные биомаркеры для диагностики и прогноза течения заболеваний, но и как ключевые элементы, влияющие на различные аспекты онкогенеза, такие как метастазирование, клеточная пролиферация и устойчивость к терапии.

Раздел «Заключение» подводит итоги работы, а также их потенциал для дальнейшего применения.

По результатам исследования были сформулированы 3 вывода. Выводы содержат четкие и конкретные научные положения, вытекающие из проведенного исследования. Они отражают достигнутые цели и решенные задачи, а также подчеркивают актуальность и новизну работы.

Таким образом, структура и содержание работы логично выстроены, а каждый из разделов соответствует задачам исследования и способствует полной и ясной интерпретации результатов. Работа выполнена на высоком уровне, с применением современных методов и подходов, что делает ее значимым вкладом в область биохимии и онкологии.

При ознакомлении с текстом диссертации возникло несколько замечаний, которые не носят принципиального характера.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

- 1) В разделе 2.3 обзора литературы автор суммирует известные данные о внеклеточных везикулах в контексте некоторых онкологических заболеваний. Описаны рак легких, рак прямой кишки, рак молочной железы, рак

предстательной железы и рак яичника. Перечень шире, чем заболевания, исследованные в диссертационной работе. Чем обусловлен выбор этих видов онкологических заболеваний для подробного описания?

- 2) В работе проведен ROC-анализ, однако методика построения кривой и использованное программное обеспечение не описано в материалах и методах. Сказано, что для ROC-анализа был построен классификатор, но не указано, какая использовалась модель: логистическая регрессия, дерево решений или что-то другое. Пациентов в диссертационной работе было относительно немного, в связи с этим возникает вопрос, ROC кривая строилась на том же наборе данных, на котором классификатор тренировался?
- 3) Для большинства белков получены достаточно хорошие значения площади под кривой (AUC). Рекомендуется попробовать обучить модель на совокупных данных для всех белков, входящих в сигнатуру, и валидировать результаты на расширенной независимой выборке.
- 4) В работе проводился панорамный анализ для образцов везикул и цельного лизата из клеточных линий, а для везикул, выделенных из плазмы крови описан исключительно таргетный анализ. Проводился ли панорамный анализ для образцов плазмы крови?

Небольшие неточности:

- 1) В материалах и методах на стр. 48 указано шесть клеточных линий: линии АКЛ (A549, NCI-H460 и NCI-H23) и KPP (HT29, HCT-116 и CaCo-2), а в заявленных целях и реально в работе их пять. По-видимому, это опечатка.
- 2) На рис 21 нет пояснений аббревиатурам.
- 3) В описание таблицы 5 вариант «сигнал от пептида не определялся» обозначен латинскими буквами — NO, а в самой таблице кириллицей — Н/О.
- 4) Рисунок 28. В STRING разные цвета означают разные варианты доказательства существования функциональной связи. Причем доказательства сильно варьируют по силе. Ребро графа на этой иллюстрации может быть как экспериментально подтвержденным химическим взаимодействием белков, так и упоминанием двух белков в тексте абстракта одной статьи в PubMed. Рекомендуется в будущем в аналогичных иллюстрациях описывать эти цвета.

Приведенные замечания не влияют на общую положительную оценку работы, не снижают её научную и научно-практическую значимость. Работа Соловьевой Н.А. является завершённым оригинальным научным исследованием, заслуживающим высокой оценки.

Заключение

Диссертационная работа Соловьевой Натальи Александровны на тему «Протеомные сигнатуры внеклеточных везикул аденокарциномы легкого и колоректального рака» является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне и отвечающей требованиям п. 9 «Положение о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Соловьева Наталья Александровна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на межлабораторном семинаре НИЛ «Медицинская геномика» ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России от 6 ноября 2024г., протокол №2.

Научный сотрудник

НИЛ «Медицинская геномика»,

ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Минздрава России (Пироговский Университет)

Кандидат биологических наук,

Козин Максим Сергеевич

Подпись Козина М.С. заверяю

К.м.н., ученый секретарь

ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России (Пироговский Университет)



Демина Ольга Михайловна

117513, г. Москва, ул. Островитянова, д.1. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, +7 (495) 434-03-29, rsmu@rsmu.ru