

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 темы выполненной работы

Внеклеточные нуклеиновые кислоты и везикулы, циркулирующие в крови привлекают все больше внимание исследователей. На сегодняшний день достоверно показано, что экзосомы осуществляют межклеточную коммуникацию как в физиологических процессах, так и при развитии различных патологий. Несмотря на постоянно пополняющийся список предписываемых экзосомам функций, механизмов сборки и секреции, транспортируемых ими белков, липидов, метаболитов и нуклеиновых кислот, изучение их роли в возникновении злокачественных новообразований и распространении только набирает актуальность. В свою очередь, несмотря на более глубокую историю изучения, о строении, форме циркуляции и роли внеклеточных нуклеиновых кислот известно ещё меньше. Учитывая повышенный интерес к внеклеточной ДНК и экзосомам в качестве источников материала для «жидкостной биопсии» необходимы детальные исследования особенностей их циркуляции и строения, выполняемых функций в норме и при развитии патологии. Сочетание фундаментальной и прикладной значимости делает диссертационную работу весьма актуальной.

Работа Тамкович С.Н. представляет собой первое комплексное исследование посвященной изучению внеклеточной ДНК экзосом циркулирующих в крови условно здоровых женщин и первичных больных раком молочной железы. Впервые исследованы размер и концы внеклеточной ДНК плазмы и внеклеточной ДНК, ассоциированной с поверхностью форменных элементов крови, оценена эффективность выявления в их составе эпигенетических маркеров злокачественных новообразований для «жидкостной биопсии». С помощью масс-спектрометрии идентифицированы белки, формирующие в крови комплексы с внеклеточной ДНК, и с помощью биоинформатических подходов предсказаны функции и биологическая роль ДНК-связывающих белков и белков-«пассажира». Светланой Николаевной с помощью крио-микроскопии впервые описано изменение морфологии как экзосом плазмы, так и экзосом крови (включают в себя экзосомы плазмы и экзосомы, ассоциированные с поверхностью форменных элементов) у больных раком молочной железы, а сравнительным протеомным анализом в составе

экзосом крови выявлена гиперпредставленность белков, потенциально приводящих к опухолевой диссеминации. Предсказанная биоинформатическим анализом роль экзосом в крови онкологических больных подтверждена в экспериментах *in vitro* на культурах первичных и трансформированных клеток.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа Тамкович С.Н. построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, применения результатов и научных выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 332 страницах, содержит 61 рисунок, 32 таблицы и 14 приложений. Список использованной литературы включает 570 источников.

Во введении автор обосновывает актуальность исследования, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов, формулирует цели и задачи своей работы, а также положения, выносимые на защиту.

Глава 1, содержащая обзор литературы, поделена на логично связанные три части. Первая часть посвящена феномену внеклеточной ДНК, в частности, процессам, ответственным за её появление в кровотоке, формам циркуляции, фрагментации и влиянию гидролаз крови на её циркуляцию, а также биологической роли внеклеточной ДНК. Вторая часть посвящена экзосомам, в частности, их происхождению и составу, современных представлениях об их функциях и роли в развитии злокачественных новообразований. Третья часть обзора литературы посвящена проблемам диагностики рака молочной железы и перспективам использования «жидкостной биопсии». Автор анализирует недостатки инструментальных и молекулярных методов диагностики, приводит аргументы в пользу поиска опухолевых маркеров в составе внеклеточной ДНК, опухоли-ассоциированных микроРНК и белков в составе экзосом крови больных раком молочной железы.

Глава 2, содержащая описание материалов и методов исследований подробно описывает научно-методологические подходы, примененные автором для решения поставленных задач и достижения цели исследования. В работе Тамкович С.Н. используется чрезвычайно широкий спектр современных методов молекулярной биологии, биохимии и биоинформатики. Все методики, использованные в исследовании, достаточно детально прописаны и пояснены, что предоставляет возможность воспроизведения экспериментов по приведенным протоколам.

Главы 3, 4 и 5 посвящены описанию и обсуждению результатов исследования. Описаны процессы выделения и характеристики образцов в соответствии с существующими международными стандартами. Главу 3 автор посвятил дезоксирибонуклеопротеиновым комплексам, Главу 4 - сравнительному анализу экзосом в норме и при раке молочной железы, а Главу 5 - роли экзосом в развитии рака молочной железы. В Главе 3 Тамкович С.Н. уделяет внимание строению концов и фрагментации внеклеточной ДНК, циркулирующей в плазме и ассоциированной с поверхностью форменных элементов крови. Полученные результаты позволяют автору сделать выводы о вкладе апоптоза, некроза и активной секреции в появление ДНК в кровотоке. Полученные данные о распределении aberrантно-метилованной ДНК в составе короткой и длинной внеклеточной ДНК при раке молочной железы будут полезны для разработки ПЦР-систем для «жидкостной биопсии». Впервые идентифицированы белки, участвующие в формировании нуклеопротеиновых комплексов в крови, а с помощью биоинформатических подходов проанализированы функциональные различия ДНК-связывающих белков с белками-«пассажирами» как в норме, так и при раке молочной железы. Кроме того, автором показана вовлеченность белков в составе циркулирующих нуклеопротеиновых комплексов в различные процессы, в том числе связанные с распространением опухоли, а также представленность идентифицированных белков в базах данных, содержащих белки, по литературным данным гиперэкспрессированные и маркерные для ряда онкологических заболеваний. Выявленные ДНК-связывающие мотивы и опухоли-ассоциированные белки в составе комплексов могут быть использованы для обогащения опухолевой ДНК при разработке «жидкостной биопсии» на основе внеклеточной ДНК. В Главе 4 автор описывает экзосомы плазмы и экзосомы крови условно здоровых женщин и больных раком молочной железы. При онкологическом заболевании выявлено увеличение концентрации и изменение морфологии обеих фракций везикул. Увеличение уровня тетраспанин-ассоциированных и тетраспанин-неассоциированных протеаз в составе экзосом плазмы и экзосом крови онкологических больных указывает на различные механизмы сортировки белков в везикулы при раке и значимую роль экзосом крови в развитии заболевания. Автором впервые охарактеризован протеом экзосом крови и проведено сравнение идентифицированных белков с крупнейшими базами данных, содержащих информацию о внеклеточных везикулах. С использованием методов анализа функционального обогащения и терминов генных онтологий, предсказаны молекулярные функции и биологическая роль экзосомальных белков в норме и при раке молочной железы, а также выявлены белки, вовлеченные в опухолевую диссеминацию. Глава 5 посвящена обсуждению результатов, полученных в

экспериментах *in vitro*. Автор показал, что экзосомы плазмы и экзосом крови больных раком молочной железы обладают сходными, но не идентичными эффектами, направленными на стимуляцию канцерогенеза.

В целом, Главы 3-5, включающие результаты и обсуждение, хорошо структурированы и иллюстрированы многочисленными рисунками и приложениями, которые облегчают восприятие материала. Несомненным достоинством изложения материала является пошаговое обсуждение полученных результатов с известными данными, что также облегчает восприятие материала.

В «Заключении» автор анализирует собственные результаты исследования в сравнении с уже имеющимися литературными данными.

Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного экспериментального исследования. Светлана Николаевна выносит на защиту семь научных положений, логично вытекающих из анализа результатов исследования и в достаточной степени аргументированные полученными результатами. Обоснованность научных положений и выводов, таким образом, не вызывает сомнений. Материал, представленный в диссертации, получен и проанализирован автором исследования лично либо при его непосредственном участии.

В разделе «Применение результатов и научных выводов» автор предлагает результаты своего исследования использовать для разработки тест-систем для диагностики онкологических заболеваний методом «жидкостной биопсии», в том числе РМЖ.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

В работе проведено первое комплексное исследование циркулирующих в крови дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом в крови условно здоровых женщин и первичных больных раком молочной железы. Автором впервые охарактеризованы фрагментация и строение концов внеклеточной ДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови, что свидетельствует о том, что при развитии онкологического заболевания не менее 1/3 внеклеточной ДНК высвобождается в кровь из некротических клеток. Показано, что наибольший индекс метилирования выявлен в ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови больных РМЖ, что очень важно для разработки диагностических ПЦР-систем для «жидкостной биопсии». Автором впервые охарактеризована белковая составляющая в составе циркулирующих

дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов, предсказаны их молекулярные функции и биологические процессы, в которых участвуют идентифицированные белки. Выявлено увеличение концентрации и изменение морфологии и белкового состава как экзосом плазмы, так и экзосом крови (включают в себя фракцию экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с форменными элементами) у больных раком молочной железы по сравнению с условно здоровыми женщинами. Показано, что экзосомы и нуклеопротеиновые комплексы транспортируют белки, вовлечённые в такие процессы как клеточная пролиферация и подвижность, эпителиально-мезенхимальный переход, ангиогенез. В работе также определен ряд белков, которые можно рассматривать как потенциальные биомаркеры злокачественных новообразований молочной железы. Проведенные автором эксперименты *in vitro* подтвердили предсказанные биоинформатическими подходами находки.

Достоверность и обоснованность результатов исследований

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием широкого спектра современных биохимических и молекулярно-биологических методов исследований, детальным анализом полученных данных и корректными способами статистической обработки. По теме диссертационной работы опубликована 31 статья в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК и 3 патента РФ и 1 свидетельство о регистрации, результаты доложены и обсуждены на 65-ти международных и российских научных конференциях.

Автореферат полностью отражает основные материалы диссертации. Принципиальных замечаний по рецензируемой диссертационной работе нет. Имеются опечатки и стилистические погрешности.

В ходе ознакомления с диссертацией возникли следующие вопросы дискуссионного характера:

1. На какой научной гипотезе основано разделение внеклеточных ДНК (дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов) и экзосом на плазменные и ассоциированные с форменными элементами крови?
2. Будут ли отличаться протеиновые профили экзосом и нуклеопротеиновых комплексов у онкологических больных с разной стадией, разным гормональным и/или рецепторным статусом? Проводилось ли такое сравнение в рамках настоящей работы?
3. По полученным результатам исследования, предлагается использовать 5 белков в составе экзосом крови (APPBP2, KRT1, KRT6B, SERPINA1, SOCS3)

и 5 белков в составе НПК (SPG7, ADRB1, SMCO4,PHF1,PSMG1) для дифференцировки больных РМЖ от условно здоровых женщин методом «жидкостной биопсии». Все ли белки в составе НПК и экзосом являются специфичными для рака молочной железы? Чем обусловлено различие белковых профилей экзосом крови и НПК?

Заключение

Диссертационная работа **Тамкович Светланы Николаевны** “Циркулирующие дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и экзосомы в крови больных раком молочной железы: особенности состава, биологические функции и диагностический потенциал”, представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия является цельным завершённым научным исследованием. По своей актуальности, научной новизне, практической значимости, набору методов, объёму выполненных исследований и достоверности полученных результатов представленная работа 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. Диссертационная работа оформлена в соответствии с Приложениями № 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Тамкович Светлана Николаевна, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Официальный оппонент

Кайгородова Евгения Викторовна, доктор медицинских наук по специальностям 3.3.3, 1.5.22, доцент по специальности 1.5.3., профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

e-mail: kaygorodova.ev@ssmu.ru

тел. 8 (3822) 901-101 добавочный 1853, моб. т. +79609711613

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

office@ssmu.ru



ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ
Ученый секретарь
 М.В. Терехова
01. 12 20 23