ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора

Поспеловой Татьяны Ивановной

на диссертацию **Палкиной Надежды Владимировны**

«РОЛЬ МИКРОРНК miR-106a, miR-4286, miR-3065 И miR-204 В РЕГУЛЯЦИИ КЛЮЧЕВЫХ МЕХАНИЗМОВ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ»,

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

Актуальность темы диссертационного исследования

В настоящее время злокачественные новообразования являются второй по частоте причиной смертности населения развитых стран после сердечно-сосудистой патологии. По мере старения населения планеты онкологическая заболеваемость неумолимо увеличивается, являясь основным барьером к росту продолжительности жизни во многих государствах, не исключая Россию. Исследования механизмов возникновения и прогрессирования рака, поиск новых подходов к ранней диагностике и лечению опухолей входит в число приоритетных задач российской медицинской науки и отечественного здравоохранения в целом.

Исследования молекулярно-генетических основ канцерогенеза последних десятилетий выявили особую роль эпигенетических механизмов в возникновении злокачественных новообразований и их прогрессии. Оказалось, что эпигенетические механизмы контролируют экспрессию генов без изменения первичной последовательности ДНК, опосредуя основные клеточные процессы – пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. Суммарный эпигенетический статус и код организма оказался наследуемым, динамичным и обратимым.

Определяющая роль эпигенетических трансформаций в канцерогенезе сегодня неоспорима. Однако, фундаментальной наукой сделаны только первые шаги к пониманию эпигенетических механизмов в возникновении и прогрессии рака. Они включают метилирование ДНК, модификацию гистонов и малые некодирующие РНК (miRNA, siRNA).

Последние вызывают особый интерес исследователей, поскольку эти малые молекулы участвуют в транскрипционных изменениях и решающих событиях, определяющих судьбу клетки и ее фенотип.

Сегодня изучение эпигенетических микроРНК-опосредованных внутри- и внеклеточных процессов жизнедеятельности клетки является методологической основой многообещающих исследовательских проектов по уточнению перспектив управления глубинными биологическими событиями канцерогенеза. Это направление представляет весьма привлекательную для онкологов возможность блокировать специфические для опухоли изменения в геноме различных органов и тканей и, тем самым, остановить возникновение и прогрессию наиболее агрессивных и малокурабельных новообразований человека, таких как меланома, глиобластома, злокачественная лимфома и многих других.

Исследование профиля микроРНК опухолевых клеток имеет целью выявление эпигенетических биомаркеров злокачественных неоплазий. Эти данные могут быть использованы для ранней диагностики, контроля опухолевого заболевания, прогноза, оценки риска прогрессии и химиорезистетности. Многие ключевые микроРНК могут стать перспективными терапевтическими мишенями и даже терапевтическими агентами. По мнению большинства современных авторов, новые открытия в этой области уже способствуют пониманию причин возникновения и возможностей мониторинга течения многих онкологических заболеваний, а в будущем ожидается гораздо больший прогресс в изучении этих процессов.

Системный анализ микроРНК в неоплазированных клетках показал их важную роль в развитии блокады апоптоза опухолевых клонов. Устойчивые аномалии экспрессии микроРНК были хорошо документированы при многих злокачественных новообразованиях и имели очевидную связь с генетическими аберрациями.

В настоящее время показано участие микроРНК в регуляции различных сигнальных путей при ряде злокачественных новообразований, в том числе, при меланоме.

Однако возможности использования этих малых молекул в качестве диагностических и прогностических маркеров малоизучены. Основная сложность проблемы в том, что большинство молекул микроРНК является составной частью нормального клеточного транскриптома дермы. Все вышеизложенное делает работу Н.В. Палкиной, посвященную изучению этих аспектов, чрезвычайно актуальной.

Цель исследования, поставленная в работе Надежды Владимировны Палкиной, посвящена проведению углубленного анализа экспрессии спектра микроРНК, актуального для меланоцитарных новообразований кожи, выявлению функций ранее не изученных дифференцированно-экспрессирующихся микроРНК в отношении опухолевой прогрессии меланомы и идентификации их в качестве потенциальных мишеней для разработки новых способов лечения этого злокачественного новообразования, что, безусловно, является актуальным и призвано решить важную для современной онкологии проблему по выявлению эпигенетических механизмов меланомогенеза и определению возможных мишеней для разработки эффективных таргетных препаратов для снижения летальности пациентов с этой тяжелой опухолевой патологией.

Диссертация выполнена на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования

«Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства Здравоохранения Российской Федерации с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ (ред. от 29.05.2019) «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Проведение научно-исследовательской работы полностью соответствует принципам Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными Приказом Минздрава России от 19.06.2003 г. № 266.

Обоснованность научных положений, сформулированных в диссертации, подтверждается соответствующим объемом представленной выборки объектов исследования и использованием современных клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования.

В работе представлены результаты данных микрочипирования высокой плотности и ПЦР-РВ-анализа с подробной оценкой характера изменения экспрессии (увеличение или снижение) отдельных микроРНК исследуемого спектра, приведены результаты биоинформационного анализа, а также литературные данные об их участии в процессах канцеро/меланомогенеза. Проанализирована экспрессия нескольких видов микроРНК с уточнением их функциональной роли in vitro на клетках двух различных линий меланомы кожи. Изучены эффекты модуляции уровней экспрессии микроРНК путем внедрения в геном клеток меланомы кожи специфических ингибиторов и имитаторов молекул исследуемых микроРНК.

Проведена оценка влияния данных преобразований на ключевые параметры опухолевой прогрессии – пролиферацию/жизнеспособность, апоптотическую гибель, миграцию, инвазию, клоногенность, а также

экспрессию исследуемых микроРНК, идентифицированных по результатам биоинформационного анализа и являющихся регуляторами канцерогенеза.

Представленная диссертационная работа характеризуется безусловной научной новизной, которая заключается в следующем:

- впервые автором показано, что экспрессия 1171 вида зрелых микроРНК различается в 2 и более раза в FFPE-образцах меланомы кожи по сравнению с доброкачественными меланоцитарными новообразованиями кожи, при этом экспрессия 62 видов зрелых микроРНК различается в 2 и более раза;

- впервые установлено, что совокупность выявленных микроРНК, имеющих измененный уровень экспрессии, участвует в регуляции механизмов сигнальной трансдукции, активация которых играет ключевую роль в возникновении и прогрессии меланомы кожи;

- впервые при меланоме кожи выявлена аномальная экспрессия профиля микроРНК (miR-106a, miR-4286, miR-3065 и miR-204), которая связана с меланомогенезом;

- в работе установлено, что снижение уровня микроРНК miR-106a приводит к увеличению инвазии и клоногенности клеток меланомы, а miR-4286 – к снижению их пролиферации/жизнеспособности, усилению апоптоза и клоногенности, подобные тенденции выявлены и для других микроРНК исследованного спектра;

- впервые доказано, что модуляция экспрессии микроРНК miR-4286, miR-3065 и miR-204 в клетках меланомы кожи приводит к изменению экспрессии генов-мишеней данных микроРНК, являющихся регуляторами канцерогенеза;

- диссертантом уточнена роль микроРНК miR-106a, miR-3065, miR-204 в клетках меланомы кожи как онкосупрессоров, miR-4286 – как онкогена;

- впервые установлена способность микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-3065 и miR-204 регулировать ключевые механизмы опухолевой

прогрессии клеток меланомы и возможность выступать перспективными молекулярными мишенями для разработки технологий по диагностике и «таргетному» лечению меланомы кожи.

Научная значимость выявленных аномалий экспрессии профиля микроРНК позволяет оценить их участие в регуляции механизмов сигнальной трансдукции, активация которых играет ключевую роль в возникновении и прогрессии как меланомы кожи, так и других злокачественных новообразований. Выявленные в результате научного исследования данные имеют высокую значимость для клинической практики и разработки диагностических технологий, позволяющих на ранних этапах канцерогенеза оценить опухолевый потенциал меланоцитарных новообразований кожи на основе экспрессионного анализа микроРНК с помощью микроэррея и ПЦР-РВ.

Н.В. Палкиной уточнены важные технологические особенности использования экспрессии микроРНК на основе микрочипирования и ПЦР-РВ для решения задач молекулярной диагностики в онкологической клинической практике и научных исследованиях в области онкологии. Проведенные автором исследования, касающиеся методических особенностей, в дальнейшем позволят избежать искажений результатов экспрессионного анализа, ошибок в интерпретации их результатов.

Результаты и выводы диссертации, сделанные на основе полученных данных, обоснованы и могут быть применены для новых технологических разработок по ранней диагностике меланомы кожи в медицинских учреждениях, оказывающих лечебную и профилактическую помощь онкобольным, а также в учебном процессе при подготовке студентов медицинских университетов, врачей-онкологов, гематологов, генетиков, клинических лаборантов, терапевтов, хирургов на этапе постдипломного образования.

Оценка содержания диссертации и достоверность результатов исследования

Диссертационная работа изложена на 250 страницах машинописного текста, выполнена в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материал и методы исследования», главы, отражающей результаты собственных исследований, главы обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Работа отличается ясностью и логичностью изложения, написана хорошим литературным языком. Список литературы включает 342 источника (17 – отечественных и 325 – иностранных публикаций).

Во введении представлены актуальность проблемы и степень ее разработанности, цель и задачи исследования, научная новизна, дизайн, методология и методы исследования, теоретическая и практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов.

В обзоре литературы диссертантом подробно проанализировано современное состояние проблемы изучения эпигенетических механизмов канцерогенеза, вопросов технологий микроРНК-анализа.

В главе, посвященной объекту, материалам и методам исследования, подробно представлена техническая и технологическая характеристика отдельных методов исследования профиля микроРНК, культуральных исследований, описаны специальные методы анализа динамики микроРНК и методы статистической обработки полученного материала.

Глава 3 посвящена анализу результатов собственных исследований. Результаты работы корректно оформлены, верифицированы при помощи современных методов статистического анализа.

Работа хорошо иллюстрирована 22 таблицами и 49 рисунками.

Глава 3 разделена на 16 подглав: разделы посвящены подробному изложению и анализу результатов молекулярно-генетических и эпигенетических исследований, результатам биоинформационного анализа и

его соотнесению с динамикой спектра микроРНК в препаратах меланомы кожи. Отдельно проводилась оценка пролиферативной способности опухолевых клеток в культуре, их склонности к апоптозу, миграции/инвазии, клоногенности, а также экспрессия генов-мишеней после трансфекции в клетки специфических ингибиторов и имитаторов по каждой из исследуемых микроРНК. В конце каждой подглавы проводилось обобщение результата, верифицирующего роль каждой микроРНК в меланомогенезе.

Выводы логично вытекают из материалов диссертации, подтверждаются фактическим материалом и в целом соответствуют поставленным задачам.

В конце работы приведены рекомендации, которые будут полезны специалистам практического звена, представляют собой методическую ценность для исследователей и основу для разработок новых лечебно-диагностических технологий в онкологии рака кожи.

Личный вклад автора в разработку научной проблемы несомненен.

По теме диссертации опубликованы 33 печатные работы, в том числе, 14 статей в журналах, включенных в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве высшего образования и науки Российской Федерации для публикаций материалов диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук, 4 статьи – в зарубежных изданиях, включенных в международные базы цитирования, издана 1 монография, 1 патент РФ на изобретение.

Основные положения диссертации доложены на конференциях различного уровня: городских, межрегиональных, всероссийских и международных форумах.

Принципиальных замечаний к диссертации нет. Незначительные недочеты, ни в коей мере не умаляющие достоинств работы, присутствуют в

оформлении, в частности, отсутствие раздела «Заключение» в главе «Обзор литературы».

В процессе ознакомления с содержанием диссертационного исследования появился ряд вопросов, которые хотелось-бы задать автору в качестве научной дискуссии:

1. Известно ли, как длительность хранения парафинового блока влияет на сохранность микроРНК в заключенных в него тканях?
2. Как автор объясняет тот результат, что онкосупрессорная, по их данным, в фиксированном формалине образцах микроРНК miR-106a имеет повышенную экспрессию при меланоме в сравнении с доброкачественными новообразованиями?
3. Какие маркеры профиля микроРНК биоптата клеток кожи могут помочь наиболее надежно провести дифференциальную диагностику меланомы от доброкачественных меланоцитарных новообразований кожи?
4. Наконец, правомочно ли на данном этапе переносить результаты, полученные in vitro, на всю нозологию? Даже на уровне двух культур в ряде случаев эксперименты показали разные результаты для одного и того же процесса и микроРНК.

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, является законченным научным трудом, в котором на основании выполненных автором исследований решена крупная научная проблема раскрытия эпигенетических механизмов опухолевой прогрессии злокачественного онкологического заболевания кожи (меланомы).

По своей актуальности, методическому уровню, объему исследований, научной новизне и практической значимости диссертационная работа

Палкиной Надежды Владимировны, выполненная при научном консультировании доктора медицинских наук, профессора Рукша Т.Г., полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации, с изменениями и дополнениями от 21 апреля, 2 августа 2016 г., от 29 мая, 28 августа 2017 г., от 1 октября 2018 г.), а ее автор Н.В. Палкина достойна присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки).

Проректор по научной работе, заведующий
кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии
(ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России,

Поспелова Татьяна Ивановна

«29» 10

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России)

630091 Сибирский федеральный округ, Новосибирская обл., г. Новосибирск, Красный проспект, 52, +7(383)222-32-04, rector@ngmu.ru, http://www.ngmu.ru