

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Запорожченко Ивана Андреевича

**«МИКРОРНК ПЛАЗМЫ КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО:
ПРОБОПОДГОТОВКА, ПРОФИЛИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ,
БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ВЕРИФИКАЦИЯ
ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ»**

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.03 - молекулярная биология

Биология «некодирующих» РНК (non-coding RNA) активно исследуется в течение последних лет, при этом изменяются и расширяются традиционные представления о механизмах регуляции работы клеточного генома. После описания феномена РНК-интерференции (RNA interference), особый интерес исследователей привлекают микроРНК – класс коротких РНК молекул, выполняющих функцию пост-транскрипционной регуляции экспрессионной активности генома. К настоящему моменту достаточно полно изучен биогенез микроРНК, в клетках человека идентифицировано (с разной степенью достоверности) несколько тысяч различных микроРНК, показано, что эти молекулы участвуют в регуляции основных клеточных процессов. Очевидно, что достижения фундаментальной молекулярной биологии в этой области имеют перспективы практического применения. Так, характерные изменения состава и функциональной активности микроРНК наблюдаются в процессе неопластической трансформации клеток и развитии злокачественных опухолей. Играют ли эти изменения этиологическую роль или являются следствием геномных «событий» пока не понятно, но специфические особенности экспрессии внутриклеточных микроРНК описаны для многих онкологических нозологий. Эти данные указывают на возможность разработки новых диагностических подходов в практической онкологии. Кроме того, существование внеклеточных форм микроРНК и возможность выделения и количественного анализа этих молекул в

биологических жидкостях определяют перспективы создания новых методов т.н. жидкостной биопсии или (неинвазивной) диагностики. С учетом сказанного, разработка фундаментальной основы и методологической базы для создания метода диагностики рака на основе анализа циркулирующих в плазме микроРНК является актуальной научной задачей. Представленная работа сфокусирована на социально значимом заболевании (рак легкого занимает лидирующее место в статистике мужской онкологической смертности) – это определяет высокую практическую значимость исследования.

Диссертационная работа имеет традиционную структуру.

В разделе «Введение» изложены факты, определяющие актуальность работы, сформулирована цель и перечислены конкретные задачи исследования. Решения поставленных задач легли в основу положений, вынесенных на защиту.

«Обзор литературы» представляет собой глубокий анализ современных публикаций по ряду тем, включая биологию и биогенез внутриклеточных микроРНК, формы и кинетику циркулирующих микроРНК. Эта часть «Обзора литературы» имеет самостоятельную ценность, т.к. в отечественной научной литературе пока нет обзорных статей такого характера. Главы, посвященные роли микроРНК в развитии онкологических заболеваний и результатам исследований изменения профиля экспрессии микроРНК в клетках немелкоклеточного рака легкого и в циркуляции пациентов с этим заболеванием, имеют описательный характер, что отражает современное состояние исследований в данной области. В обзоре литературы изложены возможные подходы к выделению и анализу циркулирующих микроРНК. В целом, обзор литературы основан на анализе более чем 500 (!!!) источников, в нем глубоко и детально освещены научные данные, имеющее прямое отношение к теме исследования.

Раздел «Материалы и Методы» написан достаточно полно и подробно, на основании представленной информации все процедуры могут быть воспроизведены.

Результаты и обсуждения объединены в одну главу. С учетом разнопланового характера представленных научных данных (разработка метода выделения микроРНК, «иррациональный» и «рациональный» способ определения маркерных микроРНК, анализ экспрессии с помощью метода «парной нормализации») такое объединение оправдано. Разработка нового, относительно дешевого и эффективного, метода выделения РНК, позволяющего «сохранить» фракцию коротких молекул является несомненным

достижением автора. В рамках исследования проведено непосредственное сравнение предложенной технологии (однофазный метод) с традиционным методом фенол-хлороформной экстракции, показаны преимущества первого. Важность этого фрагмента работы подтверждается наличием патента и публикаций в высоко-рейтинговых журналах. Основную ценность диссертационной работы составляют результаты исследования экспрессии микроРНК в плазме и идентификация «маркерных» молекул. «Иррациональный» метод предполагал оценку экспрессии нескольких молекул, выбранных на основе анализа литературы. «Рациональный» метод имел традиционный дизайн, включавший этапы «широкого профайлинга» (обзорного анализа), выбора и верификации маркерных молекул на дополнительном клиническом материале. Применение метода «парной нормализации» в данном исследовании заслуживает особого внимания. В зарубежной и отечественной литературе есть примеры использования подобного подхода к анализу результатов профайлинга микроРНК в клинических образцах. В рамках представленного исследования автор разработал методику масштабного анализа массива экспрессионных данных с целью «машинного» определения диагностически значимой пар микроРНК. Это позволило существенно оптимизировать процесс поиска. Применение этого метода к результатам анализа 149 молекул микроРНК в трех исследуемых группах, численностью 40, 10 и 30, образцов, позволило идентифицировать 10 «эффективных» пар и сформировать панель из 14 молекул, которая позволяет разделять больных раком легкого и доноров контрольной группы с высокой достоверностью ($AUC=0,979$).

В «Заключение» автор представил критическую оценку полученных результатов, провел их сравнение с исследованиями аналогичного характера. Выводы логично вытекают из изложенных ранее результатов, закономерны и лаконичны.

Представленная диссертантом работа, безусловно, является завершенным научным исследованием, имеющим научную и практическую значимость. Материал, представленный в работе, был опубликован в рецензируемых журналах и многократно представлен на конференциях. Объем представленных в диссертационной работе научных данных очевидно превышает требования, предъявляемые к диссертационным работам, представляемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук. В качестве относительных недостатков диссертационной работы можно упомянуть следующие:

1. В обзоре литературы глубоко проанализированы методологические проблемы выделения микроРНК, представлены основные технологические подходы к оценке концентрации. При этом описанию метода, который был использован в исследовании (ОГ-ПЦР), посвящено

менее одной страницы. Известно, что малый размер молекулы микроРНК является основной проблемой эффективного применения ПЦР и в настоящее время разработаны различные технологии «удлинения» кДНК в процессе обратной транскрипции. Эти технологии могут быть универсальны (поли-аденилирование, лигирование «адапторных» последовательностей и т.д.) или микроРНК-специфичны (использование различной структуры праймеров для ОТ: «loop», «two-tailed» и т.д.), что отражается на результатах анализа и должно учитываться при дизайне исследования. С учетом значимой методологической составляющей представленного исследования, во-первых, и использования в ходе исследования принципиально различных технологий обратной транскрипции, во-вторых, - более полное освящение этой темы в обзоре было бы нелишним.

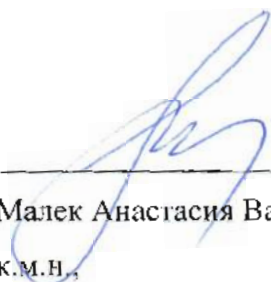
2. Научная ценность результатов, полученных путем «иррационального» подхода существенно ниже ценности результатов, полученных путем примененного затем «рационального» метода. Из семи молекул, выбранных по данным литературы, для двух была подтверждена диагностическая значимость. С учетом методологических различий, обсуждавшихся автором в разделе «Обзор литературы» (!!!), полученные скромные результаты не представляются неожиданными. В целом, результаты «иррационального» подхода служат хорошим доказательством правильности «рационального» метода, но они лишь незначительно обогащают научную ценность диссертации.

3. Завершающим этапом «рационального» подхода к решению задачи поиска маркерных микроРНК была верификация результатов «широкого профайлинга»: экспрессия 19-ти микроРНК была верифицирована на независимой выборке больных раком легкого (n.30), больных эндобронхитом (n.10) и здоровых доноров (n.20) с использованием той же платформы, что и была использована для поиска маркерных микроРНК (miRCURY LNA miRNA qPCR), т.е. платформы, предполагающей анализ 179 молекул. Это не совсем понятно.

Перечисленные выше недостатки являются условными, они не снижают ценности исследования, проведенного диссертантом. В целом диссертация Запорожченко И.А. соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, в том числе пункту 9 «Положение о присуждении ученых степеней». В представленной работе решен ряд научных проблем, которые определяют возможность создания и последующего внедрения в практику нового метода ранней диагностики социально значимого онкологического заболевания – рака легких. В частности, разработана новая методология получения препаратов микроРНК плазмы крови,

с помощью которой получены новые данные об экспрессии маркерных микроРНК в крови, предложен и использован оптимизированный подход к их «машинному» анализу, в результате чего выявлен набор маркерных микроРНК. Иван Андреевич Запороженко безусловно заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

28.11.2018


Малек Анастасия Валерьевна
к.м.н.,

зав. лаборатории онкоэндокринологии

"Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова"
Министерства здравоохранения Российской Федерации

адрес: г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, дом 68

телефон: 8-960-250-46-80

e-mail: anastasia@malek.com

Подпись 

заверяю



Г.С. Киреева