

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Брызгуновой Ольги Евгеньевны на тему «Внеклеточные микроРНК и aberrантно метилированные ДНК как маркеры онкологических заболеваний предстательной железы», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности: 1.5.4 – биохимия

Актуальность темы

Разработка новых технологий диагностики рака предстательной железы (РПЖ) является актуальной научной задачей с учетом ряда известных фактов: традиционно высоких показателей заболеваемости, «старением» популяции и соответствующим ростом предрасположенности к онкологическим заболеваниям. Кроме того, появление новых (относительно консервативных) лечебных технологий формирует новые критерии выбора методов диагностики, такие как минимальная инвазивность, возможность применения в режиме мониторинга, экономичность. Разработка технологий «жидкостной биопсии» является перспективной стратегией создания принципиально новых подходов диагностики РПЖ.

Понятие «жидкостной биопсии» включает в себя возможность анализа широкого спектра компонентов различных биологических жидкостей, включая клетки, субклеточные компоненты, мульти-молекулярные комплексы, внеклеточные нуклеиновые кислоты, молекулярные маркеры различной природы. Каждый вариант анализа предполагает использование особых пре-аналитических технологий, методов собственно анализа и алгоритмов интерпретации полученных результатов. Оценка эффективности каждого потенциального анализа может быть сделана лишь после разработки комплекса перечисленных аналитических технологий. Создание

инновационных методов «жидкостной биопсии» является крайне ресурсоемкой задачей, решение которой требует долгой, квалифицированной и кропотливой работы. Поэтому, не смотря на очевидную востребованность, новые технологии «жидкостной биопсии» крайне медленно внедряются в клиническую практику. Это указывает на актуальность научных исследований, направленных на разработку комплексных аналитических решений (включая пре-аналитику, анализ, интерпретацию) и объективную оценку потенциала отдельных аналитов (микроРНК, сайты метилирования ДНК).

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

На основе полученных результатов Автор сформулировала выводы, которые представляются обоснованными и достаточно конкретными. Практическая полезность проведенного исследования и сформулированных выводов отражена в соответствующих положениях, которые Автор представила к защите. Первое положение утверждает преимущество разработанных методов выделения коротких РНК по сравнению с существующими коммерческими технологиями и основано на представленных экспериментальных результатах. Второе положение указывает на наличие в составе мочи внеклеточных везикул (ВВ) различного размера, содержащих ДНК, РНК и микроРНК, что является известным фактом. На основе полученных данных Автор утверждает, что именно ВВ, выделенные из мочи пациентов с РПЖ содержат маркерные онко-микроРНК. Третье положение основано на анализе данных масштабного исследования представленности потенциально маркерных микроРНК ($n = 84$) в двух фракциях мочи; это положение констатирует возможность использования

такого подхода для формирования диагностической панели молекул. В четвертом положении Автор предлагает алгоритм формирования диагностической панели, позволяющей с высокой точностью и специфичностью классифицировать здоровых мужчин, пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы и РПЖ. В пятом положении отражена эффективность (абсолютная чувствительность и специфичность) разработанной панели из двенадцати маркерных молекул микроРНК, которая была верифицирована Автором с помощью TaqMan ОТ-ПЦР анализа коллекции образцов. Заключительное, шестое, положение основано на данных локус-специфичного высокопроизводительного секвенирования промоторных областей генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* в составе внеклеточной ДНК крови после бисульфитной конверсии. Автор утверждает, что выбранные паттерны метилирования индивидуальных ДНК позволяют дифференцировать здоровых мужчин, пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы и РПЖ с абсолютной чувствительностью и специфичностью. Кроме того, на основе полученных результатов, Автор констатирует, что суммарный пул внеклеточных ДНК крови, включающий вДНК плазмы и вДНК, связанные с поверхностью клеток крови, является более предпочтительным источником aberrантно метилированных ДНК для диагностики РПЖ. Все положения, сформулированные Автором, представляются обоснованными, подтверждёнными экспериментально и имеют очевидное практическое значение.

**Достоверность, научная новизна и практическая значимость
полученных результатов**

Адекватный выбор аналитических подходов, детальное описание использованных методов, проведенный статистический анализ определяет достоверность представленных Автором результатов.

Новизна характерна для ряда полученных результатов. Во-первых, автором разработаны новые технологии выделения коротких РНК из биологических жидкостей. Оба предложенных метода характеризуются эффективностью, технологичностью и экономичностью и могут рассматриваться в качестве альтернативы импортным коммерческим решениям, что определяет, как новизну, так и практическую значимость этого раздела исследования. Во-вторых, Автором проведен глубокий профайлинг потенциально маркерных молекул микроРНК в разных фракциях мочи. Полученные результаты позволили сделать обоснованный выбор преаналитической технологии и сформировать панель маркерных молекул. Разработанная диагностическая панель может быть реализована в виде готового диагностического решения (набора) для практического применения. В-третьих, Автором разработан оригинальный алгоритм интерпретации результатов ОТ-ПЦР анализа молекул микроРНК. С помощью этого алгоритма удалось достичь максимальных показателей диагностической значимости разработанного метода. Кроме того, описанный алгоритм может быть применен в контексте разработки методов диагностики других заболеваний на основе анализа микроРНК. В-четвертых, Автором впервые представлены данные о метилировании промоторных областей генов *RNF219*, *KIAA1539* и *GSTP1* и проведена оценка диагностического потенциала метода анализа этих изменений.

Рекомендации по использованию результатов диссертации

Результаты, полученные Брызгуновой Ольгой Евгеньевной в рамках выполнения диссертационного исследования, имеют очевидное практическое значение и формируют фундамент для создания инновационных диагностических решений, применимых непосредственно для диагностики РПЖ, или в качестве стратегии разработки аналогичных методов диагностики других онкологических заболеваний.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность

Диссертация Брызгуновой Ольги Евгеньевны имеет стандартную структуру и состоит из введения, трех основных глав (обзора литературы, описания материалов и методов и главы, в которой представлены результаты и обсуждение), заключения, выводов и дополнительных материалов, включая список сокращений, список литературы (866 источников), список иллюстраций, перечни таблиц и приложений.

Введение (Глава 1) описывает общие понятия физиологии внеклеточных нуклеиновых кислот (микроРНК и ДНК), источники и формы циркуляции нуклеиновых кислот в составе физиологических жидкостей. Отдельный раздел посвящен анализу литературных данных о роли изменений состава микроРНК и нарушений статуса метилирования ДНК, которые наблюдаются в процессе развития РПЖ. Существенная часть литературного обзора сконцентрирована на описании методологических аспектов выделения и анализа внеклеточных форм микроРНК и ДНК. Обзор литературы завершается коротким резюме, в котором Автор констатирует важность разработки технологий «жидкостной биопсии» и указывает проблемы, решению которых посвящено диссертационное исследование.

В Главе 2 представлены материалы и методы исследования, включая описание методов работы с клеточными культурами, биологическими образцами, методы выделения и анализа нуклеиновых кислот и методы статистического анализа результатов.

Глава 3 (Результаты и обсуждение) включает три части. Первая описывает результаты разработки методов выделения микроРНК из крови и мочи и результаты сравнительной оценки методов анализа на основе ОТ-ПЦР. Вторая часть Главы 3 посвящена описанию результатов исследования внеклеточных везикул (ВВ) мочи и микроРНК в составе разных фракций мочи. В этом разделе описаны основные результаты исследования, включая результаты формирования и верификации диагностической панели маркерных молекул микроРНК. В заключительной части Главы 3 представлены результаты анализа статуса метилирования ДНК в культурах первичных и трансформированных клеток и результаты исследования диагностического потенциала технологии анализа локус-специфичного метилирования генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* в составе внеклеточной ДНК циркулирующей в крови.

В заключительных разделах автор подводит итоги проведенного исследования в контексте практических перспектив разработки и внедрения в практику диагностических технологий анализа микроРНК и внеклеточной ДНК биологических жидкостей (заключение) и формулирует выводы, соответствующие задачам, решению которых было посвящено исследование.

Замечания

Замечаний к содержательной части диссертационного исследования нет. Незначительные замечания, касающиеся стиля изложения, не снижают ценности исследования, но могут быть отмечены, например:

- 1) термин «биопсия» применим к процедуре получения образцов биологического материала, но не к самому материалу.
- 2) диагноз «доброкачественная гиперплазия предстательной железы» не может быть отнесен к группе онкологических заболеваний.
- 3) к микрочиповым технологиям принято относить методы анализа, реализуемые в реакционных смесях нано- и/или микро-объемов, в то время как использованная в исследовании технология «miRCURY LNA microRNA PCR system» предполагала проведение реакций в стандартном формате 96-луночного планшета.
- 4) ошибка в нумерации тезисов, отражающих результаты исследования.

Общее заключение

Основные результаты диссертационного исследования прошли апробацию в рамках ряда конференций, опубликованы в 20 научных работах, в том числе в 18 рецензируемых журналах, включенных ВАК (или приравненных к ним) в перечень ведущих периодических изданий. Разработки, сделанные в рамках исследования, защищены двумя патентами. Автореферат и опубликованные работы достаточно полно отражают содержание работы и результаты проведенных исследований.

Уровень решаемых задач и значимость полученных результатов соответствуют требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Диссертационное исследование Брызгуновой Ольги Евгеньевны на тему «Внеклеточные микроРНК и аберрантно метилированные ДНК как маркеры онкологических заболеваний предстательной железы» является завершенной научно-квалификационной работой, которая по критериям актуальности,

научной новизны, обоснованности и достоверности выводов полностью соответствует требованиям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертант, Брызгунова Ольга Евгеньевна, заслуживает присуждения ей ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Заведующий научной лабораторией субклеточных технологий
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России,
д.м.н.

Малек А.В.

Подпись Малек А.В. заверяю
Ученый секретарь

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Д.М.Н. И

ИВАНЦОВ А.О.



Контактная информация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197758, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, дом 68, тел. +7(812) 43-99-555, e-mail: center.petrova@niioncologii.ru