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

Стремительно и неуклонно растущий интерес мирового научного сообщества к секретируемым внеклеточным везикулам (ВВ) связан со все более очевидной значимостью этих наночастиц в дистанционной межклеточной коммуникации, необходимой как для поддержания нормальных физиологических процессов организма, так и для развития целого ряда системных патологий, включая злокачественные новообразования. В настоящее время предпринимаются активные попытки использования природных и синтетических ВВ для разработки новых диагностических подходов и терапевтических стратегий. В то же время, несмотря на бурное развитие данного направления исследований, применение ВВ в клинической практике ограничено рядом проблем, важнейшим из которых является недостаточное понимание фундаментальных вопросов их функционирования. Это относится к ключевым аспектам биологии ВВ, таким как пути биогенеза везикул и их взаимодействия с клетками-реципиентами, механизмы отбора и межклеточной передачи молекулярного карго и ряд других. Более того, с каждым годом обнаруживаются все новые типы везикул и предлагаются различные варианты их классификации и систематизации, однако до сих пор нет четких молекулярных маркеров и критериев для дифференциации между собой различных типов ВВ за исключением тех случаев, когда есть возможность отследить конкретный путь их формирования из клеток. Также нерешенными остаются вопросы, связанные с методическими аспектами работы с ВВ, в том числе вопросы адекватной квантификации, которые особенно остро стоят при анализе ВВ, содержащихся в биологических жидкостях организма. Диссертационная работа Скрябина Г.О. посвящена решению ряда указанных проблем, в том числе, оптимизации методов количественного анализа ВВ, сравнительному анализу имеющихся молекулярных маркеров ВВ и поиску новых более информативных маркеров, позволяющих

дифференцировать два основных типа ВВ – экзосом и микровезикул. Основной фокус работы сосредоточен на исследовании белков так называемых липидных рафтов, мембранных микродоменов, играющих ключевую роль в поддержании структурно-функциональной организации мембран и потенциально связанных с биогенезом ВВ. В диссертации проводится анализ представленности данных белков в ВВ, секретируемых различными типами клеток и присутствующих в различных биологических жидкостях, изучение их роли в продукции ВВ клетками рака легких, а также поиску возможной регуляторной и функциональной связи между этими белками. Отдельное внимание уделено исследованию роли данных белков в регуляции злокачественного фенотипа опухолевых клеток, включая их пролиферационную и миграционную активность. В связи со сказанным выше, диссертационное исследование Скрябина Г.О. представляется крайне актуальным как в научно-методическом аспекте, так и в отношении фундаментальных вопросов биологии ВВ, в том числе роли белков липидных рафтов в биогенезе везикул, а также их участия в малигнизации клеток.

Достоверность и новизна результатов диссертации

Достоверность результатов диссертационного исследования Скрябина Г.О. подтверждается достаточным количеством независимых биологических и технических повторов, наличием всех необходимых контролей, корректным объемом выборки, а также воспроизводимостью данных при использовании различных методов исследования. Методы статистической обработки соответствуют современным требованиям к анализу биомедицинских данных и адекватны поставленным исследовательским задачам. Полученные экспериментальные результаты согласуются с ранее опубликованными работами в данной области, что подтверждает их обоснованность и научную значимость.

В диссертационной работе Скрябина Г.О. впервые получены и охарактеризованы в соответствии с принятыми современными международными стандартами ВВ из отдельных биологических жидкостей, таких как желудочный сок и жидкость из полости матки (маточные аспираты). Также впервые проведен комплексный анализ белков липидных рафтов (ЛР) в ВВ различного происхождения и в клетках продуцентах. Важно отметить, что несмотря на то, что липидным рафтам в последнее время отводится важная роль в биогенезе ВВ, непосредственное участие ключевых белков, организующих структуру ЛР, в этом вопросе практически не изучалось, а некоторые рафт-образующие белки (РОБ), в частности, стоматин, вовсе не исследовались в контексте ВВ. В диссертационной работе Скрябина Г.О. впервые проведен анализ РОБ, флотиллинов, кавеолина-1 и стоматина, в ВВ, выделенных из различных биологических источников, включая биологические жидкости пациентов с различными онкопатологиями и условно здоровых доноров, а также в среде культивируемых in vitro клеток различного происхождения. В работе впервые обнаружено присутствие стоматина в ВВ всех исследуемых биожидкостей, более того, показано, что данный белок может рассматриваться как

высокоспецифичный и универсальный маркер ВВ, имеющий ряд преимуществ по сравнению с другими экзосомальными маркерами. Также впервые обнаружена регуляторная взаимосвязь между белками липидных рафтов – флотиллином-2, стоматином и кавеолином-1. Впервые проведенное исследование РОБ на модели немелкоклеточного рака легкого выявило их влияние на продукцию ВВ, а также участие отдельных РОБ в регуляции злокачественного потенциала опухолевых клеток.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Скрябина Г.О. отличается убедительностью научной аргументации, обоснованностью сформулированных положений, выводов и практических рекомендаций, а также высоким методическим уровнем. Дизайн исследования в целом и последовательность отдельных этапов работы тщательно продуманы и выстроены в логичную структуру для оптимального решения поставленных задач. Выводы и положения, выносимые на защиту, полностью базируются на экспериментальных данных, полученных с использованием современных методических подходов и подтвержденных результатами статистического анализа. Полученные результаты существенно дополняют имеющееся представление об исследуемых вопросах и хорошо согласуются с современным состоянием проблемы. Результаты исследования полностью соответствуют целям и задачам диссертационной работы.

Ценность для науки и практики результатов работы

В отношении научной значимости можно выделить результаты, имеющие важное научно-методическое значение. Среди них можно отметить разработку методик выделения и анализа ВВ из желудочного сока и маточных аспиратов, практические рекомендации по количественному анализу ВВ различного происхождения, а также идентификацию нового высокоспецифичного экзосомального маркера. Данные результаты вносят существенный вклад в развитие научного направления исследований в области секретируемых ВВ в целом. Среди результатов, имеющих прежде всего фундаментальное значение в отношении развития представлений о механизмах рафт-зависимой секреции экзосом, необходимо выделить обнаружение регуляторных связей между РОБ флотиллином-2, кавеолином-1 и стоматином, а также участие этих белков в продукции ВВ. Ряд полученных результатов имеет важное научно-прикладное значение в контексте поиска новых диагностических и терапевтических мишеней в онкологии. В частности, полученные данные об увеличении содержания флотиллин-позитивных везикул в биологических жидкостях пациентов с онкозаболеваниями по сравнению со здоровыми донорами свидетельствуют о высоком потенциале везикулярного флотиллина в качестве онкомаркера для жидкостной биопсии. Кроме того, выявленное участие исследуемых РОБ в пролиферации и миграционной активности клеток НМРЛ, могут послужить основой для разработки

новых противоопухолевых препаратов и терапевтических стратегий с использованием внеклеточных везикул.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Диссертация Скрябина Г.О. соответствует паспорту научной специальности 3.1.6. Онкология и лучевая терапия, а именно: пункту 2 - Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, и др.), разработка методов экспериментальной онкологии).

Полнота освещения результатов диссертации в печати

Результаты диссертационного исследования Скрябина Глеба Олеговича отражены в 11 работах, индексируемых в международных базах Scopus и Web of Science.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, отражает логику и последовательность решения задач исследования, раскрывает основные положения, выносимые на защиту.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа изложена на 148 страницах и включает все структурные элементы, предусмотренные требованиями к кандидатским диссертациям. Содержание работы представлено следующими разделами: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение (4 главы), Заключение, Выводы (7 пунктов), Список используемых сокращений и условных обозначений, Список литературы, включая 237 источников, а также Список публикаций автора по теме диссертации (11 статей). Иллюстративный материал представлен 30 рисунками и 3 таблицами.

Введение содержит обоснование актуальности выбранной научной проблемы, степень ее разработанности в мире, оценку научной новизны, теоретической и практической значимости. В разделе четко сформулированы цель и задачи исследования, а также 4 положения, выносимые на защиту. Кратко охарактеризованы используемые в работе методики и материалы исследования, указано соответствие диссертации паспорту научной специальности, подтверждена достоверность и апробация полученных результатов. Также дана характеристика структуры и объема диссертации.

В главе «Обзор литературы» приводится анализ современного состояния проблемы в мире и данных литературных источников по тематике исследования. В разделе дается общая характеристика внеклеточных везикул, приводится последняя классификация различных типов ВВ, рассматриваются механизмы их внутриклеточного биогенеза, отдельное внимание уделено так называемому ESCRT-независимому механизму формирования экзосом, ключевую роль в котором играют липидные микродомены (рафты). Далее автор дает представление о самих липидных рафтах, характеристику

планарных и кавеолярных рафтов, подробно рассматривает их строение и функции, после чего переходит к рассмотрению РОБ, прежде всего белков семейства SPFH – флотиллинов-1, -2 и стоматина, а также белков кавеолярных рафтов. Для всех РОБ приводится характеристика структуры и основных механизмов регуляции, а также механизмы функциональной активности. Отдельно анализируются имеющиеся данные об участии каждого из белков в малигнизации клеток и патогенезе злокачественных опухолей. Последний раздел данной главы посвящен анализу возможной роли и механизмов участия исследуемых РОБ в биогенезе экзосом и других типов ВВ. Раздел хорошо структурирован, логически выстроен, обобщает самые современные представления по исследуемым вопросам, акцентирует открытые вопросы, имеющиеся пробелы и противоречия в литературных источниках. Обзор написан прекрасным языком, легко читается, хорошо иллюстрирован.

В главе «Материалы и методы» содержится подробное описание экспериментальных подходов, использованных в работе. Представлены этапы выделения ВВ из различных биологических источников на основе ультрацентрифугирования, методы их качественной характеризации и количественного анализа, включая анализ траекторий движения наночастиц, трансмиссионная и криоэлекторонная микроскопия, флуоресцентный анализ эстеразной активности и др. В работе применялись современные методы молекулярной и клеточной биологии, включая молекулярное клонирование и направленную модификацию экспрессии генов, в том числе нокдаун и гиперэкспрессию генов интереса, методы анализа нуклеиновых кислот и белков, такие как полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, иммуноблоттинг и др., а также методы анализа характеристик роста в культуре (динамика пролиферации, миграционная активность). Таким образом, методическая составляющая работы представлена широким спектром современных методик, все полученные данные анализировались с применением адекватных методов статистического анализа. Раздел написан достаточно подробно, приведены все необходимые сведения, такие как используемые нуклеотидные последовательности, праймеры и зонды, каталожные номера антител и др. Описание методик позволяет воспроизвести экспериментальные процедуры.

Раздел Результаты экспериментальных исследований разделен на четыре главы.

Глава 1 посвящена характеризации внеклеточных везикул, полученных из различных биологических жидкостей, включая плазму крови, асцитическую жидкость, биологические среды, желудочный сок и маточные аспираты. Проведен анализ концентрации, размера и морфологии везикул, а также уровень представленности экзосомальных маркеров. Важно отметить впервые в мире проведённый анализ морфологии ВВ из маточных аспиратов и желудочного сока, выполненный с использованием трансмиссионной электронной микроскопии и крио-электронной микроскопии. При этом наряду с ВВ типичной морфологии обнаружено присутствие новых морфологических форм, ранее

описанных в литературе для ВВ из нескольких других биологических источников, таких как двойные, многослойные, вытянутые ВВ, а также мультивезикулы и ряд других морфоформ.

Глава 2 посвящена сравнению методов количественного анализа ВВ из разных биологических жидкостей, направленному на оптимизацию подходов к количественной оценке везикул. Для этой задачи проведен сравнительный анализ трех методик, основанных на анализе траекторий движений наночастиц (нанотрекинговый анализ), на определении концентрации белка и на анализе эстеразной активности. По результатам данной главы сформулированы рекомендации применительно к ВВ из разных биологических источников.

В главе 3 приведены результаты анализа представленности РОБ стоматина в ВВ различного происхождения, данные сравнения уровней стоматина (как внутриклеточного, так и везикулярного) с другими РОБ (кавеолином-1, флотиллинами-1, -2), а также с другими экзосомальными маркерами. По результатам данного раздела впервые обнаружено присутствие стоматина в ВВ всех исследуемых биологических жидкостей, более того, показано, что данный РОБ соответствует всем критериям экзосомального маркера и даже превосходит другие используемые в литературе белки по универсальности и специфичности. В то же время представленность и уровень кавеолина-1 в ВВ различного происхождения, зависит от клеточного контекста и, вероятно, связана с происхождением клеток и/или степенью их злокачественности. Интересно, что по данным работы уровень флотиллина-1, белка, достаточно часто используемого в литературе в качестве экзосомального маркера, и его представленность в ВВ была в среднем ниже в биологических жидкостях, полученных от здоровых контролей, по сравнению с пациентами с онкологическими заболеваниями. Полученные данные убедительно демонстрируют, что флотиллины-1 и -2, как и кавеолин-1, в отличие от стоматина, не могут служить универсальными маркерами экзосом и, вероятно, отражают специфические субпопуляции ВВ, преимущественно опухолевого происхождения. Вместе с тем обнаруженные различия в уровне везикулярного флотиллина-1 между здоровыми донорами и пациентами свидетельствует о высоком потенциале данного белка в качестве диагностического маркера, что открывает направление дальнейших исследований флотиллина-1 в контексте жидкостной биопсии злокачественных новообразований.

Глава 4 посвящена исследованию роли изучаемых РОБ в регуляции малигнизированного фенотипа клеток немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) и их активности в отношении секреции ВВ. Для решения этой задачи автором использована экспериментальная модель, представленная двумя линиями клеток НМРЛ, H1975 и H358. Для обеих линий клеток автором получены производные сублинии как с нокдауном, так и с гиперэкспрессией всех исследуемых РОБ. Всего с учетом контролей в работе получено 9 стабильных сублиний с подтвержденным и выраженным изменением экспрессии целевых генов, что подчеркивает биологическую значимость полученных данных. По результатам

данного раздела автором выявлено участие всех трех РОБ в регуляции пролиферации и миграционной активности клеток НМРЛ, свидетельствующее об опухоль промоторной роли каждого из белков. Помимо этого, показано функциональное значение исследуемых белков в секреции везикул. Большой интерес, несомненно, представляют результаты, согласно которым исследуемые РОБ связаны негативной регуляцией, определяющий как внутриклеточный, так и везикулярный уровень данных белков. В частности, автором показано существование флотиллин-2-зависимых механизмов негативной регуляции продукции стоматина и кавеолина-1, а также взаимную регуляцию последних между собой. Причем флотиллин-2 зависимая регуляция носит однонаправленный характер, то есть флотиллин-2 является вышестоящим негативным регулятором, модулируя уровни стоматина и кавеолина-1, но не наоборот. Важно подчеркнуть, что этот механизм представляется достаточно универсальным, поскольку имеет место в случае двух разных линий НМРЛ. Важно также то, что направленное редактирование экспрессии флотиллина-2 приводило не только к изменению внутриклеточного содержания стоматина и кавеолина-1, но и меняло соотношение данных белков в секретируемых ВВ. В совокупности эти данные свидетельствуют о наличии конкурентных и компенсаторных механизмов, регулирующих состав РОБ, и направленных, по-видимому, на поддержание функциональной активности липидных рафтов, в том числе в отношении рафт-зависимого биогенеза везикул.

Представленные в каждом из разделов экспериментальные данные и основные результаты анализируются и обсуждаются автором, приводится возможная интерпретация результатов и сопоставление с данными литературы, включая самые современные литературные источники.

Раздел Заключение содержит обобщение ключевых результатов диссертационного исследования, подтверждающих достижение поставленной цели, научную новизну и научно-практическую значимость полученных данных. На основании полученных результатов сформулированы 7 выводов, отражающих все основные результаты исследования и полностью соответствующие сформулированным задачам. Выводы убедительно аргументированы и четко сформулированы.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

В диссертационной работе Скрябина Глеба Олеговича получены новые данные, касающиеся актуальной проблемы - исследования рафт-образующих белков в контексте секреции опухолевыми клетками внеклеточных везикул, имеющие существенное фундаментальное и научно-методическое значение. Хочется отметить высокий методический уровень исследования и уровень доказательности результатов, большое внимание и тщательное отношение к выбору методов исследования, а также логику и последовательность в дизайне экспериментов и изложении результатов. Необходимо отметить, что работа имеет массу достоинств, однако несмотря на общее положительное впечатление, необходимо отметить ряд замечаний.

1) Не вполне понятно, зачем проводилась характеризация везикул из различных биологических жидкостей, в частности, из желудочного сока, и как это связано с немелкоклеточным раком лёгких. В работе недостаточно чётко отражена эта связь.

2) В работе автор допускает использование нёточных формулировок, в частности, «лентивирусная и ретровирусная «траснсфекция», хотя очевидно, что термин трансфекция имеет отношение к транзиторному внесению генетических конструкций с использованием различных трансфектантов, если речь идёт о внесении генетических конструкций с помощью ретровирусных или лентивирусных веткоров, принятно использовать термин «трансдукция», который позволяет избегать путаницы и более конкретно отражает то, какой именно методический приём был использован.

3) Страница 56-57, съехали последовательности праймеров и по сути не видны.

4) «Олигонуклеотиды отжигали друг с другом при +95°С в эквимолярном соотношении в течение 10 минут, после чего полученную вставку разбавляли до рабочей концентрации 2 пмоль/мкл».

Формулировка, представленная в диссертации не ясна, а факт обнаружения возможности отжечь две олигонуклеотитдные последовательности при +95°С сам по себе заслуживает написания диссертации. Как и к предыдущему замечанию, автору конечно следовало более внимательно оформить и «вычитать» диссертацию.

5) В результатах содержатся обсуждения, которые больше похожи на обзор литературы, чем сопоставление данных, полученных автором с теми, которые были получены другими группами или анализ полученных результатов. Учитывая, что эти рассуждения идут до представления результатов.

6) С. 71, не понятно про результаты исследования экзосомальных маркёров. В данной главе 1 диссертации эти результаты не представлены. Результаты такого исследования появляются только в главе 3. Существенно упростило бы восприятие, если бы в главе 1 в соответствующем разделе содержалось упоминание о том, где конкретно в диссертации читатель должен посмотреть эти результаты или привести результаты так, чтобы они появлялись именно там, где упомянуто об их получении.

7) На стр. 87 присутствует название подраздела 3.2 «Стоматин демонстрирует бóльшую специфичность в качестве экзосомального маркера по сравнению с флотиллинами». Исходя из этого заглавия и результатов, представленных на Рисунке 20, подразумевается, что именно он должен раскрыть аспекты, связанные со специфичностью стоматина. Однако из этого конкретного раздела и рисунка не понятно, в чём выражается большая специфичность стоматина как маркёра ВВ по сравнению с флотилином. С другой стороны, результаты свидетельствующие в пользу того, что стоматин действительно является более специфичным маркером, представлены в последующих разделах. Приведённая в тексте диссертации компоновка названий разделов и результатов не всегда соответствует друг другу, что усложняет чтение диссертации.

8) На странице 100 использован термин «степень злокачественности клеток», не вполне понятно по какой шкале это оценивалось в работе, и что служило критерием для такой оценки.

9) На рисунке рисунок 26 кривые представлены одним цветом, что затрудняет их восприятие.

10) Автор делает вывод: «Таким образом, впервые полученные в настоящей работе данные убедительно свидетельствуют о существовании флотиллин-2-зависимых механизмов регуляции продукции стоматина и кавеолина-1, причем этот механизм представляется достаточно универсальным, поскольку эффект имеет место в случае двух разных линий НМРЛ». Хочется порекомендовать автору использовать менее категоричные формулировки, поскольку обнаружение эффекта на двух клеточных линиях вряд ли может строго свидетельствовать о наличии какого-то универсального механизма.

11) Из рисунка 28 явно видно, что в клетках линии H358 гиперэкспрессия стоматина приводит к увеличению экспрессии кальвеолина, также подавление экспрессии стоматина приводит к видимому повышению экспрессии кальвеолина. В этом контексте вывод о «Таким образом, в случае со стоматином, в отличие от других РОБ, мы наблюдали ассиметричный эффект – повышение кавеолина-1 в обеих линиях клеток при нокдауне и отсутствие изменений кавеолина-1 – при гиперэкспрессии» Вывод о сделанных наблюдениях выглядит немного упрощённым. Отсутствие графиков, отражающих наблюдаемые изменения в представленности белков усложняет анализ результатов и соотнесение представленных на рисунке данных с текстом диссертации.

12) Также в работе содержится ряд опечаток и неудачных формулировок, которые затрудняют восприятие написанного.

Например: «нокдаун флотиллина-1 с помощью siRNA приводил к значительному снижению уровня кавеолина-1, которое можно было предотвратить при добавлении ингибитора лизосом (но не протосом); «направленное редактирование экспрессии флотиллина-2»; «трансдуцированных методом псевдолентивирусной инфекции» и т.п.

Также, в качестве пожелания к работе можно порекомендовать сделать схему, обобщающую результаты разделов, касающихся обнаруженных механизмов взаиморегуляции РОБ, включающую, в том числе, гипотетическую модель для объяснения механизмов такой регуляции.

Однако, необходимо отметить, что приведённые замечания ничуть не умаляют достоинств данной работы, которая оставляет очень хорошее впечатление.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Скрябина Глеба Олеговича на тему: «Состав и функциональное значение белков липидных рафтов в экзосомах и микровезикулах, секретируемых клетками злокачественных опухолей», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершенным научно-квалификационным исследованием, в котором

автором решен ряд задач в области экспериментальной онкологии, в частности, в области исследования внеклеточных везикул, секретируемых клетками злокачественных опухолей, а также белков липидных рафтов в контексте биологии внеклеточных везикул и регуляции злокачественного фенотипа опухолевых клеток. Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, согласно п. 2.2 раздела II (кандидатская) 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:

Старший научный сотрудник лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН,

доктор биологических наук (1.5.3 Молекулярная биология),

Спирин Павел Владимирович

Подпись д.б.н. Спирина П.В. заверяю

Ученый секретарь, к.ф.-м.н.

Коновалова Елизавета Владимировна

«02» 04 2026 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Адрес: ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

Телефон: +7 (499) 135-23-11

e-mail: isinfo@eimb.ru, сайт: https://www.eimb.ru/