

В диссертационный совет ПДС 0300.025
при Федеральном государственном автономном
образовательном учреждении высшего образования
«Российский университет дружбы народов
им. Патриса Лумумбы»
117198 г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Скрябина Глеба Олеговича

«Состав и функциональное значение белков липидных рафтов в экзосомах и микровезикулах, секретируемых клетками злокачественных опухолей»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 3.1.6 – Онкология и лучевая терапия

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Скрябина Г.О. посвящена одному из наиболее активно развивающихся направлений современной экспериментальной онкологии – исследованию внеклеточных везикул (ВВ) и молекулярных механизмов, определяющих их образование, состав и функциональные свойства. Интерес к экзосомам и микровезикулам обусловлен не только их фундаментальной ролью в межклеточной коммуникации, но и тем, что они рассматриваются как перспективный источник диагностически значимых молекулярных маркеров для жидкостной биопсии злокачественных новообразований и как потенциальная платформа для разработки новых терапевтических подходов. Вместе с тем крайне высокая природная гетерогенность ВВ, отсутствие универсальных критериев их надежной дифференциации, недостаточность понимания фундаментальных аспектов биологии ВВ и нерешенность ряда методических вопросов до сих пор существенно ограничивают прикладное применение накопленных данных в этой области наук о жизни в целом, и в частности, в экспериментальной и клинической онкологии.

На этом фоне выбор темы диссертационного исследования следует признать своевременным и научно обоснованным. Автор рассматривает проблему сразу в нескольких взаимосвязанных контекстах: как задачу совершенствования подходов к анализу и количественной оценке внеклеточных везикул, как задачу поиска более информативных маркеров различных субпопуляций везикул и как задачу выяснения роли белков липидных рафтов в регуляции секреции внеклеточных везикул и злокачественного фенотипа опухолевых клеток. Такой подход представляется важным, поскольку позволяет не

ограничиваться описанием отдельных наблюдений, а выстраивать целостное представление о связи мембранной организации клетки, в частности организации липидных рафтов, биогенеза везикул и опухолевой прогрессии.

Основным объектом исследования стали рафт-образующие белки – флотиллины, стоматин и кавеолин-1, роль которых в биологии внеклеточных везикул изучена неравномерно и во многом остается дискуссионной. Если для флотиллинов и кавеолина-1 накоплены довольно значительные сведения, то стоматин в рассматриваемом контексте до настоящего времени практически не был исследован. Кроме того, актуальность работы усиливается включением в исследование ВВ из различных биологических жидкостей, включая кондиционированную среду различных клеток, плазму крови, асциты, а также впервые охарактеризованные автором ВВ из желудочного сока и маточных аспириатов, что расширяет представления о диагностическом и биологическом потенциале малоизученных источников везикул.

Таким образом, диссертация Скрябина Г.О. отвечает актуальным запросам современной онкологии, молекулярной биологии и биомедицины, сочетая фундаментальную направленность с выраженной методической и потенциальной прикладной значимостью.

Научная новизна и достоверность результатов диссертации

Достоверность представленных результатов обеспечивается продуманным дизайном исследования, использованием современных экспериментальных подходов и многоуровневой верификацией данных. В работе применен комплекс взаимодополняющих методов, включающий выделение ВВ с учетом природы биологического материала, их морфологическую характеристику методом трансмиссионной и криоэлектронной микроскопии, оценку размерного распределения и концентрации, иммуноблоттинг по классическим маркерам и отрицательным контролям, а также молекулярно-биологические и клеточные методы для анализа функциональной роли исследуемых белков. Существенно, что автор опирается на современные международные рекомендации по исследованию внеклеточных везикул, а статистическая обработка результатов соответствует поставленным задачам.

Полученные данные выглядят воспроизводимыми и внутренне согласованными. Аргументация автора строится на серии взаимосвязанных результатов, подтверждающих друг друга на разных экспериментальных уровнях – от состава и распределения белков в

везикулах до изменений поведения клеток при направленной модификации экспрессии соответствующих генов. Это позволяет считать основные выводы диссертации обоснованными и достоверными.

Научная новизна работы является несомненной. В диссертации впервые выделены и подробно охарактеризованы внеклеточные везикулы из индивидуальных образцов желудочного сока и маточных аспиратов. Впервые проведен системный сравнительный анализ представленности белков липидных рафтов в везикулах различного происхождения, включая биологические жидкости онкологических больных и условно здоровых доноров, а также секреты опухолевых и неопухолевых клеток. К числу наиболее значимых результатов следует отнести впервые показанное устойчивое присутствие стоматина в везикулах разных источников и его высокую перспективность в качестве экзосомального маркера.

Не менее важным является выявление ранее не описанной регуляторной взаимосвязи между флотиллином-2, стоматином и кавеолином-1 в клетках немелкоклеточного рака легкого и секретируемых ими внеклеточных везикулах. Автором также впервые показано, что изменение экспрессии данных белков влияет не только на пролиферацию и миграцию опухолевых клеток, но и на интенсивность секреции внеклеточных везикул, причем подавление стоматина дополнительно сопровождается сдвигом размерного распределения в сторону более крупных частиц. Не менее важным представляется обнаружение того, что флотиллины, используемые в качестве экзосомальных маркеров для подтверждения везикулярной природы наночастиц, в действительности отсутствуют или слабо представлены в ВВ из образцов биологического материала здоровых доноров, что ставит под сомнение универсальность этого белка в качестве экзосомального маркера, но открывает возможности его исследования в качестве потенциального маркера опухолеассоциированных ВВ. В совокупности это свидетельствует о получении принципиально новых данных, расширяющих существующие представления о рафт-зависимых механизмах биогенеза внеклеточных везикул и их связи с опухолевым фенотипом.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Научные положения, выносимые на защиту, логически вытекают из поставленной цели и последовательно решаемых задач исследования. Работа выстроена таким образом, что каждая последующая часть опирается на результаты предыдущей: от характеристики везикул из различных биологических источников и сравнения методов их количественного

анализа автор переходит к оценке маркерного потенциала исследуемых белков, а затем – к функциональному анализу их роли в модели немелкоклеточного рака легкого. Такая композиция делает исследование внутренне целостным и методически убедительным.

Выводы диссертации основаны на собственных экспериментальных данных, подтверждаются всеми необходимыми контролями и использованием нескольких экспериментальных моделей. Автор не ограничивается констатацией различий, а стремится интерпретировать их в контексте современных представлений о биогенезе внеклеточных везикул, мембранной микродоменной организации и опухолевой прогрессии. Практические рекомендации, касающиеся выбора подходов к количественному анализу внеклеточных везикул и интерпретации маркерного значения стоматина, флотиллинов и кавеолина-1, также опираются на результаты работы и сформулированы корректно.

Научно-практическое значение результатов диссертационной работы

Научная ценность диссертации Скрябина Г.О. определяется прежде всего тем, что работа вносит заметный вклад сразу в несколько проблемных направлений исследований внеклеточных везикул. Во-первых, она расширяет представления о белковом составе и молекулярной гетерогенности ВВ различного происхождения. Во-вторых, полученные результаты конкретизируют роль белков липидных рафтов в регуляции секреции везикул и поддержании злокачественного фенотипа клеток. В-третьих, работа предлагает новые данные для обсуждения того, какие белки могут рассматриваться как универсальные маркеры экзосом, а какие, напротив, отражают преимущественно отдельные субпопуляции везикул, в том числе ассоциированные с опухолевым процессом.

С практической и научно-методической точки зрения особый интерес представляют разработанные и апробированные подходы к выделению и анализу внеклеточных везикул из желудочного сока и маточных аспиратов, а также сравнительная оценка методов их количественного анализа. Эти результаты могут быть использованы при планировании последующих исследований и стандартизации лабораторных протоколов в области внеклеточных везикул.

Самостоятельную прикладную перспективу имеют данные о стоматине как о высокоспецифичном маркере экзосом, а также результаты, указывающие на возможную диагностическую значимость флотиллин-позитивных везикул в биологических жидкостях онкологических пациентов. Наряду с этим выявленное участие флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 в регуляции пролиферации, миграции и секреции внеклеточных везикул

опухолевыми клетками формирует основание для дальнейших работ по поиску новых молекулярных мишеней в экспериментальной онкологии.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Диссертационная работа Скрябина Г.О. соответствует паспорту научной специальности 3.1.6 – Онкология и лучевая терапия, прежде всего пункту, связанному с исследованием этиологии и патогенеза злокачественных опухолей на молекулярном и клеточном уровнях с использованием современных достижений молекулярной биологии, биохимии, морфологии и экспериментальной онкологии. Выполненное исследование направлено на изучение молекулярных механизмов, связанных с опухолевой прогрессией, межклеточной коммуникацией и фенотипическими свойствами клеток немелкоклеточного рака легкого, что в полной мере укладывается в рамки данной специальности.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

Основные результаты диссертационной работы получили достаточное отражение в научной печати. По теме диссертации опубликовано 11 работ в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus, Web of Science и РИНЦ, при этом все 11 публикаций размещены в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных результатов диссертационных исследований. Тематика публикаций соответствует содержанию диссертации и охватывает ключевые направления выполненной работы: исследование стоматина как кандидата в экзосомальные маркеры, характеристику внеклеточных везикул из желудочного сока, анализ особенностей внеклеточных везикул при онкопатологии, а также связанные с темой исследования молекулярные аспекты везикулярной биологии.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации. Автореферат корректно отражает цель, задачи, научную новизну, методический подход, результаты исследования и выводы автора. Он адекватно передает структуру и логику работы, не искажая ее основных положений.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа изложена на 148 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, раздел «Материалы и методы», раздел «Результаты и обсуждения», заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список

литературы и список публикаций автора по теме диссертации. Работа иллюстрирована 30 рисунками и 3 таблицами. Список литературы включает 237 источников, что свидетельствует о хорошей включенности автора в современный научный контекст рассматриваемой проблемы.

Во введении обоснована актуальность исследования, сформулированы цель и задачи, раскрыты научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту, а также сведения о достоверности и апробации результатов. Обзор литературы содержит последовательный анализ современного состояния исследований внеклеточных везикул, механизмов их биогенеза, роли липидных рафтов и рафт-образующих белков, а также значения этих процессов в онкологии. Раздел «Материалы и методы» изложен подробно, содержит достаточный объем информации для воспроизводимости основных экспериментальных подходов. Хочется отметить широкий спектр современных методик, используемых в работе, что свидетельствует о высоком научно-методическом уровне исследования.

Раздел собственных результатов логично структурирован. В первой главе дана характеристика внеклеточных везикул из различных биологических жидкостей; во второй – выполнено сравнение методов анализа концентрации внеклеточных везикул; в третьей – обоснована перспективность стоматина как маркера экзосом; в четвертой – исследована роль рафт-образующих белков флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 в регуляции злокачественного фенотипа клеток немелкоклеточного рака легкого и в секреции внеклеточных везикул. Заключение и выводы логично завершают изложение материала и соответствуют приведенным результатам.

Замечания по работе

При общей высокой оценке диссертационного исследования можно отметить ряд замечаний и вопросов, которые, однако, не снижают ее общей научной значимости.

Замечания:

1. Обзор литературы достаточно подробный и хорошо структурирован, но он не формирует впечатление актуальности поставленной автором цели - исследование состава и уровня представленности белков липидных рафтов во внеклеточных везикулах различного происхождения. Это не критический недостаток, который может быть исправлен в ходе устного представления результатов исследования.

2. Некоторые рисунки плохо «читаются», например, Рис 17 (вестерн-блот): уровень белков в везикулах, секретлируемых клетками H460 и A549, сравнивается с уровнем этих белков в клетках линии H1299; Рис. 20А: не понятен смысл линии графика, отражающей разный уровень анализируемых белков в образцах, полученных от разных пациентов; Рис. 26А-В: линии графиков плохо различимы, приходится «полагаться» на описание в тексте.

Вопрос:

Белок Stomatin вполне обосновано предложен Автором в качестве нового высоко специфичного экзосомального маркера, т.е. этот белок является важным компонентом везикул. В тоже время, подавление экспрессии стоматина стимулирует секрецию ВВ клетками НМРЛ, т.е. клетки начинают активно синтезировать везикулы, не содержащие этот белок. Вероятно, это противоречие может иметь логичное объяснение. Интересно мнение автора.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Скрябина Глеба Олеговича на тему «Состав и функциональное значение белков липидных рафтов в экзосомах и микровезикулах, секретлируемых клетками злокачественных опухолей» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи, касающейся биологии внеклеточных везикул, поиска их молекулярных маркеров и выяснения роли белков липидных рафтов в регуляции секреции везикул и злокачественного фенотипа опухолевых клеток, имеющей важное значение для экспериментальной онкологии.

По своему содержанию, уровню методического исполнения, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, согласно п. 2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов», утвержденного ученым советом РУДН протокол № УС-1 от 22.01.2024 г., а её автор, Скрябин Глеб Олегович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Официальный оппонент:

Заведующая научной лабораторией субклеточных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России,
доктор медицинских наук (14.01.12 – Онкология)



Малек Анастасия Валерьевна

Подпись д.м.н. Малек А.В. заверяю

Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, д.м.н.



Иванцов Александр Олегович



02 04 2026

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197758, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, дом 68, тел. +7(812) 43-99-555, e-mail: center.petrova@niiioncologii.ru