

«Утверждаю»
Директор федерального
государственного бюджетного учреждения
«Национальный медицинский
исследовательский центр
онкологии имени Н.Н. Петрова»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
Доктор медицинских наук, профессор



А.М. Беляев

21. 2022

ОТЗЫВ

Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова" Министерства здравоохранения Российской Федерации в качестве ведущей организации на диссертационную работу Тутанова Олега Сергеевича на тему: «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 диссертационной работы

Диссертационное исследование Тутанова О.С. посвящено актуальной проблеме – изучению особенностей протеомного профиля экзосом и нуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих в плазме здоровых женщин и больных раком молочной железы. Актуальность данной работы определяется рядом факторов. Во-первых, рак молочной железы (РМЖ) является наиболее частым онкологическим заболеванием среди женского население, что определяет важность изучения механизмов развития этого

заболевания и разработки инновационных методов его диагностики и терапии. Во-вторых, понимание молекулярных механизмов формирования и биологической роли наноразмерных компонентов циркулирующей плазмы (экзосом, нуклеопротеиновых комплексов) пока недостаточно для оценки их роли в патогенезе РМЖ, что требует разработки новых методологических подходов и проведения высокотехнологичных исследований. В-третьих, применение инновационных технологий для исследования биологического материала онкологических пациентов, в данном случае – пациенток с РМЖ, создает фундамент для создания новых методов диагностики и мониторинга эффекта терапии. Исследования циркулирующих нановезикул и внеклеточных форм ДНК являются “горячими точками” современной биологии и фундаментальной медицины. Методы протеомного анализа, примененные в рамках исследования, являются новой, активно развивающейся технологией, требующей умения работать с большими массивами экспериментальных результатов, их обобщением, классификацией, интерпретацией и предполагающей наличие не только лабораторных навыков, но и навыков работы с соответствующим программным обеспечением. В целом, протеомный анализ наноразмерных (мульти-молекулярных) компонентов циркулирующей плазмы необходим для формирования концепции их патогенетической роли в развитии РМЖ, это определяет актуальность тематики исследования.

Научная новизна исследования

Результаты проведенного исследования впервые показали значимость выделения и анализа фракции экзосом, ассоциированных с поверхностью форменных элементов крови, вклад последних в общий пул циркулирующих экзосом, функциональные сходства и различия белков, характерных для различных суб-популяций экзосом в плазме здоровых доноров и пациентов с РМЖ. В рамках диссертационной работы были впервые идентифицированы

белки, циркулирующие в составе комплексов с нуклеосомами; проанализирован вклад ДНК-связывающих белков в формирование нуклеопротеиновых комплексов, а также с помощью биоинформатического анализа исследованы молекулярные функции, биологические процессы и клеточные локализации, наиболее характерные для белков нуклеопротеиновых комплексов. Впервые исследована функциональная представленность белков составе нуклеопротеиновых комплексов, экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с форменными элементами крови; проведен сравнительный анализ состава этих белковых фракций у здоровых доноров и больных РМЖ; выявлены потенциальные диагностические маркеры.

Обоснованность и достоверность полученных результатов

Методы исследования адекватны поставленным задачам и соответствуют современным методам, применяемым в работе с наноразмерными компонентами биологических сред и методам классической протеомики. Обоснованность полученных данных подтверждается результатами статистической обработки с использованием современных методов биоинформатического анализа.

Результаты диссертационной работы О.С. Тутанова обсуждались на 33 научных форумах разных уровней, включая международные конференции с очным участием, по теме диссертации опубликовано 9 статей в журналах, рекомендованных ВАК и индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Работа была поддержана грантом администрации Советского района г. Новосибирска и стипендией Правительства РФ для молодых учёных и аспирантов, что подчёркивает актуальность, новизну, высокий теоретический и практический уровень проведённых исследований.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Работа Тутанова О.С. имеет важное фундаментальное значение для биохимии, молекулярной биологии и молекулярной онкологии. Полученные в работе научные данные расширяют современное представление о структуре, физиологической и патофизиологической роли циркулирующих экзосом и внеклеточной ДНК, раскрывают новые механизмы межклеточной коммуникации и их изменения, сопровождающие развитие РМЖ.

Результаты, полученные в данном исследовании, указывают на возможность использования инновационных технологий выделения и протеомного анализа наноразмерных компонентов циркулирующей плазмы. Эти технологии позволили продвинуться в изучении данных структур, особенностей их циркуляции и биологических функций, а в дальнейшем могут послужить основой для разработки новых диагностических методов. В ходе исследования Олег Сергеевич стал соавтором двух патентов РФ: “Способ получения экзосом из крови” и “Способ диагностики и мониторинга онкологических заболеваний с использованием экзосом крови”, что говорит не только о новизне, но и высокой практической значимости полученных результатов.

Структура и общая характеристика работы

Диссертационная работа Тутанова О.С. изложена на 211 страницах, содержит 36 рисунков, 11 таблиц и 9 приложений. Список цитированной литературы включает 468 источников. Текст диссертации содержит традиционные пункты и поделён на введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы и приложения.

Во введении приводятся аргументы, обосновывающие актуальность диссертационной работы. В этой части автор исследования сформулировал цель работы и задачи, которые логично вытекают из поставленной цели.

Согласно традиционному плану, введение раскрывает научную новизну и практическую значимость исследования, и представляет положения, выносимые на защиту. Введение включает информацию о личном вкладе автора в представленное исследование и публикации его результатов.

Обзор литературы составляет существенную часть объёма диссертационной работы, подробно описывает современное состояние исследований, направленных на изучение внеклеточных нановезикул и ДНК. В частности, автором представлена информация о механизмах образования нановезикул (экзосом), их составе, и изложены современные представления о возможной роли, которую играют экзосомы в процессе развития онкологических заболеваний, составлен перечень потенциальных белковых диагностических маркеров в составе экзосом плазмы. В отдельном разделе представлен обзор современных научных данных о происхождении и формах циркуляции внеклеточной ДНК, ее роли в развитии онкологических заболеваний и перспектив использования в качестве источника диагностического материала для методов жидкостной биопсии. Системное представление информации позволило автору ёмко и компактно представить большой массив научных данных, на основе которых была сформулирована цель исследования.

В главе, посвящённой материалам и методам структурировано представлена информация о реагентах, материалах и технологиях, использованных в работе; изложены протоколы экспериментов исследования, методы анализа полученных данных.

Результаты и обсуждения, аналогично обзору литературы, поделены на две части, посвящённые экзосомам и нуклеопротеиновым комплексам. Обе части подчиняются общей внутренней логике и описывают результаты выделения и анализа образцов, идентификации их белкового состава и его анализа. В частности, параграф, посвящённый анализу экзосом, содержит данные об их размере, концентрации и морфологии, полученные методами

анализа траекторий наночастиц и трансмиссионной электронной микроскопии; и результаты протеомного анализа различных экзосомальных фракций. Параграф, посвященный исследованию циркулирующих нуклеопротеиновых комплексов, включает результаты оценки выделенных образцов, результаты собственно протеомного анализа и большой массив данных биоинформатического анализа полученных результатов. В заключении обеих частей представлены результаты сравнительного анализа протеомов экзосом и нуклеопротеиновых комплексов здоровых доноров и пациентов с РМЖ, который демонстрирует интересные различия.

Завершают работу выводы, логично вытекающие из представленных в конце каждой части “Результатов и обсуждения” обсуждений, список литературы и приложения.

Основные положения диссертации полностью отражены в автореферате.

Замечания

Принципиальных замечаний к качеству проведения или результатам работы нет.

В рамках официальной защиты автору рекомендуется сделать пояснения по двум аспектам. Во-первых, в рамках исследования уделяется большое внимание специфической популяции внеклеточных нановезикул (экзосом), ассоциированных с форменными элементами крови. Эта везикулярная популяция исследуется отдельно от остальных везикул циркулирующей крови, и особенности именно этой фракции отражены в выводах диссертационного исследования и положениях, выносимых на защиту. При этом автором не уделяется достаточно внимания этой специфической фракции в обзоре литературы и технология их выделения представлена очень коротко в разделе «Материалы и Методы». Во-вторых, автором проделана большая биоинформатическая работа с данными протеомного анализа; определены

группы функционально близких белков, представленных в тех или иных мультимолекулярных комплексах, циркулирующих в плазме здоровых доноров и пациенток с РМЖ. Результаты такого исследования, безусловно, могут носить описательный характер, но автор мог бы провести как минимум предположительную оценку наблюдаемых различий: их возможной роли в процессе развития и прогрессии заболевания, влияния, которое они могут оказывать на эффект терапии заболевания. Представляется, что полученные результаты могут быть интересны не только в рамках разработки новых диагностических подходов, но и с точки зрения понимания патогенеза заболевания.

Тем не менее, указанные замечания не умаляют научной ценности проделанной 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, по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов полностью соответствует критериям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в ред. От 11.09.2021), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Диссертация и отзыв ведущей организации на диссертационную работу Тутанова Олега Сергеевича обсужден и одобрен на заседании научной

лаборатории субклеточных технологий с группой онкоэндокринологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (протокол № 44 от 10 января 2022 г.).

Заведующий научной лабораторией субклеточных технологий с группой онкоэндокринологии
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России,
Кандидат медицинских наук



_____ А.В. Малек

Подпись к.м.н., Малек А.В. заверяю:

Ученый секретарь
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»
Доктор медицинских наук

Минздрава России
А.О. Иванцов



Адрес: 197758, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская.
Тел.: 8(812) 43-99-555
e-mail: oncl@rion.spb.ru
www.niioncologii.ru