

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Тамкович Светланы Николаевны

Циркулирующие дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и экзосомы в крови больных раком молочной железы: особенности состава, биологические функции и диагностический потенциал,

представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

Актуальность исследования

Рак молочной железы (РМЖ) – самое распространенное женское онкологическое заболевание, регистрируемое в развитых странах мира. Большинство видов рака молочной железы можно диагностировать с помощью гистологического/иммуногистологического анализа биопсийного материала пораженного участка молочной железы, однако часто на ранних стадиях опухолевого процесса такой участок определить затруднительно. Кроме того, существуют виды РМЖ, которые требуют специальных лабораторных исследований для правильной постановки диагноза. Ввиду сложности ранней диагностики РМЖ это заболевание является одним из лидирующих онкологических заболеваний женщин, по уровням заболеваемости, инвалидизации и смертности. В течение последних десятилетий усилия ученых были сосредоточены на поиске молекулярных маркеров, позволяющих уверенно диагностировать наличие онкологического процесса в организме на ранних стадиях его развития, так как такая ранняя диагностика позволяет сохранить жизнь пациента. В качестве источника таких маркеров рассматривают пул циркулирующих в крови нуклеиновых кислот (вДНК, вРНК), разнообразных микровезикул, в том числе и экзосом, секретируемых всеми клетками организма, и белково-нуклеиновых комплексов, циркулирующих в крови или находящихся в других биологических жидкостях организма. Именно исследованию этой проблематики, а именно комплексному анализу циркулирующих в крови дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом при РМЖ посвящена диссертационная работа С.Н. Тамкович.

Несмотря на то, что внеклеточная или циркулирующая ДНК впервые была описана в середине прошлого века, а об экзосомах научное сообщество узнало примерно в 80-х годах прошлого века, интенсивные исследования в этой области начались только с 2000-х годов, когда появились высокопроизводительные омиксные технологии и были созданы базы данных, аккумулирующие полученные разными исследователями данные. Сегодня большинство публикаций сосредоточены на разработке методов диагностики онкологических заболеваний на основе внеклеточной ДНК и микроРНК экзосом, выделяемых из крови или других биологических жидкостей, однако многие фундаментальные вопросы в этой области остаются открытыми. К этим вопросам можно отнести вопрос о механизмах появления внеклеточной ДНК в циркуляции, о распределении внеклеточной ДНК и экзосом между различными фракциями крови и форменными элементами, об упаковке вДНК в белковые комплексы, «спасающие» ее от эндогенных нуклеаз, а также биологические функции нуклеопротеиновых комплексов и экзосом. Все эти вопросы поставлены в диссертационной работе Тамкович С.Н., что определяет актуальность работы.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Тамкович С.Н. написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных экспериментальных подходов, и трех глав, посвященных изложению результатов собственных исследований и их обсуждению, заключения по диссертации, выводов, путей возможного применения результатов и научных выводов диссертации, списка литературы, включающего 570 источников и приложений. Общий объем диссертации 332 страницы, включая 61 рисунок и 32 таблицы.

В разделе «Введение» представлена актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, изложена научная новизна и практическая значимость результатов, сформулированы положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы (Глава 1 диссертации) автор поделила на три части. Первая часть Главы 1 посвящена феномену циркулирующих дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и их роли в канцерогенезе. Рассмотрены эндогенные источники и форма циркуляции внеклеточной ДНК в крови, влияние гидролаз на концентрацию, фрагментацию, распределение внеклеточной ДНК между фракциями крови, приведены последние данные о биологической роли внеклеточной ДНК. Вторая часть Главы 1 содержит информацию о биогенезе и составе экзосом, роли экзосом в развитии онкологических заболеваний, в частности стимуляции опухолевыми экзосомами эпителиально–мезенхимального перехода (ЭМП), миграции, инвазии, ангиогенеза и метастазирования. С учетом важности методологических аспектов работы с наноразмерными объектами, один из разделов обзора посвящен описанию минимальных экспериментальных требований для определения внеклеточных везикул и их функциональной активности. В третьей части обзора рассмотрены проблемы заболеваемости и смертности от РМЖ, охарактеризованы методы инструментальной и молекулярной диагностики данного заболевания. Здесь же автор анализирует перспективы использования «жидкостной биопсии» для диагностики, прогноза и мониторинга злокачественных новообразований, в том числе на основе внеклеточной ДНК и белков экзосом. В «Заключении» обзора литературы автор делает вывод о перспективности анализа опухолевых белков экзосом плазмы крови, анализа уровней микроРНК экзосом, а также статуса метилирования промоторных областей генов онкосупрессоров в вДНК для ранней диагностики РМЖ методом «жидкостной биопсии».

Глава 2 «Материалы и методы» предоставляет информацию о методах, использованных при проведении исследования. Следует отметить, что в работе использован широкий спектр современных биохимических, молекулярно-биологических методов исследования (иммунизация животных и получение поликлональных антител, синтез аффинных сорбентов и конъюгатов антител с пероксидазой хрена, трековый анализ, проточная цитофлуорометрия, ПЦР в режиме «реального времени» и т.д.) и биоинформатических подходов, а также несколько биологических объектов (кровь человека, эукариотические клетки, кролики.). Ввиду того, что в работе использованы препараты цельной крови пациентов с РМЖ и здоровых доноров С.Н. Тамкович детально описывает критерии включения и исключения женщин, вовлеченных в исследование, и дает общую характеристику клинического материала. Всего в работе использованы

образцы крови 190 здоровых женщин и 194 первичных больных РМЖ. Следует особенно отметить подробно написанные экспериментальные протоколы.

Результаты исследования представлены в Главах 3-5, две из которых Тамкович С.Н. начинает с тщательной характеристики образцов в соответствии с существующими международными стандартами. В Главе 3 в результате сравнительного анализа установлены отличия размера внеклеточной ДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с поверхностью форменных элементов крови, в норме и при РМЖ; исследован уровень метилирования промоторной части гена онкосупрессора RAR β 2 в составе низкомолекулярных и высокомолекулярных фрагментов для оценки значимости размера внеклеточной ДНК и ее источника (из плазмы или связанной с клетками крови) для разработки диагностических подходов методом «жидкостной биопсии». В составе нативных нуклеопротеиновых комплексов методом масс-спектрометрии автором впервые описан ансамбль белков, в составе которых циркулирует в крови вДНК. Дальнейший биоинформатический анализ позволил автору установить, что только треть белков в нуклеопротеиновых комплексах являются ДНК-связывающими, а 2/3 - белками-«пассажирами», при этом при РМЖ в пуле ДНК-связывающих белков возрастает доля белков, регулирующих метаболизм нуклеиновых кислот и снижается доля белков, вовлеченных в процессы межклеточной коммуникации и передачи сигналов, а в составе белков-«пассажиров» – возрастает доля транспортных белков и снижается доля белков энергетических биологических путей. Идентифицированные в работе опухоли-ассоциированные белки могут быть использованы в качестве самостоятельной панели, что позволит точнее дифференцировать начальные стадии РМЖ.

Глава 4 посвящена исследованию феномена экзосом крови онкологических больных. Сравнительный анализ экзосом плазмы и экзосом, связанных с форменными элементами крови (далее, экзосомы крови) позволил крови выявить значительные отличия в их морфологии, а повышение уровней 20S протеасом и ADAM-10 в CD9+субпопуляции везикул у больных РМЖ свидетельствуют о вовлечении в канцерогенез как тетраспанин-ассоциированных, так и тетраспанин-неассоциированных протеаз экзосом. Тамкович С.Н. впервые описала протеом экзосом крови и с помощью биоинформатических подходов предсказала молекулярные функции и биологическую функцию белков экзосом в норме и при РМЖ. В частности, при РМЖ экзосомы крови в большей степени, чем экзосомы плазмы, обогащены белками, стимулирующими ЭМП, клеточную пролиферацию, миграцию и инвазию, а в норме протеом таких экзосом обогащен белками, ингибирующими эти процессы. Выявленные автором опухоли-ассоциированные белки в составе экзосом могут быть полезны для разработки методов неинвазивной диагностики рака молочной железы.

В Главе 5 автор доказал в экспериментах *in vitro* предсказанные в Главе 4 эффекты экзосом. В частности, на культурах клеток псевдо-нормальных эпителиоцитов и карциномы молочной железы показано, что экзосомы крови онкологических больных индуцируют ЭМП и стимулируют формирование капилляро-подобных структур, клеточную подвижность и пролиферацию, а экзосомы крови здоровых женщин подавляют формирование капилляро-подобных структур и уменьшают длину мотильности клеток псевдо-нормальных эпителиоцитов, при этом стимулируя ЭМП и пролиферацию. В «Заключении» автором представлено полное обобщение полученных результатов и их

обсуждение с позиций современных представлений. Сформулировано 6 выводов, полностью соответствующих цели и поставленным задачам, дано три рекомендации по применению полученных результатов и научных выводов.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

Работа выполнена в актуальной области, на стыке биохимии, молекулярной биологии и молекулярной онкологии. Представленное автором исследование вносит существенный вклад в понимание особенностей циркуляции в крови внеклеточной ДНК и экзосом при наличии злокачественного заболевания. В работе в составе уникальных белков нуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих в крови больных РМЖ, выявлены ДНК-связывающие мотивы, которые могут быть использованы для обогащения опухолевой ДНК, а наибольший индекс метилирования характерен для ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови онкологических больных, что необходимо учитывать при разработке ПЦР-систем для «жидкостной биопсии». Получены данные об изменении морфологии и белкового профиля экзосом крови при РМЖ, предсказанные функции белков экзосом в канцерогенезе подтверждены автором в экспериментах *in vitro*. Предложенные автором диагностические подходы требуют клинической валидации на большой выборке пациентов, но это что выходит за рамки данной диссертационной работы. Практическая значимость исследования заключается в выявлении новых белковых маркеров РМЖ в составе нуклеопротеиновых комплексов и экзосом крови и демонстрации их диагностического потенциала.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключения диссертации

Дизайн проведенного исследования соответствует поставленной цели диссертационной работы, что позволило обоснованно решить поставленные задачи исследования, сформулировать выводы, положения, выносимые на защиту и рекомендации по применению полученных результатов и научных выводов. Достаточный объем выборки обследованных женщин (194 больных РМЖ и 190 здоровых женщин), использование современных, адекватных поставленным задачам, биохимических и молекулярно-биологических методов исследования, способствовали решению поставленных задач. Диссертация представляет законченное исследование, выполненное на современном методическом и теоретическом уровнях. Выводы корректны и соответствуют полученным результатам.

Результаты, представленные в диссертационной работе С.Н. Тамкович, апробированы на 65-ти международных и российских научных конференциях. По теме диссертации опубликована 31 статья в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК (из них 6 - первого квартиля), 3 патента РФ и 1 свидетельство о регистрации.

Автореферат диссертации (изложен на 41 странице), хорошо написан, достаточно подробно иллюстрирует все полученные результаты и сделанные на их основе выводы, полностью соответствует содержанию диссертации и дает представление об основных положениях работы.

Диссертационная работа Тамкович С.Н. хорошо написана и оформлена, тем не менее имеются опечатки (особенно в Главе 1), неудачные формулировки и стилистические погрешности, кальки с английского, и внезапный переход на английские названия белков (см. например. Стр 25). Кроме того, неудобство при чтении создает то, что сокращения, первый раз встречаемые в тексте, не расшифрованы и нужно обращаться к списку сокращений. Также следует отметить, что результаты статистической обработки данных приведены не на рисунках, где эти данные представлены, а в тексте диссертации, что затрудняет и чтение, и восприятие приведенных данных на рисунках.

При прочтении возникли следующие вопросы, на которые хочется получить ответы соискателя:

1. На рис. 13, непонятно на каком основании выбраны маркеры длины в 35 и 10380 п.н., не ясно на каком основании автор делает вывод о наличии тех или иных фрагментов вДНК, так как пики не подписаны и неверно указана ссылка на рисунок д и е - это PBS-EDTA и трипсиновый элюат с поверхности ФЭК больных РМЖ, а не здоровых и больных РМЖ, соответственно (стр. 122)
2. В диссертации фактически не описан принцип метода определения концов циркулирующей вДНК (стр. 124-126.). Приведенные рисунки 14 и 15 не описаны в тексте и не обсуждены, но по ним сразу же сделан вывод, это вывод 1.1. Не обсуждается достоверность полученных результатов. Также не ясно на каком основании сделан вывод о том, что при РМЖ примерно одна треть вДНК высвобождается из некротизирующих клеток (стр. 126).
3. Стр. 134 – 136. При анализе состава белков НПК, выделенных из плазмы и элюированных с поверхности ФЭК (Рис. 21, Таблица 12) найдены несколько белков (наиболее представленных 9, приведены в таблице 12), но затем обсуждается только сывороточный альбумин, а остальные белки, даже более представленные – не обсуждаются.
4. Раздел 3.2.3. Из теста данного раздела и приведенных данных рис. 39 не ясно каким образом автор диссертации приходит к выводу, что именно эти пять белков: SPG7, ADRB1, SMCO4, PHF1 PSMG1 в составе НПК позволяют дискриминировать больных РМЖ от здоровых доноров.
5. Аналогичные комментарии хочется получить и относительно идентификации белков экзосом крови (APPBP2, KRT1, KRT6B, SERPINA1 SOCS3), которые формируют панель, также позволяющую дискриминировать больных РМЖ от здоровых доноров.

Все приведенные вопросы носят уточняющий и дискуссионный характер и не снижают научной значимости представленной диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Тамкович Светланы Николаевны “Циркулирующие дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и экзосомы в крови больных раком молочной железы: особенности состава, биологические функции и диагностический потенциал” является цельным завершенным научным исследованием и по своей актуальности, новизне, объему, научной и практической значимости результатов полностью соответствует требованиям и критериям, установленным в пп. 2.1.-2.5 Положения о

присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора биологических наук. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями № 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а ее автор, Тамкович Светлана Николаевна, безусловно заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Официальный оппонент

Заведующая лабораторией биохимии нуклеиновых кислот
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН

Зенкова Марина Аркадьевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8
Телефон: (383)363-51-60
Эл. почта: marzen@niboch.nsc.ru

Подпись Зенковой Марины Аркадьевны заверяю
ученый секретарь ФГБУН Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН
к.б.н. Логашенко Е.В.



«15»  2023 г.