

Отзыв

официального оппонента

на диссертационную работу Тутанова Олега Сергеевича

“Протеомный анализ экзосом и нуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих в крови здоровых женщин и больных раком молочной железы”,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

Актуальность темы выполненной работы

Цркулирующие внеклеточные везикулы и нуклеиновые кислоты в последние десятилетия являются объектами повышенного научного интереса. В многочисленных работах показана универсальность экзосом в качестве посредника в межклеточной коммуникации и ключевая роль внеклеточных везикул в широком ряде процессов, в том числе при развитии онкологических заболеваний. Однако, несмотря на постоянно пополняющийся список предписываемых экзосомам функций, механизмов сборки и секреции, транспортируемых ими белков, липидов и нуклеиновых кислот, поиск новых подходов к выделению и изучению данных везикул, а также изучению их роли в возникновении злокачественных новообразований и опухолевой диссеминации только набирает актуальность. В свою очередь, несмотря на более глубокую историю изучения, про строение, формы циркуляции и роль внеклеточных нуклеиновых кислот известно ещё меньше. Учитывая активный интерес к данным структурам в качестве источников материала для жидкой биопсии сегодня как никогда важно исследование их фундаментальных аспектов – особенностей циркуляции и строения, выполняемых функций в норме и при развитии патологий. Сочетание фундаментальной и прикладной значимости делает диссертационную работу весьма актуальной.

В работе Тутанова О.С., посвященной изучению белкового состава циркулирующих экзосом и нуклеопротеиновых комплексов крови условно здоровых женщин и больных раком молочной железы, впервые исследованы белки экзосом, ассоциированных с поверхностью форменных элементов крови; в составе нуклеопротеиновых комплексов идентифицированы белки, как непосредственно связывающие вДНК, так и белки-“пассажиры”, и с помощью биоинформатических подходов предсказаны их функции и биологическая роль.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа Тутанова О.С. построена по традиционной схеме и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов и их обсуждения,

Выводов, Списка литературы и Приложения. Работа изложена на 211 страницах, содержит 36 рисунков, 11 таблиц и 9 приложений. Список использованной литературы включает 468 источников.

Во введении автор обосновывает актуальность исследования, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов, формулирует цели и задачи своей работы, а также положения, выносимые на защиту.

Глава 1, содержащая обзор литературы, поделена на две части. Первая часть посвящена экзосомам, их формированию и секреции, современным представлениям об их составе и функциях, роли в развитии злокачественных новообразований и поиску белковых опухолевых маркеров в составе экзосом крови. Вторая часть посвящена феномену внеклеточной ДНК, процессам, ответственным за её появление в кровотоке, формам циркуляции, предписываемым в литературе функциям и метаболизму циркулирующей внеклеточной ДНК, а также перспективам её использования в диагностике онкологических заболеваний.

Глава 2, содержащая описание материалов и методов исследований подробно описывает научно-методологические подходы, примененные автором для решения поставленных задач и достижения цели исследования. В работе Тутанова О.С. используется чрезвычайно широкий спектр современных методов молекулярной биологии, биохимии и биоинформатики. Все методики, использованные в исследовании, достаточно детально прописаны и пояснены, что предоставляет возможность воспроизведения экспериментов по приведенным протоколам.

Глава 3 посвящена описанию и обсуждению результатов исследования. Описаны процессы выделения и характеристики образцов в соответствии с существующими международными стандартами. Описано исследование белкового состава образцов экзосом и нуклеопротеиновых комплексов: для белков экзосом приведено сравнение с крупнейшими базами данных о содержании внеклеточных везикул, исследована фракция наиболее характерных белков экзосом нормы и патологии, для белков нуклеопротеиновых комплексов исследована частота встречаемости ДНК-связывающих белков, проанализированы их функциональные различия с белками нуклеопротеиновых комплексов, не связывающих ДНК. Для протеомов экзосом и нуклеопротеиновых комплексов представлен подробный анализ всех исследованных фракций с использованием методов анализа функционального обогащения и терминов генных онтологий, исследована представленность белков различных биологических путей. Кроме

того, автором показана вовлеченность белков в различные процессы, в том числе связанные с опухолевой диссеминацией, а также представленность идентифицированных белков в базах данных, содержащих белки, по литературным данным гиперэкспрессированные и маркерные для ряда онкологических заболеваний.

Глава хорошо структурирована и иллюстрирована. Описанные результаты хорошо демонстрируют логику исследования и проиллюстрированы многочисленными рисунками и приложениями, которые облегчают восприятие материала. Вслед за обзором литературы автор разделил данную главу на две смысловые части, посвящённые экзосомам и нуклеопротеиновым комплексам. Обе части заканчиваются заключениями, в которых автор резюмировал полученные результаты.

Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного экспериментального исследования. Олег Сергеевич выносит на защиту семь научных положений, логично вытекающих из анализа результатов исследования и в достаточной степени аргументированные полученными результатами. Обоснованность научных положений и выводов, таким образом, не вызывает сомнений. Материал, представленный в диссертации, получен и проанализирован автором исследования лично либо при его непосредственном участии.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

В работе проведено масштабное исследование белкового состава экзосом и нуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих в крови здоровых женщин и больных раком молочной железы. Автором впервые охарактеризована белковая компонента циркулирующих комплексов внеклеточной ДНК с нуклеосомами и исследован белковый набор экзосом суммарной крови, предсказаны характерные функции, процессы и клеточная локализация белков, циркулирующих в составе экзосом и нуклеопротеиновых комплексов. Показано, что данные структуры транспортируют белки, вовлечённые в такие связанные с опухолевой диссеминацией процессы как апоптоз, пролиферация, клеточная адгезия, эпителиально-мезенхимальный переход. В работе также определен ряд белков, которые можно рассматривать как потенциальные биомаркеры злокачественных новообразований молочной железы.

Достоверность и обоснованность результатов исследований

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием широкого спектра современных биохимических и молекулярно-биологических методов исследований, детальным анализом полученных данных и корректными способами

статистической обработки. Результаты диссертационной работы опубликованы в 9 статья в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, доложены и обсуждены на 33-х международных и российских научных конференциях.

Автореферат полностью отражают основные материалы диссертации.

В работе можно отметить некоторое количество замечаний:

1. В работе встречаются опечатки, а также грамматические и стилистические ошибки. Например, стр. 9 «экзсом», «ассоциированных», стр. 24 «амниотического» и др.
2. Ряд предложений очень сложно воспринимать при прочтении. Например, стр. 86 «Поскольку 100 из идентифицированных в данном исследовании белков ранее были описаны в составе экзосом, 123 (55%) белка идентифицированы в работе впервые».
3. В главе 2 «Материалы и методы» в целом ряде подразделов описывается процедура инкубации с белками или антителами. При этом, в большинстве случаев не указана температура инкубации. Например, п. 2.2.3.2, 2.2.4.2, 2.2.4.4.
4. Поскольку одна из задач работы звучит как «Оптимизация метода выделения экзосом, ассоциированных с поверхностью форменных элементов», а один из выводов «Оптимизированным методом выделения экзосом установлено, что не менее половины экзосом крови ассоциированы с поверхностью форменных элементов», вызывает недоумение отсутствие в Главе 3 раздела посвященного проведенной оптимизации метода выделения экзосом.

Тем не менее, сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не снижают научной ценности полученных результатов и сделанных выводов и ни в коей мере не умаляют хорошего впечатления от работы.

При прочтении возникли следующие вопросы для дискуссии:

1. Может ли автор предложить общее резюме, которое бы объединяло обе части экспериментальных результатов?
2. Будут ли отличаться протеиновые профили экзосом и нуклеопротеиновых комплексов у пациенток с онкологическим диагнозом с разной стадией, разным гормональным и/или рецепторным статусом? Проводилось ли такое сравнение в рамках настоящей работы?

Заключение

Диссертационная работа Тутанова Олега Сергеевича “Протеомный анализ экзосом и нуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих в крови здоровых женщин и больных раком молочной железы”, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решения актуальных проблем современной биологии. По своей актуальности, научной новизне, практической значимости, набору методов, объёму выполненных исследований и достоверности полученных результатов представленная работа полностью отвечает современным требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в соответствии с п.9 “Положения о порядке присуждения ученых степеней” №842 от 24 сентября 2013 (в ред. от 11.09.2021), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия, а её автор заслуживает присуждения искомой степени

Официальный оппонент

Доктор биологических наук, доцент, заместитель директора Института медицины и психологии В. Зельмана НГУ по научной работе, заведующий лабораторией молекулярной патологии, доцент кафедр ~~_____~~ гомеопатической и интегративной медицины

Пустыльняк Владимир Олегович _____ дата 13.01.2022

Адрес организации: 630090, 1. _____ ирогова, дом 2, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», тел.: +7 (383)363-40-08, e-mail: pustylnyak@post.nsu.ru

Подпись Суетов
Специалист Управления
Суетов
«13» 01

