

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Запорожченко Ивана Андреевича «МикроРНК плазмы крови в норме и при раке легкого: пробоподготовка, профилирование экспрессии, биоинформационический анализ и верификация потенциальных маркеров, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03-молекулярная биология

Актуальность темы. Рак легкого (РЛ) занимает лидирующие позиции по показателям высокой смертности среди других злокачественных заболеваний человека. Во многом, это связано с тем, что почти все подтипы РЛ малоочувствительны к известным методам лечения. Определенный прогресс достигнут в лечении немелкоклеточного РЛ, для которого применяются таргетные препараты, ингибиторы EGFR, главным образом его мутантных форм. Ведется активный поиск таких препаратов и против других форм РЛ. Но надо признать, что пока это не привело к заметному прогрессу и значительному увеличению выживаемости больных. Поэтому актуальной проблемой является дальнейший поиск молекулярных мишеней РЛ, как для диагностики, так лечения и прогноза. Малоисследованной проблемой являются эпигенетические аспекты канцерогенеза легких, в том числе изучение роли микроРНК в этом процессе. Исследования последних лет показали, что изменения профиля экспрессии микроРНК характерны для многих видов рака, включая РЛ. Более того, такие изменения обнаружены и в биологических жидкостях, в том числе в крови онкологических больных. Выявление изменений в экспрессии онкогенных и онкосупрессорных микроРНК в плазме крови больных РЛ может способствовать поиску новых мишеней для диагностики, лечения и прогноза этого заболевания. Однако на сегодняшний день в этой области остаются нерешенные вопросы, связанные как с необходимостью оптимизации и унификации технических и аналитических подходов к анализу микроРНК-онкомаркеров, так и с методологией поиска диагностически значимых микроРНК, а также с оценкой вклада индивидуальных циркулирующих микроРНК в патогенез и клиническую диагностику рака легкого. В связи с этим актуальность диссертационной работы Запорожченко И. А., нацеленная на решение данных вопросов, не вызывает сомнения.

Научная новизна диссертационной работы также не вызывает сомнения. Автором впервые предложен и разработан оригинальный метод выделения микроРНК из плазмы крови при помощи однофазной водно-органической смеси, показавший высокую эффективность и специфичность. Автор впервые показал, что, несмотря на

перспективность использования циркулирующих миРНК крови для диагностики немелкоклеточного рака легкого, важно учитывать нестабильность отдельных миРНК, а также иррационально подобранных панелей миРНК, что не позволяет использовать их в качестве надежных систем эффективной диагностики рака легкого. Автором впервые выполнено профилирование экспрессии 179 миРНК в крови больных и здоровых доноров и проведен масштабный двухстадийный поиск миРНК-маркеров немелкоклеточного рака легкого. Им был предложен новый подход к анализу данных профилирования миРНК плазмы крови, сочетающий использование статистических и биоинформационных подходов с данными о биологической активности отдельных миРНК, который позволяет выбрать устойчивую панель миРНК-маркеров рака легкого. Комбинация вышеперечисленных подходов была впервые предложена в данной работе.

Теоретическая и практическая значимость результатов диссертационного исследования. Проведенные исследования важны для фундаментальной науки, так как полученные результаты расширяют наши представления о роли миРНК в канцерогенезе легких, а полученные результаты направляют исследователей на адресное изучение этапов механизмов канцерогенеза. Разработка технологии выделения миРНК из плазмы крови имеет, несомненно, практическую значимость и перспективу для использования таких технологий в клинической медицине. Данный метод может быть использован в качестве основы для изготовления коммерческих наборов, предназначенных для получения препаратов миРНК из плазмы крови, пригодных для использования в клинических диагностических лабораториях. Предложенная автором панель из 10 пар, состоящих из 14 миРНК, позволяющая с высокой чувствительностью и специфичностью детектировать немелкоклеточный рак легкого, может быть использована для выявления, дифференциальной диагностики и мониторинга прогрессирования заболевания.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Основные результаты по созданию технологий выделения миРНК из плазмы крови больных РЛ и здоровых доноров, а также измерению их концентрации и валидации их клинической значимости получены лично автором или при его непосредственном участии. Достоверность полученных в диссертационной работе результатов не вызывает сомнения. Все исследования проведены с привлечением современных экспериментальных методик молекулярной биологии и

биоинформатики высокого технологического уровня. Выводы и рекомендации диссертационной работы корректны и в полной мере отражают полученные результаты

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа Запорожченко Ивана Андреевича изложена на 170 страницах машинописного текста. Она состоит из глав «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы», «Приложение 1 и 2». Список цитируемой литературы содержит 643 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 24 рисунками.

Во введении автор обосновывает актуальность выбранного исследования, на основании чего формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из пяти больших глав. Первая глава посвящена особенностям строения, биогенеза и функции микроРНК в клетках человека. В этой главе представлена исчерпывающая информация о процессинге и механизмах действия микроРНК. Вторая глава посвящена циркулирующим микроРНК крови человека, включая кинетику циркуляции и выведения их из кровяного русла. Автором отмечаются недостатки современных знаний и подходов к изучению внеклеточных микроРНК крови человека. В 3-й главе представлены данные научной литературы о роли микроРНК в развитии онкологических заболеваний легкого и их использовании в диагностике и мониторинге терапии. В 4-й главе рассматривается место РНК в патогенезе и диагностике онкологических заболеваний легкого. Наконец, в 5-й главе представлены существующие на сегодняшний день методы выделения, детекции и анализа циркулирующих микроРНК крови. В целом, автором глубоко проанализированы современные проблемы, касающиеся возможности использования циркулирующей микроРНК для диагностики РЛ и ответа больных на проводимое лечение.

Материалы и методы исследования адекватны поставленной цели и решаемым задачам. Исследования выполнены на образцах плазмы крови здоровых доноров, больных немелкоклеточным раком легкого и эндобронхитом. В работе использован необходимый набор современных методов молекулярной биологии и биоинформатики. Автором были разработаны и использованы методы выделения РНК, в том числе при помощи силикатных носителей, количественная ОТ-ПЦР с TaqMan зондами, масштабная количественная SYBR Green ОТ-ПЦР микроРНК-мишеней с LNA-праймерами, биоинформационные и статистические методы анализа данных, в том числе построение и перевыборочная (bootstrap) оптимизация регуляризованных (LASSO) регрессионных моделей. В работе использован биостатистический анализ данных по экспрессии

микроРНК в клетках опухолей легкого, полученных из базы данных проекта The Cancer Genome Atlas.

В главе «Результаты исследования», где представлены результаты собственных исследований, последовательно приводятся этапы проведения экспериментов. На первом этапе (Глава 3.1) представлен метод получения препаратов микроРНК из плазмы крови. Отработана схема однофазного протокола для выделения микроРНК из крови, определена оптимальная для денатурации комплексов и связывания микроРНК с сорбентом концентрация ГИТЦ с использованием радиоактивно меченого синтетического рибоолигонуклеотида последовательности miR-21. В итоге разработанный однофазный метод позволил эффективно выделять микроРНК из всех комплексов, содержащих микроРНК в крови, со сравнимой эффективностью и большей скоростью, чем метод экстракции кислым фенол-хлороформом. Далее было проведено исследование экспрессии опухолеспецифических микроРНК в крови здоровых доноров и пациентов с диагнозом РЛ (Глава 3.2). В этом разделе диссертации автором проведена тщательная разработка метода количественного определения циркулирующих микроРНК с помощью ОТ-ПЦР, оценена зависимость экспрессии микроРНК от пола и возраста доноров. Также была определена зависимость экспрессии микроРНК от клинико-патологических характеристик больных РЛ и диагностическая ценность данных молекулярных маркеров. Заключительная глава диссертационной работы посвящена поиску биомаркеров РЛ по профилю экспрессии циркулирующих микроРНК плазмы крови (Глава 3.3) с целью создания диагностической панели.

Результаты проведенного исследования убедительно показали, что разработанный автором однофазный метод выделения циркулирующих микроРНК плазмы крови человека позволяет получать препараты микроРНК, свободные от примесей и ингибиторов обратной транскриптазы и термостабильной ДНК-полимеразы. Данный метод позволил оценить экспрессию 7-ми микроРНК, потенциальных маркеров рака легкого. Среди них miR-19b и miR-183 представляют наибольшую диагностическую ценность и позволяют отличать больных раком легкого от здоровых доноров с чувствительностью 94,74% и специфичностью 95,24%. Показано, что отношение концентраций miR-125b и miR-19b изменяется в ходе неоадьювантной химиотерапии и коррелирует с эффективностью лечения и выживаемостью пациентов, хотя отмечается определённая нестабильность их использования в качестве маркеров. В работе выявлена дифференциальная экспрессия 18-ти микроРНК в плазме крови больных плоскоклеточным раком легкого микроРНК, что согласуется с данными проекта The Cancer Genome Atlas об экспрессии микроРНК в опухолевых клетках. Методом парной

нормализации выявлена 241 пара микроРНК, экспрессия которых достоверно отличается в плазме крови больных раком легкого и здоровых доноров. На основании этих результатов автором сформирована панель из 19-ти микроРНК для клинической верификации, которая показала, что экспрессия 14-ти пар микроРНК достоверно зависит от анатомической стадии РЛ, экспрессия 39-ти пар связана с размером опухоли, а экспрессия 18-ти пар – со степенью распространения в лимфатические узлы (N) по классификации TNM. Подтверждена стабильность и диагностическая эффективность экспрессии 35 пар микроРНК, из которых 15 наиболее диагностически-значимых пар микроРНК позволяют разделять больных плоскоклеточным раком и аденокарциномой легкого от здоровых доноров и больных эндобронхитом со значением площади под ROC-кривой не менее 0,7. Используя метод bootstrap-оптимизированной LASSO-пенализованной логистической регрессии, автор сформировал панель из 10 пар, одновременный анализ экспрессии которых позволяет увеличить эффективность разделения групп с чувствительностью 94,8% и специфичностью 90% (AUC=0,979).

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на 11-ти российских и международных конференциях. По результатам диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК и индексируемых в международных базах Web of Science и/или Scopus, а также имеется патент РФ (№ 2558292 от 1 июля 2015 г) о методе выделения микроРНК из плазмы крови.

Принципиальных замечаний к работе нет. При прочтении возник вопрос для обсуждения: в диссертационной работе, на мой взгляд, не прозвучало вывода автора, удалось ли ему решить задачу поиска перспективных микроРНК-маркеров для дифференциальной диагностики немелкоклеточного рака легких и нужны ли дальнейшие исследования их клинической значимости?

Заключение. Диссертационная работа Запорожченко Ивана Андреевича на тему: «МикроРНК плазмы крови в норме и при раке легкого: пробоподготовка, профилирование экспрессии, биоинформационический анализ и верификация потенциальных маркеров», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология, соответствует критериям пп. 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842. В представленной работе решены научно-практические и научные проблемы, связанные с изучением микроРНК, циркулирующих в крови человека: разработан новый метод для получения препаратов микроРНК из крови человека; получены данные о концентрации потенциальных

онкоспецифичных микроРНК в плазме крови больных раком легкого и контрольных групп; предложен подход к анализу таких данных с целью выявления микроРНК-маркеров и представлена перспективная панель микроРНК-биомаркеров рака легкого. Автор диссертационной работы заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

доктор биологических наук, профессор
Руководитель лаборатории
молекулярных механизмов канцерогенеза
Федерального исследовательского центра
фундаментальной и трансляционной
медицины.
Заведующая кафедрой клинической
биохимии медицинского факультета
Федерального государственного
автономного образовательного
учреждения высшего образования
«Новосибирский национальный
исследовательский государственный
университет»,
г. Новосибирск, 630117
ул. Тимакова 2/12
Телефон: +7 383 334 8840
E-mail: gulyaeva@niimb.ru

Гуляева Людмила
Федоровна

Подпись д.б.н., проф. Л.Ф. Гуляевой
заверяю:
Начальник отдела кадров ФИЦ ФТМ
Минеева О.М.

28 ноября 2018 г.

