

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 исследования

За последние годы разработаны и внедрены в клинику новые технологии скрининга, диагностики и терапии онкологических заболеваний. В то же время, несмотря на успехи фундаментальной и практической онкологии, злокачественные новообразования сохраняют лидирующие позиции в статистике заболеваемости и смертности населения. Одними из перспективных маркеров могут быть циркулирующие в крови малые экстраклеточные везикулы (далее экзосомы) и ДНК, которые можно выявлять в том числе на разных стадиях заболевания. В связи с бурным развитием современных молекулярно-биологических и биохимических технологий, ведутся активные исследования экзосом, особенно их роли в метастазировании, при этом роль циркулирующей ДНК в крови до сих пор остается неясной. Полученные в работе нативные дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы позволили путем идентификации белковой компоненты впервые описать форму циркуляции внеклеточной ДНК, выявить уникальные для рака ДНК-связывающие мотивы, с помощью которых можно провести обогащение опухолевой ДНК из общего пула ДНК, а это, в свою очередь, повысит чувствительность разрабатываемых тест-систем для выявления рака молочной железы. Полученные данные о наибольшем индексе метилирования ДНК, связанной с клетками крови, по сравнению с ДНК плазмы также является несомненным вкладом в молекулярную медицину. Проведенный в работе биоинформатический анализ белков дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов косвенно свидетельствует об их вовлеченности в канцерогенез. Помимо дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов, большой интерес представляют экзосомы крови, опосредующие механизм везикулярного межклеточного транспорта. Подробное сравнительное описание морфологии, состава и функций белков в составе экзосом плазмы и экзосом цельной крови, а также проведенные *in vitro* эксперименты по эффектам экзосом на псевдо-нормальные и раковые клетки указывают на важное физиологическое значение межклеточного взаимодействия и большой диагностический потенциал экзосом крови.

В связи с вышеизложенным цель диссертационной работы Тамкович С.Н. - исследование распределения и состава дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом в крови

больных РМЖ, установление диагностической значимости их анализа - является актуальной научной проблемой.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Тамкович С.Н. изложена на 332 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований с обсуждением, заключения, выводов, применения результатов и выводов, списка литературы, приложений. Работа иллюстрирована 61 рисунком и 32 таблицами.

Во «Введении» с учетом современных научных сведений, касающихся циркулирующей ДНК и экзосом, автор обосновывает актуальность темы проведенной работы, анализирует разработанность темы другими авторами, формулирует цель и задачи исследования, указывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость. Положения, выносимые на защиту, отражают результаты исследования и не вызывают возражений.

В первой главе представлен подробный обзор литературы, включающий данные по вариантам происхождения ДНК в крови, ее фрагментации и форме циркуляции, освещены работы, направленные на выяснение биологической роли этой ДНК. Затем автор переходит к роли экзосом в развитии солидных опухолей. После подробного анализа рекомендаций Общества по исследованию внеклеточных везикул, биогенеза и биохимического состава экзосом, приведены доказательства стимуляции экзосомами опухолевого происхождения эпителиально-мезенхимального перехода, миграции, инвазии, ангиогенеза и метастазирования. Логичным завершением Главы 1 является раздел, освещающий проблемы диагностики рака молочной железы и перспективы использования «жидкостной биопсии». Приведены достоинства и недостатки инструментальных и молекулярных методов диагностики данного заболевания, ожидания от эффективности «жидкостной биопсии» для диагностики, прогноза и мониторинга злокачественных новообразований.

В Главе 2 Тамкович С.Н. приводит описание использованных в работе материалов и методов. Объем «Материалов и методов» составляет 34 страницы, раздел хорошо структурирован, а методы подробно описаны. Следует подчеркнуть ультрасовременные методы исследования, использованные в работе.

Результаты и обсуждение начинаются с дизайна исследования. Несмотря на достаточно большие выборки (190 здоровых женщин и 194 онкологических больных), ёмкая схема дает представление о количестве использованных образцов в каждом эксперименте: как при исследовании НПК, так и экзосом крови условно здоровых женщин и больных раком молочной

железы. Также приятное впечатление производит тщательная характеристика образцов крови, ДНК-белковых комплексов и экзосом в соответствии с международными стандартами. Глава 3 освещает полученные автором результаты и обсуждение с данными в этой области по фрагментации, форме концов и индексу метилирования циркулирующей ДНК в плазме и ассоциированной с форменными элементами. Заметно, что идентифицированные по масс-спектрометрии белки из нативных нуклеопротеиновых комплексов и предсказанные им биоинформатическими подходами функции автору сложно обсуждать, что очевидно связано с малым количеством информации в области белков, формирующих комплексы с ДНК в крови. Тем не менее, в итоге автор смог выявить пять белков, которые имеют не только фундаментальную значимость, но и могут быть использованы для разработки подходов неинвазивной диагностики рака молочной железы. Глава 4 включает полученные Тамкович С.Н. результаты по экзосомам крови, в состав которых входят экзосомы плазмы и экзосомы, ассоциированные с форменными элементами крови. Автор последовательно доказывает, что свободно циркулирующие экзосомы и связанные с клетками экзосомы – это разные субпопуляции как по морфологии, так и по белковому составу. При онкологическом заболевании возрастает концентрация как экзосом плазмы, так и экзосом крови, причем в составе последних с использованием биоинформатических подходов выявлено больше опухоль-ассоциированных белков. Автор убедительно показывает, что использование белков экзосом крови более информативно для дифференцирования здоровых женщин и больных раком молочной железы по сравнению с белками экзосом плазмы. Глава 5 включает в себя исследования по биологическим эффектам экзосом плазмы и экзосом крови в экспериментах *in vitro* с использованием псевдо-нормальных эпителиоцитов молочной железы и клеток карциномы молочной железы. Автором получены научные данные фундаментального характера, на основании которых сделаны выводы о значимости содержимого экзосом крови в метастатической диссеминации.

«Заключение» содержит обобщение полученных автором результатов, в том числе с литературными данными. По результатам работы автор сформулировал обоснованных 6 выводов, соответствующих цели и поставленным задачам исследования, и 3 рекомендации по применению полученных результатов и научных выводов. Автореферат изложен на 41 странице, хорошо иллюстрирован и отражает основное содержание диссертации.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

В представленной работе актуальные вопросы биохимии, молекулярной биологии и онкологии решены с помощью инновационных подходов, предполагающих выделение и анализ экзосом и циркулирующей ДНК, в том числе в составе нативных комплексов. В результате

автором получены уникальные научные данные, оставляющие все меньше «белых пятен» в понимании особенностей циркуляции ДНК и экзосом в крови в норме и при онкологическом заболевании и участии в канцерогенезе. В частности, с помощью сравнительной оценки фрагментации и метилирования внеклеточной ДНК в норме и при раке молочной железы выявлена перспективность использования ДНК, ассоциированной с поверхностью форменных элементов крови онкологических больных, для разработки «жидкостной биопсии». Показано, что при раке молочной железы изменяется состав как ДНК-связывающих белков, так и белков-«пассажиров» дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов, биоинформатическими подходами предсказаны биологические функции этих белков. Автором впервые показано изменение морфологии как экзосом плазмы, так и экзосом крови онкологических больных, а с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии – изменение белкового состава везикул. С помощью биоинформатического анализа автором показано, что экзосомы крови по сравнению с экзосомами плазмы у больных раком молочной железы обогащены белками, стимулирующими ЭМП, миграцию и инвазию, а у здоровых женщин - белками, ингибирующими эти процессы. Практическая ценность результатов диссертации также заключается в выявленном диагностическом потенциале белков дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом крови для выявления рака молочной железы методом «жидкостной биопсии». Кроме того, практическая значимость результатов исследования участия экзосом крови в процессе метастатической диссеминации становится понятней с учетом того факта, что в 2020 г Aethlon Medical Inc. были начаты клинические испытания технологии удаления везикул в комбинации с иммунотерапией для пациентов с опухолями головы и шеи (ClinicalTrial.gov; NCT04453046).

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключения диссертации

Использованные в диссертационной работе методы и подходы, количество вовлеченных в исследование женщин, а также полученные результаты свидетельствуют о том, что выносимые на защиту научные положения, выводы и заключение полностью обоснованы и достоверны. Диссертация по своей актуальности, новизне, научной и практической значимости результатов представляет законченное исследование, выполненное на современном методическом и теоретическом уровнях.

Полученные в работе результаты неоднократно доложены автором на международных и российских научных конференциях. По теме диссертации опубликована 31 статья в Российских и зарубежных научных журналах (часть из них входит в Q1), входящих в перечень ВАК. При

непосредственном участии автора диссертации получено 3 патента РФ и 1 свидетельство о регистрации.

Из замечаний к работе можно отметить отсутствие расшифровок некоторых сокращений и стилистические погрешности. Например, название метода «трековый анализ» для анализа размера и концентрации везикул правильнее было бы заменить на более устоявшийся термин «анализ траекторий движения наночастиц» (от английского Nanoparticals tracking analysis) и др. Также имеются отдельные несогласованности цифр либо неудачные формулировки, затрудняющие понимание. Например, на странице 144 при описании результатов анализа белков в составе НПК методом MALDI-TOF масс-спектрометрии вначале указано, что результаты анализа «...позволили с высокой достоверностью ($p < 0,05$) идентифицировать 177 и 169 белков в НПК крови условно ЗЖ ($n = 15$) и больных люминальным РМЖ ($n = 20$), соответственно». Далее в том же разделе написано: «Сравнение идентифицированных 308 белков в составе НПК с белками экзосом, аннотированных в БД EchoCarta выявило совпадение четырех белков». В результате не очень понятно, сколько белков в составе НПК было идентифицировано. Также не для всех исследований просто найти информацию о количестве образцов в выборках, было бы удобнее, если бы она была приведена в таблицах с результатами.

При прочтении диссертационной работы возникли следующие вопросы для дискуссии. Существенная часть работы, относящаяся к анализу как белкового состава НПК крови, так и экзосом, выполнена с помощью анализа протеома методом масс-спектрометрии с последующим масштабным биоинформационным анализом. Оба раздела свидетельствуют о высоком техническом уровне работы, однако представляется крайне важным валидировать полученные данные независимыми методами исследования (иммуноблоттинг или аналогичные). Понятно, что верифицировать весь массив данных не представляется возможным, однако это стоит сделать хотя бы для отдельных белков, прежде всего потенциальных маркеров РМЖ.

Также хочется отметить крайне интересные данные о повышении количества и изменения морфологии везикул в плазме крови больных. Данный вопрос активно обсуждается в международном научном сообществе, и однозначного ответа на него до сих пор нет. В связи с тем, что этот показатель потенциально может быть независимым диагностическим маркером, представляется важным продолжить данное исследование с использованием дополнительных методов анализа.

Все указанные вопросы носят рекомендательный характер и не снижают ценности 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 законченным, самостоятельно выполненным научным исследованием, в которой содержится решение ряда проблем, имеющих фундаментальное и практическое значение для молекулярной биологии и медицины. Диссертация 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 и 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, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Чевкина Елена Максимовна



доктор биологических наук, специальность 14.01.12 – онкология,

Зав. лабораторией регуляции клеточных и вирусных онкогенов

Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес организации: 115522, г. Москва, Каширское шоссе 23, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, тел.: +7 (499) 324-14-19, e-mail: info@ronc.ru

Подпись д.б.н. Чевкиной Е. М. заверяю

ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

к.м.н, Кубасова И.Ю.



« 05 » 12 2023 г.