

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
**Евгении Евгеньевны Бурковой «Протеомный анализ белковых комплексов и
экзосом плаценты человека», представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия**

Необходимым условием жизнедеятельности многоклеточного организма являются межклеточные взаимосвязи, позволяющие координировать биохимические процессы и функциональное состояние отдельных клеток и тканей. Исследованием коммуникации между смежными и удаленно расположенными клетками занимается множество научных коллективов, однако ещё рано утверждать, что эта проблема изучена достаточно полно. В связи с этим диссертационная работа Бурковой Евгении Евгеньевны, посвященная выделению и характеристике экзосом и высокомолекулярных белковых комплексов плаценты человека, представляется весьма **актуальным исследованием**, направленным на решение ряда насущных вопросов биохимии и молекулярной биологии.

Плацента осуществляет регуляцию обмена веществ, а также синтез различных соединений, необходимых для нормального протекания беременности и подготовки организма матери к родам. Многие биологические функции плаценты осуществляются с участием белков, которые могут взаимодействовать между собой и образовывать комплексы. Функциональная активность таких образований неизвестна и может значительно отличаться от активностей отдельных белков, входящих в состав комплексов. Это явилось обоснованием для нескольких задач диссертационной работы, объединяющих всестороннее изучение мультибелковых комплексов плаценты.

Белки плаценты и их комплексы могут транспортироваться к другим органам и клеткам матери с помощью экзосом. Однако, несмотря на активное развитие работ в этой области, состав и свойства экзосом плаценты исследованы недостаточно полно. Одна из причин этого кроется в том, что в большинстве исследований используется смесь различных типов внеклеточных везикул и совыделяющихся белков, что приводит к неоднозначной интерпретации данных. Эта проблема легла в основу мотивации еще одного блока задач диссертационной работы - разработки протокола выделения высокоочищенных препаратов экзосом плаценты человека и определения их белкового состава. Таким образом, **цель и задачи** диссертации Евгении Евгеньевны хорошо продуманы, обоснованы и взаимосвязаны.

Диссертация Бурковой Евгении Евгеньевны изложена на 161 страницах, содержит 41 рисунок, 10 таблиц и 4 приложения. Текст выстроен по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы (360 источников) и приложения.

Во **введении** описана актуальность проблемы, обоснованы и сформулированы цель настоящего исследования и конкретные задачи.

Обзор литературы построен логично и выполнен весьма квалификационно. Этот раздел посвящен имеющимся научным данным о строении и функциях плаценты человека, белках плаценты. Кроме того, подробно описаны литературные данные по биогенезу и биохимическому составу экзосом плаценты человека, детально изложены преимущества и недостатки методов выделения экзосом.

В разделе «**Методы**» дано детальное, четкое и воспроизводимое описание широкого спектра современных молекулярно-биологических, биохимических, физико-химических методов, а также методов работы с перевиваемыми клеточными культурами. Впечатляющий перечень методов указывает на большой объем и высокий уровень проделанной работы. Создается впечатление, что автор глубоко понимает все использованные в исследовании методики, что свидетельствует о тщательном подходе к постановке проделанных экспериментов.

Глава «**Результаты и их обсуждение**» представляет данные, полученные при последовательном решении поставленных задач. В первой части работы выделен и охарактеризован стабильный высокомолекулярный мультибелковый комплекс из экстракта плаценты человека с молекулярной массой порядка 1000 кДа. Показана высокая стабильность белкового комплекса в присутствии солей, органических растворителей, детергентов. Стабильный мультибелковый комплекс плаценты содержит большое число пептидов и белков с молекулярными массами от 4 до 180 кДа, а также РНК. Показано, что выделенный мультибелковый белковый комплекс обладает девятью каталитическими активностями: ДНКазной, РНКазной, АТРазной, фосфатазной, протеолитической, амилолитической, каталазной, пероксидазной и оксидоредуктазной; а также оказывает цитотоксическое действие на клетки линий MCF-7, RPMI 8226, HepG2, причем наиболее выраженный эффект наблюдается на клетках линии MCF-7.

Во второй части работы разработан протокол выделения высокоочищенных препаратов экзосом из плаценты человека, который включает комбинацию методов ультрацентрифугирования, ультрафильтрации, гель-фильтрации и аффинной хроматографии на анти-CD81-сефарозе. Важно отметить, что «чистота» препаратов экзосом после каждого этапа выделения анализировалась с помощью просвечивающей

электронной микроскопии. Экзосомальная природа полученных плацентарных везикул подтверждена с помощью иммуноэлектронной микроскопии и проточной цитометрии. Высокоочищенные экзосомы плаценты человека содержат не более 15 белков с различными функциями: транспортные белки, ферменты метаболизма, белки адгезии, белки цитоскелета, белки иммунной системы, Ca^{2+} -зависимые фосфолипид-связывающие белки. В работе впервые было показано, что экзосомы плаценты содержат не только белки, но и пептиды. **Научная новизна** результатов исследования, представленных в этом разделе диссертации, не вызывает сомнений.

В **заключении** кратко суммированы все полученные в настоящей работе оригинальные результаты. Интерпретация результатов, предложенная автором, логична и хорошо аргументирована.

Выводы обоснованы и соответствуют полученным результатам.

В рамках общих требований к оформлению диссертации приятно отметить, что диссертация написана логично, хорошим русским языком. Основные результаты работы опубликованы в 4 статьях зарубежных рецензируемых журналов, представлены на 11 российских и 4 международных конференциях. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и публикациям автора по исследуемой проблеме.

Замечания и вопросы по содержанию работы

Обзор литературы превышает необходимый для этого исследования объем. В то же время в нем отсутствует описание олигомерных структур, являющихся аналогами стабильного высокомолекулярного мультибелкового комплекса плаценты, охарактеризованного в данной работе. Кроме того, в обзоре не всегда выдерживается аналитический стиль изложения литературных данных и часть текста напоминает справочную компиляцию информации.

При определении цитотоксического эффекта выделенного мультибелкового комплекса была использована панель клеточных линий. В частности, клетки линий MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), RPMI8226 (множественная миелома человека), HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека) и LMTK (мышинные фибробласты). Вызывает удивление выбор линии LMTK. Чем обоснован выбор мышинных фибробластов при тестировании белкового комплекса плаценты человека?

В главе «Результаты и их обсуждение» не обсуждены данные, указывающие на значительное сходство белкового состава стабильного высокомолекулярного комплекса и высокоочищенных экзосом плаценты. Считаю, что это важный вопрос, поскольку он может

быть связан с обсуждением целей и функции высокомолекулярного белкового комплекса и экзосом.

Указанные замечания, как и незначительное число опечаток и неудачных выражений не портят общее хорошее впечатление от диссертационной работы и не могут повлиять на ее окончательную оценку.

Таким образом, диссертационная работа Бурковой Евгении Евгеньевны «Протеомный анализ белковых комплексов и экзосом плаценты человека», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия», является законченной работой и соответствует паспорту специальности. Содержание работы соответствует критериям, установленным 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 кандидата биологических наук. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями № 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а ее автор Евгения Евгеньевна Буркова, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия».

Главный научный сотрудник,
заведующий лабораторией молекулярных
механизмов патологических процессов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института цитологии и генетики СО РАН

Доктор биологических наук

Мордвинов Вячеслав Алексеевич

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, д. 10
e-mail: mordvin@bionet.nsc.ru; тел: +7 (383) 363-49-01*2201

Подпись Мордвинова В.А. заверяю

Ученый секретарь ИЦГ СО РАН



к.б.н. Орлова Г.В.

17 июня 2020 г.