

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора ФГБУ «НМИЦ  
онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России по научной  
и инновационной работе,

член-корр. РАН, д.м.н., профессор

В.Б. Матвеев

« 28 »  2021г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Палкиной Надежды Владимировны на тему «Роль микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-3065 и miR-204 в регуляции ключевых механизмов опухолевой прогрессии меланомы кожи», представленной к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки).

### Актуальность темы выполненной работы

Молекулы микроРНК, по разным данным, регулируют экспрессию как минимум половины транскриптома человека путем ингибирования трансляции или запуская процессы деградации мРНК и, благодаря данным свойствам, вызывают значительный интерес ученых, работающих в области клеточной биологии, как ключевые молекулы, координирующие не только физиологические процессы клеток, но и патологические, в том числе процессы канцерогенеза. Поэтому изучение функциональных свойств открытых совсем недавно, в девяностые годы прошлого столетия, молекул микроРНК является востребованным направлением с позиций современного научного направления – молекулярной онкологии.

Меланома является относительно редким типом рака кожи (около 1%), но наряду с этим обладает самыми высокими показателями летальности – до

75% всех смертельных случаев из-за рака кожи. Заболеваемость меланомой с каждым годом растет во всем мире и, несмотря на разработку новых методов лечения, эффективность лечения метастатической формы меланомы остается низкой, а резистентность к терапии также увеличивается.

Такие неутешительные данные позволяют считать изучение функций указанных эпигенетических регуляторных молекул РНК для оценки потенциальной возможности их применения в диагностике, прогнозирования течения заболевания и лечения диссеминированной меланомы кожи актуальным направлением современной науки.

Диссертация Палкиной Надежды Владимировны посвящена решению обозначенного выше актуального вопроса, а именно – обнаружению совокупности известных микроРНК, изменяющих свой уровень экспрессии в злокачественных меланоцитах, идентификации из нее молекул микроРНК, отвечающих за регуляцию опухолевого роста по данным биоинформатического анализа сигнальных путей и генов-мишеней, а также исследованием функций данных микроРНК в клетках меланомы кожи *in vitro* и выявлением новых механизмов опухолевой прогрессии меланомы кожи с их участием, что является значимым научным достижением в области фундаментальных наук и может являться базисом для дальнейших исследований с целью разработки новых методов мишеневого лечения диссеминированной меланомы кожи на основе конкретных молекул микроРНК, а также внутриклеточных молекулярных механизмов при их участии.

### **Связь выполненной работы с планами соответствующих отраслей науки**

Диссертационная работа Н.В. Палкиной связана с исследованием механизмов опухолевой прогрессии клеток меланомы кожи на молекулярном уровне, что соответствует современному направлению медицинской науки и практики. Научно-квалификационная работа выполнена по плану научно-

исследовательской работы федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России) на базе кафедры патологической физиологии имени профессора В.В. Иванова ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России.

Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта фонда Президента РФ для молодых ученых «Молекулярно-генетические маркеры диагностики и прогнозирования течения меланомы кожи» (МД-901.2013.7, 2013-2014 г.г.), гранта РНФ «Экспрессия и роль микроРНК при меланоме кожи» (14-15-00074, 2014-2018 г.г.).

**Новизна исследования, полученных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертационное исследование Н.В. Палкиной отличается научной новизной и удовлетворяет запросам фундаментальных направлений науки и практической медицины. В его основу положено изучение роли и механизмов влияния молекул микроРНК, экспрессия которых в меланоцитах повышается и снижается при развитии меланомы кожи, на различные аспекты жизнедеятельности опухолевой клетки, связанные с прогрессированием опухоли – пролиферацию и клоногенность клеток, их метаболизм, метастазирование, уклонение от апоптотической гибели.

Автором исследования впервые установлены функциональные роли дифференцированно-экспрессирующихся микроРНК при меланоме miR-10ba, miR-4286, miR-204 и miR-3065 в клетках меланомы кожи, а также впервые исследованы процессы пролиферации клеток, их клоногенность,

жизнеспособность, апоптоз, миграция и инвазия в условиях изменения уровней данных микроРНК, и установлены про- и противоопухолевые эффекты, на которые можно «опираться» при разработке противомеланомного лечения.

В ходе исследования были выявлены новые механизмы опухолевой прогрессии клеток меланомы кожи с участием микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-204 и miR-3065, заключающиеся в регуляции экспрессии конкретных генов-мишеней данных микроРНК в клетках, которыми являются онкогены и онкосупрессоры *APLN*, *FPGS*, *HMGAI*, *RRN3*, *GRP55*, *HIPK1*, *ITGA1*, *BCL2* и *TGFBR1*.

Кроме этого, Н.В. Палкина в своем исследовании впервые установила, что однотипные образцы меланоцитарных новообразований с разными способами фиксации несопоставимы для сравнения и анализа микроРНК, что несмотря на фундаментальный характер данной научной работы, имеет практическую ценность для специалистов, трудящихся в биомедицинской сфере, использующих в своей работе различный спектр методов молекулярной диагностики с целью оценки экспрессии микроРНК.

Выводы и основные положения сформулированы развернуто, полностью соответствуют поставленным задачам, отражают содержание диссертационной работы, ее основные этапы и научную новизну полученных результатов. Практические рекомендации автором обоснованы и сформулированы на основе конкретных результатов проведенных исследований.

### **Значимость полученных результатов для науки и практики**

Значимость полученных Н.В. Палкиной результатов, выводов, положений и практических рекомендаций очевидна.

Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.22. – Клеточная биология (медицинские науки), так как в ней охарактеризованы ключевые аспекты функционирования меланоцитарных опухолевых клеток при участии

молекул микроРНК. Кроме того, выводы и выносимые на защиту и положения расширяют фундаментальные представления о роли микроРНК в механизмах канцерогенеза клеток меланомы кожи – их пролиферации, жизнеспособности и метаболизме, метастазировании, апоптотической гибели, являющихся ключевыми проявлением биологии опухолевой клетки.

По результатам исследования получены новые фундаментальные данные, которые в перспективе могут быть использованы в разработке новых технологий управления опухолевым ростом с целью разработки лечения против диссеминированной меланомы кожи за счет модуляции уровней микроРНК.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Научные положения и выводы диссертационной работы Н.В. Палкиной представляют интерес для специалистов в области клеточной биологии, патологической физиологии, онкологии, онкофармакологии и др. Материалы диссертации внедрены в образовательный процесс и используются в программах обучения студентов на кафедре патологической физиологии имени профессора В.В. Иванова федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на кафедре физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», а также в практику краевого государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Красноярское краевое патолого-анатомическое бюро».

Диссертационная работа Н.В. Палкиной выполнена с высокой степенью достоверности полученных результатов на достаточном объеме материала с

использованием комплекса сложных и современных методов исследований – микрочипирование, полимеразная цепная реакция, проточная цитометрия. Цель исследования сформулирована корректно и логично вытекает из современного состояния проблемы, которая в полном объеме отражена в представленном обзоре литературы. Задачи исследования четко подчинены решению поставленной цели, что формирует представление о работе, как о целостном законченном исследовании. В работе также применены современные объективные методы анализа данных – биоинформатический анализ при помощи специализированных онлайн-ресурсов, а также правильно подобранный статистический анализ.

#### **Личный вклад автора**

Автором лично или при ее непосредственном участии выполнена вся научно-исследовательская работа, а также подготовлены к публикации материалы по теме диссертации. Оформление диссертации и автореферата выполнены автором самостоятельно.

#### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа характеризуется внутренним единством, логической последовательностью изложения, обоснованным выбором цели и задач исследования. Диссертация изложена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, глав, посвященных изложению материала и методов, результатов собственных исследований, обсуждению результатов, выводов, состоит из 250 страниц машинописного текста, содержит 49 рисунков и 22 таблицы. Во введении обоснованы актуальность работы, степень научной разработанности темы, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая, практическая значимости работы и внедрение результатов, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов, публикации по теме диссертации, объём и структура диссертации, финансовая поддержка работы,

личный вклад автора. В главе «Обзор литературы» четко изложены современные сведения по направлению исследования, в полной мере отражающие состояние проблемы и целесообразность выполнения диссертационного исследования. Обзор литературы состоит из 6 разделов, четко структурирован, имеет оригинальные рисунки-схемы. В главу «Материал и методы» включены характеристики объекта исследования, полное и развернутое описание методов исследования и статистической обработки результатов. Также в данном разделе автор обосновывает критерии выбора того или иного метода исследования, приводит иллюстрации, облегчающие понимание сути методик, представляет дизайн работы, дает подробное описание используемых в эксперименте клеточных культур меланомы кожи. В главе, описывающей результаты собственных исследований, полученные данные излагаются подробно, обращает на себя внимание достаточно широкий перечень анализируемых маркеров в качестве мишеневых генов исследуемых микроРНК, позволяющих в полной мере оценить регуляторную роль последних в опухолевых меланоцитах. В этой главе автор не только излагает результаты исследования, полученные определенным методом, но также и приводит результаты валидации этих данных альтернативным методом. Здесь хочется отметить высокую достоверность полученных Н.В. Палкиной результатов, которая обусловлена осуществлением экспериментов в трех технологических повторах, использованием в экспериментальных методиках отрицательных и положительных контролей, а также спектра контролей качества с автоматизированной оценкой, нормализацию результатов полимеразной цепной реакции по двойным эндогенным нормирующим контролям, оценку эффективности трансфекции модуляторов экспрессии микроРНК в клетки меланомы кожи двумя способами – как по регистрации изменения экспрессии самой микроРНК, так по регистрации изменения экспрессии ее гена-мишени. Анализ, обобщение результатов и их обсуждение с привлечением данных литературы в главе «Обсуждение результатов» изложены полно и

последовательно, в «Заключении» приведена обобщающая схема регуляторных механизмов микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-204 и miR-3065 на исследуемые в работе механизмы опухолевой прогрессии клеток меланомы кожи.

Выводы отражают основные результаты диссертационной работы. Список литературы включает 342 источника, в том числе 17 отечественных источников и 325 зарубежных.

Диссертация выполнена и оформлена согласно требованиям, предъявляемым к диссертационным работам. Содержание автореферата соответствует основным положениям и выводам диссертации.

Результаты исследования Н.В. Палкиной широко обсуждены на российских зарубежных конференциях. По материалам диссертации опубликованы 33 печатные работы, в том числе 14 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, 10 публикаций в журналах международных баз данных «Web of Science» и «Scopus», 1 монография, 1 патент.

### **Замечания по диссертации**

Замечания, которые не носят принципиального характера, и не снижают высокого научно-методического уровня диссертационной работы, заключаются в следующем:

В работе недостаточно проработан вопрос клинической и практической значимости полученных результатов. В работу было изначально отобрано 159 образцов (из них 126 образцов с меланомой кожи (МК) и 33 образца с доброкачественными меланоцитарными новообразованиями кожи (ДМНОК)), имеющих подтвержденный клинический диагноз, а также описанные клинические и гистологические характеристики. Для последующего анализа экспрессии микроРНК методом микрочипирования было отобрано 16



образцов с МК и 3 образца с ДМНОК. Что обусловлено ограниченным количеством образцов с количеством опухолевых клеток более 70 %. Однако, после уровень экспрессии отобранных микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-3065 и miR-204 в последующих экспериментах независимым методом ПЦР-РВ можно было оценить на расширенной выборке образцов при условии выполнения ручной микродиссекции.

Анализ экспрессии микроРНК и сопоставление с клиническими и гистологическими характеристиками МК позволил бы достоверно оценить значимость этих микроРНК для диагностики и прогноза течения заболевания.

### Заключение

Диссертационная работа Палкиной Надежды Владимировны «Роль микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-3065 и miR-204 в регуляции ключевых механизмов опухолевой прогрессии меланомы кожи», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22 – Клеточная биология (медицинские науки) является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое научное достижение в области изучения биологии опухолевых клеток меланомы кожи и роли микроРНК с дифференцированной экспрессией при меланоме в качестве молекулярных регуляторов основных механизмов опухолевой прогрессии злокачественных меланоцитов, что существенно расширяет имеющиеся представления о меланомагенезе и имеет важное значение для клеточной биологии, цитологии, патологической физиологии и смежных специальностей, таких как онкология и фармакология и развития медицины в целом.

Достоверность и объективность полученных данных, их научная и практическая значимость позволяют считать, что диссертация Н.В. Палкиной полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, согласно п. 9

«Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., №650 от 29.05.2017 г., №1024 от 28.08.2017 г., №1168 от 01.10.2018 г.), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Н.В. Палкина, заслуживает присуждения ей ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22 – Клеточная биология (медицинские науки).

Отзыв на диссертационную работу Палкиной Надежды Владимировны обсужден и утвержден на заседании ученого совета НИИ канцерогенеза от 28 сентября 2021 г. (протокол № 6)

Винокурова Светлана Владимировна,  
кандидат биологических наук,  
зав. лабораторией молекулярной биологии вирусов  
НИИ канцерогенеза

Красильников Михаил Александрович,  
доктор биологических наук, профессор,  
директор НИИ канцерогенеза

Подпись Винокуровой С.В. и Красильникова М.А. «заверяю»

Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ  
онкологии им. Н.Н. Блохина  
Минздрава России,  
кандидат медицинских наук  
Кубасова Ирина Юрьевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: Россия, 115478, г. Москва, Каширское шоссе д.24  
8(499) 324-11-14  
E-mail: [info@ronc.ru](mailto:info@ronc.ru)  
<http://www.ronc.ru/>