«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУН ИХБФМ СО РАН

Член-корр. РАН _____ Пышный Д.В.

_____2018 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Глазырина Юрия Евгеньевича «Общие и целевые способы поиска белковых маркеров онкологических заболеваний методами масс-спектрометрии высокого разрешения», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Диссертационная работа Юрия Евгеньевича Глазырина посвящена проблемам поиска новых белковых биомаркеров онкологических заболеваний методами масс-спектрометрии высокого разрешения.

В представленной работе использовались два способа поиска новых биомаркеров. Первый – это классический подход протеомного профилирования, при котором методом масс-спектрометрии анализировались белковые профили в наборе проб из нескольких групп (больные и здоровые), которые затем количественно сравнивались с помощью специального программного обеспечения и статистическими методами выявлялись наиболее отличные белковые компоненты – кандидаты в маркеры состояний, представленных в группах. Протеомное профилирование проводилось для лимфоцитов больных лимфолейкозами двух типов и лимфоцитов больных опухолевыми заболеваниями легких. В качестве группы сравнения использовались пробы, полученные из крови здоровых доноров.

Второй способ поиска биомаркеров основан на применении высокоаффинных молекул – синтетических ДНК-аптамеров, которые с высокой специфичностью связываются с раковыми клетками. После инкубации клеток или тканей с аптамерами проводилась экстракция связавшихся белков с помощью магнитных частиц, а затем их масс-спектрометрическая идентификация. Выявленные мишени аптамеров рассматривались, как молекулярные маркеры, определяющие способность аптамеров избирательно связываться с патологическими клетками. На этом этапе работа велась с клетками асцитной карциномы Эрлиха и послеоперационными тканями больных раком легких.

Два разных подхода к поиску биомаркеров связывает применение современного метода детекции белков – масс-спектрометрии высокого разрешения. В итоге работы была сделана попытка сравнить результаты, полученные двумя методами, и показать их особенности, преимущества и недостатки.

Высокая актуальность поиска новых белковых биомаркеров онкологических заболеваний связана с необходимостью внедрения современных способов диагностики на ранних стадиях развития патологий, основанных на обнаружении признаков проявления болезни в организме, проявленных на клеточном и молекулярном уровнях.

Особенно актуальна ранняя диагностика рака легких, который очень часто обнаруживается лишь на поздних стадиях. Для хронического лимфолейкоза весьма актуален поиск и внедрение новых биомаркеров прогнозного типа, применение которых позволило бы оценивать характер дальнейшего развития и течения этого гетерогенного заболевания и, в зависимости от прогноза, выбирать максимально эффективную и в то же время безопасную стратегию лечения. Разработка и внедрение новых диагностических систем с применением ДНК-аптамеров в качестве чувствительных молекул имеет значение для развития современной медицины. На этом этапе важно знать молекулярные механизмы связывания аптамеров с клетками, в которых задействованы определенные белки, детектируемые методом масс-спектрометрии.

Текст диссертации Ю.Е. Глазырина, представленный на 132 страницах, содержит введение, аналитический обзор литературы, описание использованных методов и материалов, обсуждение результатов, заключение и выводы. Список литературы состоит из 188 наименований.

Во введении автор подробно описывает актуальность поиска новых биомаркеров онкологических заболеваний в целом, хронического и острого лимфолейкозов, а также рака легких в частности. Описаны цели, задачи, научная новизна и значимость работы, представлены положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов и возможности их внедрения.

В обзоре литературы приведены общие сведения о биологических маркерах, описаны методы масс-спектрометрии, применяемые в протеомике, представлено современное состояние вопросов поиска и применения биомаркеров онкологических заболеваний (хронического лимфолейкоза и рака легких), обзор применения протеомного профилирования и аффинного обогащения аптамерами для поиска биомаркеров.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны процедуры отбора и подготовки биологических проб, а также анализа проб с применением масс-спектрометрии высокого разрешения, технологии пост-обработки масс-спектров с помощью биоинформационных программных пакетов, безметочного количественного анализа и интерпретации полученных данных с помощью статистических методов.

В главе «Результаты и обсуждение» приводятся полные результаты проделанных экспериментов по поиску и идентификации новых белковых маркеров онкозаболеваний методом протеомного профилирования клеток крови и с применением аффинного обогащения проб с помощью аптамеров.

В конце текста диссертации приведены «Заключение», «Выводы», “Список литературы” и благодарности. В «Заключении» сравниваются два независимых метода поиска новых белковых маркеров онкологических заболеваний с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения. В «Выводах» представлены белки – кандидаты в белковые маркеры острого и хронического лимфолейкозов, а также кандидаты в прогнозные маркеры различных типов хронического лимфолейкоза, полученные путем протеомного профилирования. Как результат работы представлены также мишени аптамеров к асцитной карциноме Эрлиха и раку легких, в том числе, определенные двумя независимыми методами.

К недостаткам работы следует отнести погрешности в оформлении работы: это касается отсутствия некоторого числа запятых, не совсем удачных фраз и выражений. Автор работы использовал очень большое число "калек" с английского языка, что привело к изобретению новых слов, которых нет в классическом русском языке. Лишь некоторые из них: "дайджеста бычьего сывороточного альбумина", "автосэмпле", "обладают сходным функционалом", "магнитные комплексы", "было получено 57 файлов", "стороне от точек здоровых клеток" и так далее. Большое число такого рода слов и выражений не отражают реальный смысл фраз, а могли бы быть написаны более четко на русском языке. Кроме того, не достаточно четко описаны эксперименты с использованием синтетических биотинилированных ДНК-аптамеров к асцитным клеткам карциномы Эрлиха, клеткам аденокарциномы легкого. Эти ДНК-аптамеры имеют известную структуру, которую было бы полезно привести в описании экспериментов, а также описать с каким мишеням этих клеток имеют повышенное сродство аптамеры.

Тем не менее, эти замечания не умаляют достоинств диссертационной работы

Работа Ю.Е. Глазырина выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованным автором работам по данному вопросу.

Работа является примером успешного применения современных аналитических методов для поиска диагностических признаков онкологических заболеваний, проявленных на молекулярном уровне, что может в будущем иметь значение для понимания механизмов появления и развития этих заболеваний. Кроме того, представленная работа вносит важный вклад в современную медицинскую науку на этапе разработки и внедрения новых диагностических средств на основе альтернативных биологических сенсоров – ДНК-аптамеров.

Новизна работы заключается в том, что автором представлены новые белки – кандидаты в биомаркеры онкологических заболеваний, найденные методом протеомного профилирования, которые (после этапа дальнейшей валидации, которая не входила в задачи, поставленные в диссертации) могут быть использованы для ранней диагностики. В работе предложены новые прогнозные маркеры хронического лимфолейкоза, которые после валидации могут быть использованы для дополнительной классификации пациентов и выбора стратегии наиболее безопасного и эффективного лечения. Протеомное профилирование лимфоцитов крови для поиска биомаркеров опухолевых заболеваний легких проводилось впервые. ДНК-аптамеры, которые были использованы в представленной работе, сами по себе являются биологическими сенсорами нового типа. Метод выявления и идентификации их белковых молекулярных мишеней путем аффинного обогащения был модифицирован и адаптирован к применению с использованием послеоперационных тканей пациентов

впервые. Для новых аптамеров, полученных в лаборатории, где работает соискатель, молекулярные мишени были определены впервые.

Часть масс-спектрометрических экспериментов была проделана в Университете Оттавы в Канаде, что позволило автору получить опыт работы в современной хорошо оснащенной лаборатории. Кроме того, полученный опыт был успешно использован автором для выполнения масс-спектрометрических экспериментов, обработки и интерпретации результатов, полученных самостоятельно в Красноярском государственном медицинском университете. Обзор состояния проблемы с использованием литературы, подробные описания методов пробоподготовки, деталей масс-спектрометрического анализа, подходов к интерпретации полученных данных, а также представленные в диссертации результаты характеризуют автора, как сформировавшегося квалифицированного и универсального специалиста современного уровня в области масс-спектрометрии белков и протеомики.

Диссертационная работа Ю.Е. Глазырина была обсуждена на семинаре Лаборатории ферментов репарации Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Результаты работы представляют теоретический и практический интерес и имеют значимость для развития биохимии, они могут использоваться в большом числе институтов биохимического и биомедицинского профиля в России и за рубежом.

По актуальности темы, новизне и достоверности результатов, теоретической и практической значимости диссертация Ю.Е. Глазырина соответствует требованиям, изложенным в пункте 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Профессор, доктор химических наук
Зав. лабораторией ферментов репарации
ИХБФМ СО РАН Г.А. Невинский
26.01. 2018 г.

Невинский Георгий Александрович
Новосибирск 630090, проспект Лаврентьева, 8
Тел. +7-383-363-5126,
nevinsky@niboch.nsc.ru
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН
Доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук
Подпись Г.А. Невинского
Заверяю
Зав. канцелярией
Для документов