ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук

Гуляевой Людмилы Федоровнына диссертацию

Палкиной Надежды Владимировны «Роль микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-3065 и miR-204 в регуляции ключевых механизмов опухолевой прогрессии клеток меланомы кожи»,

представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология (медицинские науки)

Актуальность темы исследования. Актуальность исследования механизмов развития и прогрессирования меланомы кожи обусловлена рядом причин: заболевание характеризуется агрессивным клиническим течением, значительным метастатическим потенциалом, крайне неблагоприятным прогнозом. Заболеваемость меланомой увеличивается не только в Российской Федерации, но и по всему миру. Поэтому исследования биологии меланоцитарной опухолевой клетки на уровне молекулярных взаимодействий крайне необходимы с целью уточнения патогенеза данной злокачественной опухоли, что может служить предпосылкой для усовершенствования терапии данной опухоли, так как существующие методы лечения метастазирующей меланомы кожи в настоящее время характеризуются низкой эффективностью.

В 1993 году в клетках впервые идентифицированы молекулы микроРНК, обладающие колоссальным регуляторным потенциалом на экспрессию генов клетки, и изучение механизмов их функционирования с целью использования данных молекул микроРНК в качестве мишеней регуляции жизнедеятельности опухолевых клеток для создания противоопухолевых терапевтических воздействий является приоритетным направлением современной онкологии – молекулярной онкологии. С этих позиций диссертационное исследование Палкиной Надежды Владимировны является востребованным, и его актуальность не вызывает сомнений.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, их значение для науки и практики. На основании сравнения полных экспрессионных профилей зрелых микроРНК в образцах ткани меланомы кожи и доброкачественных пигментных новообразований Палкина Н.В. впервые определила совокупность микроРНК, имеющих измененный уровень экспрессии при меланоме и, в связи с этим, играющих критическую роль в патогенезе меланомы кожи, с последующим исследованием функциональных ролей ранее не исследованных дифференцированно-экспрессирующихся микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-204 и miR-3065 в клетках меланомы *in vitro*.

Помимо этого, Палкина Н.В. осуществила сравнение полных экспрессионных профилей зрелых микроРНК в образцах ткани меланомы в зависимости от способа фиксации материала и впервые установила, что однотипные образцы меланомы кожи с разными способами фиксации несопоставимы для сравнения и анализа микроРНК. Эти результаты имеют практическую значимость для оптимизации решения задач молекулярной диагностики при исследовании микроРНК с целью избегания искажения результатов и ошибок в дальнейшей интерпретации. Более того, полученные автором результаты успешно внедрены в практическую деятельность в практику краевого государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Красноярское краевое патолого-анатомическое бюро».

Исследование Палкиной Н.В. имеет и неоспоримую теоретическую ценность фундаментального характера в области клеточной биологии, патологической физиологии, онкологии, так как в данном исследовании выявлены ранее неизвестные механизмы опухолевой прогрессии клеток меланомы кожи с участием дифференцированно-экспрессирующихся микроРНКmiR-106a, miR-4286, miR-204 и miR-3065. Значимость данных микроРНК в патогенезе меланомы подтверждена измерением экспрессии их генов-мишеней – онкогенов/онкосупрессоров *APLN, FPGS, HMGA1, RRN3, GRP55, HIPK1, ITGA1, BCL2* и *TGFBR1*, которая также была изменена в

исследуемых образцах. В работе также установлены про- и противоопухолевые эффекты при применении модуляторов экспрессии данных микроРНК на клетках меланомы *in vitro*, которые могут стать основой для разработки противоопухолевых препаратов.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность. Диссертационная работа Палкиной Н.В. изложена на 250 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материала и методов, результатов, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Библиографический список включает в себя 342 источника: 17 отечественных и 325 иностранных. Работа иллюстрирована 49 рисунками и 22 таблицами.

Во «Введении» обоснована актуальность темы диссертации, указана степень научной разработанности проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В главе «Обзор литературы», состоящей из 6 подглав, проведен анализ отечественной и зарубежной научной литературы по теме исследования, подробно изложена информация о молекулах микроРНК, их происхождении, биогенезе, регуляторном потенциале. Также с разнообразных сторон рассмотрены возможности использования данных молекул в перспективе для разработки диагностических и терапевтических подходов в отношении меланомы кожи и иных злокачественных новообразований, что еще раз подчеркивает актуальность и острую необходимость исследования функций микроРНК в клетках. Данный раздел имеет оригинальные иллюстративные рисунки, что значительно облегчает восприятие изложенного материала. Отдельно хочу отметить главу «Материал и методы исследования», которая, на мой взгляд, написана исчерпывающе подробно, снабжена оригинальными иллюстрациями, в главе приведена подробная поэтапная схема дизайна исследования, обозначены критерии выбора материала и условий

экспериментов, выбора клеточных линий и методов биоинформатического и статистического анализа.

Глава «Результаты» посвящена описанию результатов собственных исследований. Автором установлено, что экспрессионные профили микроРНК в клетках меланомы по сравнению с невусами имеют различия, что указывает на регуляторную роль таких молекул при меланомагенезе. При этом, микроРНК, имеющие измененный профиль экспрессии, регулируют компоненты сигнальных путей, принимающих непосредственное участие в опухолевой прогрессии. Трансфекция специфических модуляторов экспрессии дифференцированно-экспрессированных микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-3065 и miR-204 в клетки меланомы *in vitro* оказывает про- и противоопухолевые эффекты на пролиферацию, апоптоз, миграцию, инвазию, клоногенность клеток. Такие изменения происходят, с большой степенью вероятности, за счет регуляции экспрессии своих генов-мишеней (регуляторов опухолевого роста), что в совокупности дает новые представления об аспектах биологии опухолевых клеток меланоцитарной природы и патогенеза меланомы кожи.

В главах «Обсуждение результатов» и «Заключение» Палкина Н.В. приводит подробное обсуждение полученных результатов и разносторонне рассуждает о результатах, установленных в ходе исследования, с привлечением литературных сведений.

Девять выводов отражают основные результаты диссертационного исследования. В целом, они объективны, соответствуют поставленным задачам, отражают суть и результаты работы, подтверждаются представленными фактическими данными. Практические рекомендации направлены на оптимизацию решения задач молекулярной диагностики с целью исследования экспрессии молекул микроРНК.

Список литературы имеет значительное число источников последних лет и характеризует глубокую проработку автором изучаемой проблемы.

На основании анализа диссертации можно сделать вывод о завершенности работы Палкиной Н.В.

Диссертация выполнена и оформлена в соответствии с предъявляемыми требованиями. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертации. По материалам, вошедшим в диссертационную работу, опубликовано 33 публикации, в том числе 14 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикаций материалов диссертационных исследований, 4 статьи в зарубежных изданиях, включенных в международные базы цитирования, 1 монография, 1 патент.

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Работа Палкиной Н.В. представляет собой самостоятельное научное исследование, выполненное на достаточном объеме материала и высоком методологическом уроне. Достоверность полученных данных подтверждается не только адекватным объемом выборки экспериментального материала, но и валидацией экспериментальных методик, использованием вводимых внешних и внутренних контролей в методах, нормированием молекулярно-генетических методов одновременно по нескольким эндогенным контролям, проведением не менее трех технологических повторов экспериментов. Несомненным преимуществом работы стало использование современного высокопроизводительного метода – микроэррея для определения полного экспрессионного профиля известных микроРНК клеток, а также определение значимости условия хранения и фиксации гистологического материала для адекватности отражения профиля микроРНК, что входило в одну из задач исследования.

В целом, научно-методический уровень диссертации оценивается высоко, а сделанные в диссертации выводы содержательны и в полной мере отражают поставленные автором задачи, которые базируются на объективных данных, полученных с применением современных методов клеточной и молекулярной биологии, биоинформатических методов, а также адекватно подобранных методов статистической обработки.

Результаты работы Палкиной Н.В. были не только достаточно полно отражены в отечественной и международной литературе, но и доложены на научных конференциях регионального, всероссийского и международного уровня.

Принципиальных возражений по основной концепции работы, положениям, выносимым на защиту, полученным данным, не возникло. Отмечая, в целом, высокий уровень выполненного исследования, считаю необходимым в плане научной дискуссии поставить ряд вопросов перед соискателем:

1. При выявлении генов-мишеней исследуемых микроРНК рассчитывалась ли энергия связи при образовании дуплексов? Такие данные усилили бы доказательства взаимодействия с мРНК-мишенью.

2. В «Обсуждении результатов» я не увидела ответа на вопрос: на основании изменений в уровнях экспрессии микроРНК и их генов-мишеней можно ли говорить о последовательности этапов канцерогенеза для клеток доброкачественных меланоцитарных новообразований и меланомы кожи, и какое это имело бы значение для клинической практики?

Заключение. Диссертационная работа Палкиной Надежды Владимировны на тему «Роль микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-3065 и miR-204 в регуляции ключевых механизмов опухолевой прогрессии клеток меланомы кожи», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология (медицинские науки), является законченной научно-квалификационной работой, в которой, на основании полученных автором оригинальных фундаментальных данных, разработаны принципиально новые для клеточной биологии и патофизиологии теоретические положения о регуляторной роли miR-106a, miR-4286, miR-3065, miR-204 в опухолевой прогрессии клеток меланомы кожи. Считаю, что данная диссертационная работа соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ,

предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22 – Клеточная биология (медицинские науки).

29.09.2021

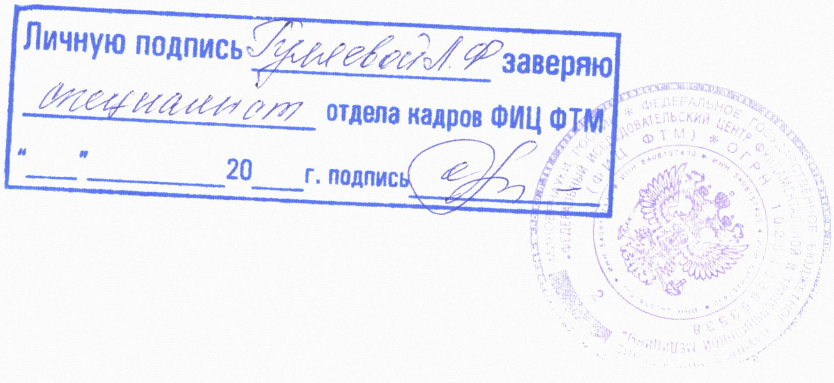
Официальный оппонент:

д.б.н., профессор Гуляева Л.Ф.

Гуляева Людмила Федоровна – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза ФГБУН Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины.

630117, Новосибирск, улица Тимакова, 2

Телефон приемной директора: (383) 333-65-37

Телефон канцелярии: (383) 335-98-50

Адрес электронной почты: director@frcftm.ru