



УТВЕРЖДАЮ:

Директор ИМКБ СО РАН

Д.Б.Н.

С.А. Демаков

25 февраля 2018 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук о научно-практической значимости диссертационной работы Запорожченко Ивана Андреевича «МикроРНК плазмы крови в норме и при раке легкого: пробоподготовка, профилирование экспрессии, биоинформатический анализ и верификация потенциальных маркеров», представленную в диссертационный совет Д 003.045.01 на базе ФБГУН Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Современные исследования показывают, что микроРНК являются ключевыми регуляторами экспрессии генетического материала и играют важную роль в контроле жизнедеятельности живых клеток, включая такие важные процессы как клеточный цикл и клеточная смерть, рост и дифференцировка клеток, а нарушение их экспрессии способствует развитию многих заболеваний человека, в том числе сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Отдельные аспекты экспрессии микроРНК в опухолевых клетках активно изучают для получения новых знаний о развитии рака, а исследование опухолеспецифичных микроРНК в кровотоке может способствовать созданию онкодиагностических систем нового поколения в формате «жидкой» биопсии. В этом контексте не только научная, но и практическая **актуальность** темы исследования не вызывает сомнений, особенно с учетом неутешительной эпидемиологической статистики рака легкого.

Научная новизна. Разработана новая схема поиска онкомаркеров среди циркулирующих микроРНК крови. Предложена диагностическая панель для выявления рака легкого, составленная из пар микроРНК. Результаты работы подтвердили

перспективность использования циркулирующих микроРНК крови для разработки онкодиагностических систем. Получению этих результатов способствовало использование предложенного оригинального метода получения препаратов микроРНК из плазмы крови.

Диссертационная работа Запорожченко И.А. имеет классическую структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 170 страницах машинописного текста, включает 24 рисунка, 17 таблиц и 2 приложения. Список цитируемых литературных источников включает 643 наименования.

Глава 1 «Обзор литературы». Первая глава диссертации представляет собой обзор современной литературы по теме диссертации. Первые два раздела главы посвящены краткому описанию особенностей микроРНК и особенностям их циркуляции в крови, в первую очередь составу и биологии содержащих их рибонуклеопротеиновых и липопротеиновых комплексов и мембранных везикулярных структур. Следующие разделы посвящены описанию микроРНК в контексте онкологических заболеваний человека и, в особенности, рака легкого. Завершающий раздел посвящен современной методологии исследования циркулирующих внеклеточных микроРНК. Следует отметить, что автором проделана значительная работа по описанию современного состояния дел в нескольких релевантных областях знаний с привлечением огромного количества литературных источников (643 наименования). Обзор литературы позволяет погрузиться в тематику исследования и содержит всю основную информацию, необходимую для понимания и интерпретации полученных результатов.

Глава 2 «Материалы и методы». Во второй главе приведено подробное описание использованных в работе материалов и методов исследования. В диссертации использованы как классические методы молекулярной биологии, так и ряд биоинформатических и статистических подходов к анализу масштабных данных экспрессии микроРНК.

Глава 3 «Результаты и их обсуждение». Третья глава посвящена описанию полученных результатов и содержит три основных блока.

На первом этапе была проведена разработка и оптимизация однофазной методики выделения РНК, основанной на водно-органических смесях Фолча для экстракции липидных соединений. При помощи биохимических и молекулярно-биологических методов показана эффективность представленного метода в сравнении с традиционным методом кислой фенол-хлороформной экстракции и продемонстрирована возможность его

использования для получения препаратов циркулирующих микроРНК, содержащихся в крови человека.

Второй блок посвящен пилотному исследованию 7 ранее выявленных микроРНК (miR-19b, miR-21, miR-25, miR-125b, miR-126, miR-205, miR-183) в качестве онкомаркеров рака легкого при помощи количественного ОТ-ПЦР анализа против контрольной микроРНК miR-16. Обнаружены статистические отличия концентрации микроРНК miR-19b, miR-21, miR-25 и miR-183 в плазме здоровых добровольцев и больных немелкоклеточным раком легкого, причем концентрация разных наборов микроРНК была изменена в плазме больных плоскоклеточным раком легкого и аденокарциномой легкого по сравнению со здоровыми донорами. На основании выявленных различий автором предложена регрессионная модель из двух микроРНК (miR-19b и miR-183) которая позволила выявлять больных раком легкого с 94,74% чувствительностью и 95,24% специфичностью. Дополнительно показано изменение концентрации miR-19b и miR-125b в результате неoadъювантной химиотерапии и оперативного удаления опухоли у больных раком легкого. Кроме того, автором продемонстрированы тенденции, связывающие выживаемость пациентов с концентрацией ряда микроРНК в плазме крови.

Третьей и заключительной частью работы был двухстадийный поиск микроРНК-онкомаркеров рака легкого в крови для создания диагностической панели, более устойчивой к эффекту выборки. Сначала автором было проведено масштабное исследование концентрации микроРНК в плазме крови больных раком легкого и здоровых добровольцев при помощи ПЦР-микрочипов и выявлены 18 дифференциально экспрессированных микроРНК, причем установлено, что схожие изменения экспрессии ранее наблюдали в ткани опухоли больных раком легкого в рамках проекта The Cancer Genome Atlas. Для формирования диагностической панели были рассмотрены пары микроРНК и с помощью комбинации биоинформатических и биологических подходов автором был выбран набор наиболее перспективных микроРНК онкомаркеров. Данные о концентрации выбранной панели верифицировали на независимой выборке с добавлением дополнительной контрольной группы больных воспалительным заболеванием легкого – эндобронхитом. Для пар микроРНК, различия в концентрации которых подтвердились, была установлена связь с клиническими параметрами рака легкого, такими как размер, стадия и распространенность в лимфоузлы. При помощи статистического подхода LASSO-регрессии с bootstrap-оптимизацией путем множественных повторений была выбрана диагностическая панель из 14 микроРНК объединенных в 10 пар, которая позволила разделить группы онкологических больных и доноров без онкологических заболеваний с чувствительностью 94,8% и специфичностью 90%.

В разделе «**Заключение**» изложены полученные автором результаты, предложена оценка их значимости в контексте представленного исследования и современного состояния научной проблемы.

Выводы диссертационной работы изложены четко и логично, полностью соответствуют полученным результатам.

В целом диссертационная работа производит впечатление законченного самостоятельного исследования.

При рассмотрении диссертационной работы возникли следующие **вопросы и замечания**:

- Представленный в работе обзор литературы затрагивает несколько широких областей знаний, вследствие чего занимает значительную часть диссертационной работы (48 страниц текста), а для его написания потребовалось использование большего числа литературных источников. Без умаления усилий автора, возможно, более эффективным подходом было бы сосредоточиться на детальном описании непосредственно узкой проблемы исследования, а для заполнения пробелов апеллировать к соответствующим трудам других авторов.
- Мотивацию для продолжения работы после завершения второго этапа исследования было бы целесообразно четко указать в конце соответствующего раздела, в то время как в представленной версии диссертационной работы она фрагментирована на несколько разнесенных по структуре диссертации блоков, и логический переход становится полностью ясен только после прочтения заключения.
- Отдельным пожеланием является более прозрачное и детальное описание использованных автором биоинформатических подходов, поскольку это является одним из ключевых моментов работы и представляет интерес для
- В тексте диссертационной работы выявлен небольшой процент орфографических и пунктуационных ошибок. Кроме того, в работе присутствуют элементы авторского стиля, которые могут затруднить восприятие информации – сложные и громоздкие предложения, редкие неудачные фразы с использованием англицизмов.

При всем этом, вышеперечисленные замечания и недочеты являются частными и не снижают научной и практической ценности работы.

Заключение о соответствии работы предъявляемым требованиям.

По материалам диссертации опубликовано 7 публикаций, в том числе патент РФ на метод выделения микроРНК, и не менее 10 тезисов докладов, представленных на российских и международных конференциях. В опубликованных работах полностью отражено содержание диссертации. Автореферат диссертации полностью отражает содержание текста диссертации.

Представленная к защите диссертационная работа Запорожченко Ивана Андреевича «МикроРНК плазмы крови в норме и при раке легкого: пробоподготовка, профилирование экспрессии, биоинформатический анализ и верификация потенциальных маркеров» является законченным научным исследованием и представляет интерес для современной науки и медицины. Работа соответствует квалификационным критериям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842.

Автор диссертации, Запорожченко И.А., заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Отзыв на диссертационную работу подготовлен в лаборатории геномики Отдела регуляции генетических процессов ИМКБ СО РАН, обсужден и утвержден на семинаре лаборатории от 23.11.2018.

зав. лабораторией геномики ИМКБ СО РАН

к.б.н., Белякин Степан Николаевич

Подпись заверяю:

Учёный секретарь ИМКБ СО РАН

к.б.н., Ахмерова Лариса Григорьевна



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН).

630090, г. Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева 8/2

Тел: (383) 363-90-42

Факс: (383) 363-90-78

Веб-сайт: mcb.nsc.ru

E-mail: info@mcb.nsc.ru, belyakin@mcb.nsc.ru