

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Гуляевой Людмилы Федоровны на диссертационную работу Савельевой Анны Валентиновны «Распределение внеклеточных РНК во фракциях плазмы крови человека и влияние нуклеофозмина 1 на проникновение синтетических аналогов таких РНК в клетки млекопитающих», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Актуальность темы. Одним из активно развивающихся направлений современной молекулярной биологии является исследование внеклеточных нуклеиновых кислот, циркулирующих в крови человека. Такие научные работы проводятся, как правило, с целью применения полученных результатов для диагностики, прогноза и лечения различных заболеваний человека. Результаты проводимых исследований показали, что нуклеиновые кислоты, в частности РНК, могут находиться либо в составе сложных липопротеиновых комплексов, либо в составе различных мембранных везикул. Такое разнообразие форм циркулирующих нуклеиновых кислот значительно усложняет использование внеклеточных РНК в диагностических целях. Поэтому проблема исследования распределения таких РНК в различных фракциях крови является в настоящее время первостепенной задачей для дальнейшего развития методов жидкостной биопсии. В диссертационной работе Савельевой А.В. поставлена цель: провести сравнительный анализ состава внеклеточных РНК фракций плазмы крови человека в норме и при развитии онкологического заболевания, а также оценить эффективности проникновения комплексов синтетических аналогов внеклеточных РНК и нуклеофозмина 1 в клетки человека. В связи с вышесказанным своевременность и актуальность поставленной цели исследования не вызывает сомнения.

Научная новизна диссертационной работы Савельевой А.В. также не вызывает сомнения. В этой работе многие результаты, действительно, получены впервые. Так, впервые проведен сравнительный анализ состава РНК внеклеточных комплексов, циркулирующих в крови здоровых людей и больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Впервые показано, что внеклеточные

немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Впервые показано, что внеклеточные везикулы плазмы крови, осаждаемые ультрацентрифугированием при 160 000 g, отличаются повышенным содержанием фрагментов малых ядерных РНК U1, U5A/B и U6 и пониженным содержанием фрагментов малых ядрышковых РНК. В составе РНК фракций крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ выявлено 8 новых форм кольцевых РНК, ранее не аннотированных в базе данных circbase.org. Впервые показано, что полноразмерные кольцевые РНК циркулируют в крови в составе комплексов с мембранными везикулами крови. Впервые также проведен анализ влияния рекомбинантного белка нуклеофозмина 1 на проникновение синтетических аналогов внеклеточных РНК плазмы крови в клетки человека и показано, что протяженные структурированные РНК (> 300 н.) в комплексе с нуклеофозмином 1 эффективнее накапливаются в клетках по сравнению со свободными РНК.

Теоретическая и практическая значимость результатов диссертационного исследования. Результаты диссертационной работы Савельевой А.В., показавшие различный состав циркулирующих РНК во фракциях крови здоровых людей и пациентов с диагнозом НМРЛ, представляют несомненный интерес для фундаментальной науки, занимающейся молекулярными механизмами канцерогенеза легких. Работа также имеет ярко выраженную практическую направленность, так как выявленные специфические РНК могут быть основой для разработки новых тест-систем для диагностики и, возможно, прогноза НМРЛ. Разработанный автором метод доставки аналогов синтетических РНК в клетки, основанный на применении РНК-связывающих белков, может стать основой для создания РНК-трансфектантов белковой природы, что может быть перспективным для проведения специфической таргетной терапии в будущем.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Основные результаты по определению циркулирующих РНК в различных фракциях крови здоровых и пациентов с НМРЛ, а также изучению роли рекомбинантного белка нуклеофозмина 1 в проникновении синтетических аналогов внеклеточных РНК плазмы крови в клетки человека, получены лично автором. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Все исследования проведены с использованием адекватных

контролей, привлечением современных экспериментальных методик самого высокого технологического уровня и статистического анализа. Выводы и рекомендации диссертационной работы корректны и в полной мере отражают полученные результаты.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 135 страницах, она содержит 17 рисунков и 7 таблиц. Диссертационная работа Савельевой А.В. включает введение, обзор литературы, главу «Экспериментальные методы», где представлены материалы и методы, результаты и обсуждение результатов, заключение, выводы, список работ, опубликованных по теме диссертации, список используемой литературы (270 источников) и приложение.

Во введении автор обосновывает актуальность выбранного исследования с современных позиций, на основании чего четко формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов.

Обзор литературы состоит из введения, 5-ти глав и заключения. Во введении к обзору автор ставит задачу анализа имеющейся научной литературы о составе белков и РНК везикул крови. Во второй главе приведен анализ внеклеточных РНК-содержащих комплексов крови человека. Последующие главы посвящены биогенезу внеклеточных мембранных везикул, транспорту белков и РНК в экзосомы, секреции экзосом, а также интернализации экзосом клетками-реципиентами. Аналогичный анализ проведен для других РНК-содержащих комплексов в норме и онкологической патологии. Автор справедливо отмечает, что исследований о роли таких комплексов в развитии патологий человека известно пока крайне мало.

Материалы и методы исследования адекватны поставленной цели и решаемым задачам. В работе использован необходимый набор современных методов молекулярной и клеточной биологии.

В главе «Результаты и обсуждение», где представлены результаты собственных исследований, последовательно приводятся этапы проведения экспериментов от фракционирования крови человека и анализа содержания в полученных фракциях мембранных везикул до детального изучения состава РНК в этих комплексах у здоровых доноров и пациентов с диагнозом НМРЛ.

Заключительной главой этого раздела диссертации являются результаты по использованию нуклеоплазмина 1 для транспорта внеклеточных РНК в клетки человека. Полученные автором результаты корректно обсуждены с позиций современных достижений в области исследования циркулирующих РНК в крови человека в норме и патологии.

Считаю, что результаты проведенного исследования убедительно показали, что автором получены новые интересные данные о том, что состав различных микроРНК в исследуемых фракциях крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ существенно различается. С помощью высокопроизводительного секвенирования РНК исследуемых фракций крови идентифицировано 88 кольцевых транскриптов, 8 из которых являются новыми, не аннотированными ранее, формами кольцевых РНК человека. Автором показана также возможность использования рекомбинантного аналога нуклеофозмина 1 (NPM1-His 6) для доставки РНК в клетки человека. Такие результаты, без сомнения, представляют интерес для научно-исследовательских учреждений, занимающихся проблемами циркулирующих нуклеиновых кислот в крови человека. Использование результатов исследования, полученных Савельевой А.В., представляется также целесообразным для генетиков, биохимиков, молекулярных биологов и молекулярных онкологов.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на многих российских конференциях и международных конференциях. По результатам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК.

Выводы диссертации соответствуют цели, задачам и основным положениям. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Вместе с тем, при прочтении работы у меня возникли некоторые вопросы:

1. В тексте диссертации присутствуют грамматические ошибки, даже в «Оглавлении» диссертации (см. Главу 1).
2. Достаточно ли проводить анализ только на гемолиз эритроцитов (стр. 57)? Можно ли ожидать повреждение других клеток крови при проведении исследования?
3. Все же остается вопрос о наличии митохондрий во фракции 16 000g.

Автор обсуждает их тромбоцитарное происхождение (стр. 67), однако остается неясным, почему они не осаждались при 8000g?

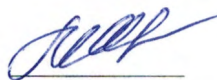
4. Хотелось бы знать мнение автора, удалось ли выявить перспективные маркеры для диагностики/прогноза НРКЛ в проделанной работе?

Приведенные выше вопросы носят дискуссионный характер и не снижают моей высокой оценки выполненной работы.

Заключение. Диссертационная работа Савельевой Анны Валентиновны на тему «Распределение внеклеточных РНК во фракциях плазмы крови человека и влияние нуклеофозмина 1 на проникновение синтетических аналогов таких РНК в клетки млекопитающих» соответствует критериям пп. 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, и представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, а ее автор Савельева Анна Валентиновна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент

доктор биологических наук,
профессор, руководитель лаборатории
молекулярных механизмов
канцерогенеза Федерального
государственного бюджетного
научного учреждения «Научно-
исследовательский институт
молекулярной биологии и биофизики»
630117, Россия, г. Новосибирск,
ул. Тимакова, 2/12,
Тел. 8(383) 335-98-47
imbb@niimbb.ru
<http://niimbb.ru>



Гуляева Людмила
Федоровна

Подпись профессора Гуляевой Л.Ф.

заверяю:

Ученый секретарь, к.б.н.


Ольга Герасимовна


27 апреля 2017 г.