

ОТЗЫВ

*официального оппонента, доктора биологических наук, профессора
Гуляевой Людмилы Федоровны на диссертацию*

БРЫЗГУНОВОЙ ОЛЬГИ ЕВГЕНЬЕВНЫ

**«ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ МИКРОРНК И АБЕРРАНТНО МЕТИЛИРОВАННЫЕ ДНК
КАК МАРКЕРЫ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ»,**

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

Актуальность диссертационной работы. Рак предстательной железы (РПЖ) из-за своей высокой распространенности является вторым по частоте диагностирования раком солидных органов после рака легких у мужчин, а также серьезной проблемой здравоохранения: ежегодно во всем мире выявляется до 400 тыс. случаев смертности и диагностируется до 1,3 миллиона новых случаев. При ранней диагностике продолжительность жизни мужчин с локализованным раком простаты может достигать 99% в течение более 10 лет. Большинству мужчин с раком простаты необходим индивидуальный план лечения медленно растущей, а часто даже вялотекущей опухоли, чтобы жить с этим заболеванием. Однако у некоторых пациентов рецидив рака простаты после применения радикального плана лечения может протекать агрессивно и не поддаваться лечению с помощью современных стандартных методов. Считается, что это одна из наиболее спорных областей медицины из-за значительной заболеваемости, связанной с существующей формой терапии. Из-за длительного анамнеза заболевания и неопределенности в клиническом прогрессе отдельных пациентов клиницисты склонны рассматривать начало лечения РПЖ как длительный процесс. В связи с этим необходима разработка новых методов диагностики и мониторинга лечения пациентов с РПЖ. Для этого одним из перспективных подходов является жидкостная биопсия, которая по сравнению с тканевой биопсией, носит менее инвазивный характер и более системный подход. Помимо циркулирующих опухолевых клеток и фрагментов ДНК, обнаруживаемых в биологических жидкостях, экзосомы в жидкостной биопсии предоставляют обширную информацию о молекулярном составе опухолей. Жидкостная биопсия мочи также представляет собой привлекательный и многообещающий метод диагностики рака

предстательной железы. Помимо специфических биомаркеров мочи, к потенциальным сывороточным биомаркерам, способным вызвать революцию в прецизионной медицине, относятся варианты андрогеновых рецепторов, маркеры метаболизма костной ткани, нейроэндокринные индикаторы и биомаркеры метаболитов. В связи с вышесказанным, поставленная в данном диссертационном исследовании цель: изучить внеклеточные микроРНК крови и мочи и локус-специфичное метилирование вДНК крови больных РПЖ и здоровых доноров (ЗД), а также оценить возможности создания на основе полученных знаний диагностикумов для выявления данного заболевания является своевременной и актуальной задачей.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, их значение для науки и практики. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения, так как Брызгуновой О.Е. проведено комплексное биохимическое исследование методических приемов, что позволило получить новые знания о неинвазивных маркерах РПЖ, выявляемых в крови и моче. Все применяемые подходы выполнены с использованием современных методов, а выполненные эксперименты проведены с использованием необходимых контролей. Некоторые из выявленных с помощью жидкостной биопсии микроРНК могут быть перспективными прогностическими маркерами развития патологического процесса в опухоли. Все результаты были обработаны с применением современных методов статистики.

Не вызывает сомнения, что многие результаты проведенного диссертационного исследования носят элементы новизны. Впервые был разработан метод выделения вн-микроРНК из различных фракций крови и мочи в присутствии октановой кислоты, который может быть использован для изготовления коммерческих наборов для клинических диагностических лабораторий. С использованием микрочиповых технологий впервые исследовано распределение вн-микроРНК в парных образцах бесклеточной фракции и фракции суммарных внеклеточных везикул (СВВ) мочи в группах здоровых доноров и пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) и раком предстательной железы. Получены оригинальные результаты, показавшие различный состав и концентрацию микроРНК СМ и СВВ. Показано, что вн-

микроРНК ВВ мочи могут быть использованы для дифференциальной диагностики РПЖ. Брызгуновой О.Е. предложен новый подход, позволяющий использовать отношения концентраций отдельных пар вн-микроРНК в составе биологических жидкостей, что позволило выбрать панель микроРНК как маркеров ДГПЖ и РПЖ. Итогом проведенных исследований было создание оригинальной панели из восьми микроРНК, которая позволила классифицировать пациентов с РПЖ, ДГПЖ и ЗД с высокими показателями чувствительности и специфичности. Впервые показано, что профили метилирования генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* в образцах внДНК крови могут различаться для больных ДГПЖ и РПЖ.

Диссертационное исследование Брызгуновой О.Е. имеет неоспоримую теоретическую ценность фундаментального характера в области современной биохимии нуклеиновых кислот. Выявленные изменения в содержании исследуемых микроРНК в биологических жидкостях пациентов с РПЖ в сопоставлении с таковым в первичной опухоли будут способствовать пониманию эпигенетических основ канцерогенеза предстательной железы. Немаловажное значение для изучения механизмов канцерогенеза имеют также результаты о метилировании некоторых генов ДНК, выявленное в образцах внДНК крови больных ДГПЖ и РПЖ. Не вызывает сомнения, что полученные результаты имеют ярко выраженную практическую ценность. Результаты, показавшие изменения концентраций вн-микроРНК и статуса метилирования внДНК в биологических жидкостях здоровых и больных с опухолями ПЖ, могут быть использованы для скрининга на этапах постановки диагноза. Диагностическая система, представленная панелью из восьми микроРНК-маркеров, может быть рекомендована для подготовки технической документации, необходимой для регистрации медицинских изделий для лабораторной диагностики.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность. Диссертационная работа Брызгуновой О.Е. изложена на 339-ти страницах машинописного текста, она состоит из введения, 3-х глав обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы, списка иллюстративного материала, перечня таблиц и приложений. Работа иллюстрирована 35-ю рисунками, содержит 37 таблиц, 8 приложений. Список литературы состоит из 866 источников.

Во «Введении» обоснована актуальность темы диссертационной работы, выделены нерешенные проблемы диагностики и мониторинга лечения РПЖ, сформулированы цель и задачи исследования, отмечены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, указаны объекты и методы исследования, а также положения, выносимые на защиту. В этом разделе приводится информация о личном вкладе автора в проведение исследований. Отмечается, что представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии и руководстве на всех этапах исследования.

Основные результаты исследования опубликованы в 20-ти статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и/или Scopus; получено 2 патента РФ на изобретение и разработана база данных, которая внесена в Реестр РФ.

В главе «Обзор литературы» автор представляет современные знания об источниках внеклеточных нуклеиновых кислот, их составе и концентрации. Здесь приводится информация об особенностях строения внеклеточных микроРНК и их возможных химических модификациях, анализируются надмолекулярные комплексы внеклеточных микроРНК, внеклеточные ДНК крови. В отдельной главе анализируется нарушение состава и концентраций микроРНК и внДНК у пациентов с РПЖ. Подробно описываются роль микроРНК в развитии РПЖ и влияние на экспрессию генов с использованием андрогензависимых и андрогеннезависимых клеточных линий, приводится информация о ключевых белок-кодирующих генах, экспрессия которых, согласно базе данных STRING, меняется в злокачественных опухолях простаты. Отдельной подглавой представлена информация о нарушении метилирования ДНК и возможностей использования в диагностике РПЖ. В 3-й главе «Обзора литературы» анализируются особенности работы с внеклеточными нуклеиновыми кислотами биологических жидкостей, методы исследования внеклеточных микроРНК, методы исследования метилирования внДНК.

Вторая глава «Материалы и методы» в полной мере позволяет оценить выборку исследованных образцов мочи и крови от 98 больных РПЖ, 57 больных ДГПЖ и 133 от клинически здоровых мужчин. Здесь также приведены

характеристики и особенности культивирования клеток линий HeLa и HUVEC. В этой главе подробно описаны современные методы биохимии и молекулярной биологии, которые включали выделение нуклеиновых кислот из мочи и крови, методы ПЦР, трансмиссионную электронную микроскопию, электрофоретический анализ белков в денатурирующих условиях по Леммли и Вестерн-блот, профилирование внеклеточных микроРНК мочи с использованием микрочиповых технологий, подготовку ДНК-библиотек для последующего секвенирования, а также биоинформатический анализ данных. В целом, методы, используемые в работе, позволяют решить поставленную цель и задачи, результаты получены на достаточном количестве экспериментального и теоретического материала. Методы статистической обработки результатов выполнены корректно с использованием современных подходов.

В главе 3 «Результаты и обсуждение», разделе 3.1. представлены результаты по разработке методологических подходов к исследованию внеклеточных нуклеиновых кислот. Это, прежде всего, выделение внеклеточных микроРНК из крови и мочи, оценка их количества в том числе и методом ПЦР. Итогом проведенных исследований была разработка высокоэффективных, надёжных и быстрых протоколов выделения РНК из различных биологических жидкостей на основе аналога раствора Фолча и октановой кислоты. Полученные таким способом нуклеиновые кислоты пригодны для проведения ПЦР. В разделе 3.2. исследованы особенности циркуляции и состава внеклеточных микроРНК у пациентов с РПЖ. Проведено сравнительное исследование внеклеточных везикул мочи здоровых мужчин и больных раком предстательной железы. В моче были выявлены внеклеточные везикулы разного размера и белкового состава, содержащие ДНК, РНК и микроРНК, специфичные для пациентов с диагнозом РПЖ. С помощью микрочиповой технологии и ОТ-ПЦР найдены специфичные микроРНК в составе внеклеточных везикул и в супернатанте мочи здоровых доноров и пациентов с ДГПЖ и РПЖ и выбраны микроРНК пары, являющиеся наиболее информативными маркерами РПЖ. Определены мишени отобранных микроРНК и их участие в регуляции сигнальных путей, в том числе связанных с патогенезом РПЖ. В разделе 3.3. приведены результаты исследования изменений внеклеточных ДНК, количественного определения общего белка в составе внеклеточных везикул

мочи. С помощью массового параллельного секвенирования получены результаты о метилировании промоторных областей генов *RNF219*, *KIAA1539* и *GSTP1* в пуле свободных вДНК плазмы крови и суммарном пуле вДНК у здоровых доноров и больных РПЖ и ДГПЖ. Показана возможность использования локус-специфичного массового параллельного секвенирования для классификации пациентов исследуемых групп и здоровых доноров.

В главе «Заключение» Брызгунова О.Е. приводит краткий анализ полученных результатов, справедливо отмечая, что поиск новых биомаркеров для скрининга рака предстательной железы с применением жидкостной биопсии требует особых методических подходов. Отмечается необходимость использования высокопроизводительных, высокочувствительных и одновременно простых в использовании методов определения специфических биомаркеров в жидких биоптатах пациентов. В данной работе был сделан акцент на выявление изменений уровней внеклеточных микроРНК в моче и плазме крови пациентов и на определение статуса метилирования молекул в составе вДНК крови. Такой подход позволил выявить потенциальные маркеры для диагностики и прогноза развития заболевания на фоне проводимой терапии.

Шесть выводов отражают основные результаты диссертационного исследования. В целом, они объективны, полностью соответствуют поставленным задачам, отражают суть и результаты проведенных экспериментов, подтверждаются представленными фактическими данными и статистическим анализом. Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы.

На основании анализа диссертации можно сделать вывод о завершенности работы. Принципиальных возражений по основной концепции работы, положениям, выносимым на защиту, полученным данным, выводам не возникло. Отмечая, в целом, высокий уровень выполненного исследования, считаю необходимым в плане научной дискуссии поставить ряд вопросов перед соискателем:

1. На рис. 3.4, 3.12 приведено распределение по размеру нуклеотидов РНК и интенсивность флуоресценции внеклеточных РНК, выделенных из плазмы крови и мочи. Неясно, это типичная картина распределения для всех исследуемых образцов?

2. На стр. 124 автор пишет: «...мы изучили экспрессию 64 генов, обнаруженных в KEGG и относящихся к изменениям протеогликанов при развитии онкологических заболеваний...» с перечислением десятков генов. Не понятно, как это утверждение может усилить диагностическую значимость исследуемых микроРНК при условии, что одна микроРНК может регулировать экспрессию многих генов.
3. На стр. 128 приведен список перспективных микроРНК микрочипового анализа. Возник вопрос, почему туда не попала микроРНК-19b, как перспективный биомаркер РПЖ?
4. Автор часто использует термин экспрессия микроРНК в моче (например, с. 120, 128), тогда как она экспрессируется в клетках органов и тканей.
5. Согласно «Материалам и методам» в исследование различных показателей уровней микроРНК в моче, статуса метилирования вДНК крови (табл. 2, 6-2,9) взяты относительно небольшие группы пациентов и здоровых доноров (от n=8 до n=20). Достаточно ли такого размера выборок, чтобы говорить о диагностической значимости исследуемых маркеров, либо есть необходимость продолжения исследований?

Возникшие вопросы и замечания не снижают моей высокой оценки диссертационного исследования, выполненного на высоком методологическом уровне.

Заключение. Диссертационная работа Брызгуновой Ольги Евгеньевны на тему «Внеклеточные микроРНК и аберрантно метилированные ДНК как маркеры онкологических заболеваний предстательной железы», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, в которой, на основании полученных автором результатов, разработана методическая основа для определения внеклеточных микроРНК и метилированной ДНК в биологических жидкостях пациентов с диагнозом рак предстательной железы с перспективой использования результатов для диагностики и мониторинга ответа пациентов на лечение. Считаю, что данная диссертационная работа полностью соответствует требованиям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте

химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор, Брызгунова Ольга Евгеньевна, заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Официальный оппонент:

Руководитель лаборатории молекулярных
механизмов канцерогенеза

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр фундаментальной
и трансляционной медицины»

д.б.н., профессор

/  / Людмила Фёдоровна Гуляева

Дата: «05» декабря 2025 г.

Личную подпись д.б.н., профессора Гуляевой Людмилы Федоровны заверяю:
ученый секретарь Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Федеральный исследовательский центр
фундаментальной и трансляционной медицины»
кандидат технических наук

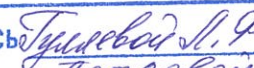




Екатерина Сергеевна Петрова

Дата: «05» декабря 2025 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» 630060, Россия, Новосибирская область, г. Новосибирск, улица Тимакова, 2.
Телефон: +7 (383) 274-95-80. E-mail: director@frcftm.ru. Сайт: www.frcftm.ru.

Личную подпись  заверяю
 
"05" декабря 2025 г. подпись 

