

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Малек Анастасии Валерьевны на диссертационное исследование Тамкович Светланы Николаевны «Дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и экзосомы при раке молочной железы: диагностический потенциал и биологическая роль», представленное на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (биологические науки) и 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы диссертационной работы

В последние десятилетия отмечается рост числа злокачественных новообразований, обусловленный увеличением продолжительности жизни, изменениями образа жизни и воздействием неблагоприятных факторов среды. Злокачественные опухоли занимают второе место в структуре смертности населения. Среди женских опухолей рак молочной железы (РМЖ) лидирует как в России, так и за рубежом.

Диагностика РМЖ базируется на комплексном применении методов инструментальной визуализации и биопсии. Выбор тактики лечения определяется молекулярными подтипами РМЖ, выявляемыми иммуногистохимическим анализом. Однако этот подход не всегда эффективен из-за различий в патогенезе, ответе на терапию и потенциале метастазирования. В связи с этим, актуальной задачей онкологии является ранняя диагностика и повышение эффективности терапии РМЖ. Перспективным направлением служит «жидкостная биопсия» - анализ секрета опухоли в биологических жидкостях. В настоящее время большинство исследований в этой области сосредоточены на внеклеточных нуклеиновых кислотах, белках и биополимерах в составе внеклеточных везикул (ВВ).

Известно, что во внеклеточной опухолевой ДНК (внДНК) выявляют изменения, характерные для ДНК раковой клетки (мутации, микросателлитную нестабильность, амплификации и делеции, эпигенетические изменения), однако доля такой ДНК в крови не превышает 1 % от общего содержания внДНК. Повышение эффективности диагностики требует информации о механизмах циркуляции и выведения внДНК, её структуры и упаковки в дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы (ДНПК). Однако не смотря на интенсивные исследования в этой области, данные о составе ДНПК и их биологической роли крайне скудны. Кроме того, до сих пор отсутствуют подходы к обогащению внДНК, что затрудняет разработку диагностических панелей, в том числе на РМЖ,

Среди ВВ наибольший интерес вызывают экзосомы – ВВ эндосомального происхождения. Показано, что при злокачественных новообразованиях увеличивается их концентрация и изменяется состав. Опухолевые экзосомы способны стимулировать эпителиально-мезенхимальный переход, ангиогенез, пролиферацию и миграцию клеток путем переноса биологически активных молекул к клеткам-реципиентам. Однако до сих пор для разработки «жидкостной биопсии» на основе биополимеров экзосом наблюдается дефицит комплексных сведений о протеомном портрете этого типа ВВ.

Восполнение этих пробелов позволит преодолеть разрыв между фундаментальными знаниями о ДНПК и ВВ и практической потребностью в эффективных диагностических и прогностических решениях для РМЖ.

Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна представленной диссертационной работы не вызывает сомнений. В работе проведены уникальные исследования, направленные на выяснение источников появления внДНК в крови, определение размера и концов этой ДНК в плазме и ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови. С.Н. Тамкович впервые идентифицировала белки ДНПК и

с помощью биоинформатических подходов предсказала их биологическую роль в патогенезе РМЖ. Более того, автор оценила эффективность выявления aberrантного метилирования в составе внДНК и показала, что злокачественное новообразование более эффективно выявляется при анализе эпигенетических маркеров в составе ДНК, ассоциированной с клетками крови, что является прорывом в разработке подходов к «жидкостной биопсии».

В работе Светланы Николаевны Тамкович также впервые описано изменение морфологии экзосом плазмы и экзосом крови при РМЖ, выявлено увеличение концентрации экзосом крови при злокачественном новообразовании. В результате идентификации и сравнительного протеомного анализа экзосом показано, что ВВ крови обогащены белками, потенциально приводящими к опухолевой диссеминации. Несомненным достоинством работы является подтверждение в экспериментах *in vitro* на культурах первичных и трансформированных клеток предсказанных эффектов экзосом.

Сочетание фундаментальной и прикладной значимости делает диссертационную работу весьма актуальной.

Значимость для теории и практики полученных автором результатов

Результаты диссертационной работы С.Н. Тамкович продемонстрировали особенности молекулярно-биологических характеристик циркулирующих в крови ДНПК и экзосом при РМЖ и их биологическую роль в диссеминации опухоли.

В результате проведенного исследования впервые показано, что при злокачественном заболевании возрастает доля секретированных ДНПК и снижается доля ДНПК апоптотического и некротического происхождения. Показано, что ассоциированная с форменными элементами ДНК является более высокомолекулярной и имеет повышенный индекс метилирования по сравнению с ДНК плазмы, что крайне важно для повышения эффективности

выявления злокачественных заболеваний методом жидкостной биопсии. Кроме того, уникальные для РМЖ белки в составе ДНПК могут быть использованы как для обогащения опухолевой ДНК, так и как самостоятельные маркеры, позволяя с высокой эффективностью дискриминировать условно-здоровых женщин и онкологических больных.

Увеличение в составе экзосом крови больных РМЖ доли транспортных и каталитических белков свидетельствует об значимой роли этого типа ВВ в патогенезе РМЖ. Предсказанные на основании белкового состава экзосом биологические эффекты экзосом подтверждены на псевдо-нормальных и трансформированных эпителиоцитах молочной железы, а также первичных эндотелиоцитах человека. С использованием протеомного анализа экзосом крови предложен способ выявления РМЖ с чувствительностью 71% и специфичностью 100%.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений диссертации

В соответствии с целью исследования – Провести комплексное изучение молекулярно-биологических особенностей дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом крови, установить их роль в ключевых звеньях патогенеза опухолевого процесса и определить диагностическую ценность у больных раком молочной железы, Тамкович С.Н. сформулированы и обоснованы задачи исследования. Их решению во многом способствовал широкий спектр примененных автором молекулярно-биологических и биохимических методов, полностью соответствующих задачам, а также детальный анализ полученных данных и корректные способы статистической обработки. Как следствие, научные положения и выводы корректны и соответствуют полученным результатам.

По теме диссертационной работы опубликовано 100 работ, из них 34 статья в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК и 3 патента РФ и 2 свидетельства о регистрации баз данных, результаты доложены

и обсуждены на многочисленных международных и российских научных конференциях.

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

Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы

Полученные в диссертационной работе результаты уже используются в процессе обучения студентов на кафедре Клинической биохимии Института медицины и медицинских технологий Новосибирского государственного университета в курсе «Биохимия патологических состояний».

Кроме того, результаты диссертационной работы Тамкович С.Н. могут быть интересны широкому кругу специалистов: онкологов, биохимиков, молекулярных биологов.

Оценки содержания работы, ее завершенность и оформление диссертации

Диссертационная работа Тамкович С.Н. построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, применения результатов и научных выводов, список условных сокращений, списка литературы и приложений. Работа изложена на 283 страницах, содержит 51 рисунок, 30 таблиц и 19 приложений. Список использованной литературы включает 519 источников.

Во введении, с учетом современных данных, автор убедительно обосновывает актуальность выбранного направления диссертационного исследования, приводит информацию о степени разработанности темы, глубине решаемой ее научной проблемы, формулирует цели и задачи своей работы, а также положения, выносимые на защиту, подчеркивает научную новизну выполненной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Глава 1, содержащая обзор литературы, поделена на логично связанные пять частей с заключением. Первая часть посвящена клинико-эпидемиологическим особенностям РМЖ, вторая часть – проблемам диагностики раннего РМЖ. В третьей части автор активно обсуждает достоинства и недостатки, а также перспективы использования «жидкостной биопсии» для диагностики и оценки эффективности лечения РМЖ. Четвертая часть обзора литературы посвящена появлению, формам циркуляции ДНПК крови и их роли в канцерогенезе, пятая – происхождению и составу экзосом, современных представлениях об их функциях и роли в развитии злокачественных новообразований.

В главе «Материалы и методы исследования» представлены данные клинико-морфологических исследований 194 пациенток с первичным РМЖ, контрольную группу составили 190 женщин. В разделе достаточно полно описан чрезвычайно широкий спектр современных методов молекулярной биологии, биохимии и биоинформатики, что позволило автору выполнить эксперименты на высоком уровне и решить поставленные задачи для достижения цели исследования. Методы статистической обработки данных выполнены корректно.

Результаты собственных исследований и их обсуждение содержатся в главах 3–5. В главе 3 представлены новые данные по размеру и строению концов ассоциированной с форменными элементами крови ДНК у больных РМЖ и контрольных лиц, что позволяет автору сделать выводы об источниках появления ДНК в циркуляции. Повышенный индекс метилирования ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови больных РМЖ свидетельствует, что клетки крови являются более перспективным источником опухолевой ДНК по сравнению с плазмой. В результате идентификации белков, формирующих комплексы с ДНК, с последующим биоинформатическим анализом было показано, что в ДНПК присутствуют как ДНК-связывающие белки, так и белки-«пассажиры», причем первые можно

использовать для обогащения опухолевой ДНК, а вторые – как самостоятельные протеомные маркеры РМЖ.

В главе 4 автор сравнивает концентрацию, морфологию и состав белков экзосомы плазмы и экзосомы крови больных РМЖ и контрольных лиц. При злокачественном заболевании в работе было выявлено увеличение концентрации и изменение морфологии обеих фракций внеклеточных везикул.

Увеличение уровней тетраспанин-ассоциированных и тетраспанин-неассоциированных протеаз в короне и внутреннем содержимом экзосом плазмы и экзосом крови больных РМЖ свидетельствует о различных механизмах сортировки биополимеров в везикулы при раке и значимую роль экзосом крови в развитии заболевания. На следующем этапе автором с помощью масс-спектрометрии был идентифицирован протеом экзосом и с помощью биоинформатического анализа предсказаны функции белков в норме и при РМЖ. В частности, было установлено, что при РМЖ экзосомы крови обогащены белками, вовлеченными в опухолевую диссеминацию – стимулирующими эпителиально-мезенхимальный переход, клеточную пролиферацию, инвазию и подвижность, при этом протеом экзосом крови в норме обогащен белками, ингибирующими эти процессы. Среди 112 уникальных для РМЖ белков экзосом автор выделил пять, комбинация которых позволяет с высокой эффективностью выявлять первичных больных РМЖ.

Глава 5 посвящена обсуждению результатов, полученных в экспериментах *in vitro* с использованием как первичных эндотелиоцитов, так и псевдо-нормальных и трансформированных эпителиоцитов молочной железы. С.Н. Тамкович показала, что экзосомы плазмы и экзосомы крови онкологических больных обладают сходными, но не идентичными эффектами, направленными на стимуляцию канцерогенеза, а экзосомы крови здоровых лиц ингибируют ангиогенез, при этом стимулируют пролиферацию незлокачественных и увеличивают скорость миграции раковых клеток. Кроме

того, автором приведены убедительные доказательства, что ДНК в короне экзосом является малой долей циркулирующей ДНК в крови и не обладает диагностической значимостью.

В главе «Заключение» представлено полное резюмированные полученных результатов, а также проведено широкое обсуждение их с позиций современных научных представлений о предмете исследований.

Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного экспериментального исследования. Материал, представленный в диссертации, получен и проанализирован автором исследования лично либо при его непосредственном участии. Таким образом, обоснованность десяти выводов не вызывает сомнений.

Практические рекомендации основаны на собственных результатах исследования и предложены с целью совершенствования подходов жидкостной биопсии.

Автореферат полностью соответствует диссертации, отражает содержание и дает представление об основных положениях работы. Принципиальных замечаний по рецензируемой диссертационной работе нет.

Заключение

Диссертационная работа Тамкович Светланы Николаевны «Дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и экзосомы при раке молочной железы: диагностический потенциал и биологическая роль», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (биологические науки); 1.5.4. Биохимия, является законченной, самостоятельной научно-исследовательской работой, в которой решена крупная научная проблема – выявлены новые потенциальные молекулярные маркеры для диагностики РМЖ на основании анализа циркулирующих ДНПК и экзосом.

По своей актуальности, научной новизне, практической значимости, набору методов, объёму выполненных исследований, достоверности

полученных результатов, количеству опубликованных работ по теме исследования, диссертационная работа С.Н. Тамкович полностью соответствует современным требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям в соответствии с п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 №842 (в ред. от 16 октября 2024 г), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (биологические науки) и 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

Заведующий научной лабораторией субклеточных технологий

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»

Минздрава России

доктор медицинских наук (14.01.12 – Онкология)

А.В. Малек

04.05.2026

Подпись А.В. Малек заверяю

Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»

Минздрава России

доктор медицинских наук



А.О. Иванцов

Контактная информация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России); 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68; +7(812)43-99-555; center.petrova@niioncologii.ru