

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Красильникова Михаила Александровича на диссертационную работу Тамкович Светланы Николаевны «Дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и экзосомы при раке молочной железы: диагностический потенциал и биологическая роль», представленную 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

Рак молочной железы (РМЖ) представляет собой наиболее распространённое онкологическое заболевание среди женщин в развитых странах мира. Несмотря на то, что большинство форм данного злокачественного заболевания поддаётся диагностике посредством иммуногистологического анализа биопсийного материала, обнаружение опухолевого очага на первой стадии бывает затруднено. Выявление РМЖ на распространенной стадии приводит к инвалидизации женщин трудоспособного возраста и ухудшению прогноза течения заболевания. В связи с этим, в последние двадцать лет научные исследования в области молекулярной онкологии были сконцентрированы на выявлении молекулярных маркеров, позволяющих надёжно диагностировать онкологический процесс на ранних стадиях его развития, — что критически важно для повышения выживаемости пациентов. К перспективным источникам таких онкомаркеров в биологических жидкостях относят циркулирующие опухолевые клетки, циркулирующие дезокси- и рибонуклеиновые кислоты, внеклеточные везикулы различного происхождения и нуклеопротеиновые комплексы. В стремлении решить вышеперечисленные проблемы, на сегодняшний день большинство публикаций посвящено разработке сигнатур на основе циркулирующих в биологических жидкостях ДНК и микроРНК для диагностики

злокачественных заболеваний. Тем не менее, ряд фундаментальных вопросов остаётся нерешённым, в том числе механизмы поступления в кровь циркулирующей ДНК, распределение этой ДНК и экзосом между плазмой и форменными элементами, особенности состава ДНК-белковых комплексов, биологические функции дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом.

Диссертационное исследование С. Н. Тамкович, посвященное комплексному анализу циркулирующих в крови дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом при РМЖ, отвечает на указанные выше вопросы, что определяет её актуальность.

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

Диссертационное исследование С.Н. Тамкович выполнено на стыке биохимии, молекулярной биологии и клинической и молекулярной онкологии и вносит существенный вклад в понимание механизмов циркуляции ДНК и экзосом при злокачественных новообразованиях. Актуальность исследования обуславливает научную новизну полученных результатов диссертационной работы С.Н. Тамкович. В частности, выявлены особенности фрагментации и строения концов циркулирующей в крови ДНК при РМЖ. Обнаруженный в работе повышенный индекс метилирования ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови онкологических больных показал, что для разработки метода «жидкостной биопсии» данного заболевания целесообразно использовать ДНК, ассоциированную с форменными элементами крови. Кроме того, в работе впервые идентифицирован протеом и установлены молекулярные функции белков нативных ДНК-белковых комплексов. Обнаружено, что наибольшей диагностической значимостью в составе таких комплексов обладают не связывающие ДНК белки.

Впервые установлено, что как в норме, так и при патологии доля ДНК в короне экзосом крайне мала, причем при РМЖ увеличивается концентрация и изменяется морфология внеклеточных везикул крови. Впервые установлены повышенные уровни ADAM-10 и 20S протеасомы в составе экзосом крови больных РМЖ, что указывает на вовлечение в опухолевую генерализацию как протеаз короны, так и протеаз внутреннего содержимого внеклеточных везикул. В результате идентификации белков впервые установлено, что при РМЖ протеом экзосом крови обогащён белками, стимулирующими ЭМП, клеточную пролиферацию и инвазию, в то время как экзосомы крови здоровых женщин содержат белки, ингибирующие эти процессы.

Значимость полученных результатов для теории и практики

Представленное диссертационное исследование имеет как теоретическую, так и практическую направленность. В частности, результаты работы значительно расширяют знания об особенностях циркуляции в крови ДНК-белковых комплексов и экзосом (распределении и составе, роли в стимулировании роста и распространении опухоли). В результате комплексного анализа размера, природы концов циркулирующей ДНК и белков, формирующих ДНК-белковые комплексы, показано, что как в норме, так и при патологии помимо процессов клеточной гибели, активная секреция также вносит вклад в появление внДНК в кровотоке.

Сравнительный анализ морфологии и белкового состава экзосом в плазме и экзосом крови больных РМЖ и здоровых женщин расширяет фундаментальные знания о значимой роли экзосом в канцерогенезе.

Данные о размере и распределении циркулирующей ДНК между плазмой и форменными элементами крови, индексе ее метилирования, а также уникальных белках в составе ДНК-белковых комплексов представляют значительную ценность для разработки новых методов направленного обогащения опухолевых нуклеиновых кислот крови.

Кроме того, практическая значимость работы заключается в идентификации новых белковых маркеров РМЖ в составе дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом крови. Предложенные С.Н. Тамкович подходы для повышения эффективности диагностики РМЖ методом «жидкостной биопсии» требуют клинической валидации на расширенной выборке пациентов.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключений, сформулированных в диссертации

Работа, проведенная диссертантом, выполнена на высоком методологическом уровне и на большом клиническом материале и представляет собой законченное исследование. Достоверность результатов представленного исследования достигнута за счет адекватного объема набранного клинического материала (194 первичных больных РМЖ, T1-2N0-1M0 и 190 клинически здоровых женщин) и выбранных современных методов исследования. Выводы корректны и соответствуют полученным результатам.

Основные положения диссертационной работы представлены в публикациях автора, прошли обсуждения на научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 100 печатных работ, из них 34 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и журналах, индексируемых в международных реферативных базах данных SCOPUS и Web of Science. Получено 3 патента РФ на изобретение и 2 свидетельства о государственной регистрации базы данных.

Таким образом, научные положения и выводы, отраженные в диссертации С.Н. Тамкович, основаны на достаточном клиническом материале с применением высокочувствительных методов исследования, а полученные результаты обработаны с применением современных методов биоинформатики и статистики и детально проанализированы.

Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы

Полученные в диссертации данные в настоящее время используются в образовательном процессе для студентов, обучающихся по специальности «лечебное дело» в Институте медицины и медицинских технологий Новосибирского государственного университета в курсе «Биохимия патологических состояний».

Оценки содержания работы, ее завершенность и оформление диссертации

Диссертационная работа С. Н. Тамкович выполнена в соответствии с традиционными академическими требованиями и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждения, заключение, выводы, применение результатов и научных выводов, список условных сокращений, список литературы, включающего 519 источников, и 19 приложений. Работа С.Н. Тамкович изложена на 283 страницах печатного текста и иллюстрирована 51 рисунком и 30 таблицами.

Введение содержит обоснование актуальности и глубину решаемой научной проблемы, содержит информацию о степени разработанности темы. Автор конкретно формирует цель и задачи исследования. Четко формулируется научная новизна, теоретическая и практической значимость результатов, а также положения, выносимые на защиту.

Глава «Обзор литературы» структурирована и представлена в пяти частях с заключением: клинико-эпидемиологические особенности РМЖ, диагностика раннего РМЖ, перспективы использования «жидкостной биопсии» для диагностики и оценки эффективности лечения РМЖ, ДНПК крови и их роль в канцерогенезе и экзосомы крови и их роль в канцерогенезе.

Глава «Материалы и методы исследования» описывает комплекс современных биохимических, молекулярно-биологических и биоинформатических методов, применённых в исследовании (иммунизация животных, синтез аффинных сорбентов, трековый анализ, проточная

цитофлуорометрия, ПЦР в режиме реального времени и др.). В работе использованы образцы крови 190 здоровых женщин и 194 пациенток с первичным РМЖ; детально описаны критерии включения/исключения и характеристики клинического материала.

Главы 3–5 содержат результаты собственных исследований и их обсуждение. В частности, глава 3 посвящена сравнительному анализу размера ДНК в плазме и ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови, в норме и при РМЖ, а также изучению метилирования циркулирующей в крови ДНК на примере промоторной части гена онкосупрессора *RARβ2*. Автором впервые методом масс-спектрометрии идентифицированы белки в составе нативных дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и с помощью биоинформатических подходов предсказаны их биологические функции. Выявленные уникальные белки в составе циркулирующих в крови ДНК автор предлагает использовать для разработки диагностических панелей РМЖ.

Глава 4 посвящена сравнительному анализу состава экзосом крови онкологических больных и контрольных лиц. В работе впервые выявлены морфологические различия экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с поверхностью форменных элементов, а также увеличение концентрации обеих фракций экзосом при РМЖ. Выявленные повышенные уровни 20S протеасом и ADAM-10 в составе экзосом у больных РМЖ свидетельствует, что в опухолевую диссеминацию вовлечены как протеазы короны экзосом, так и внутривезикулярного содержимого. Данная глава содержит также результаты идентификации протеома экзосом крови и данные биоинформатического анализа по предсказанию их биологических функций в норме и при патологии. Сравнительный анализ показал, что экзосомы крови онкологических больных в большей степени, чем экзосомы плазмы, обогащены белками, стимулирующими эпителиально-мезенхимальный переход, клеточную пролиферацию, инвазию и подвижность, а у клинически

здоровых женщин протеом экзосом обогащен белками, ингибирующими эти процессы. В работе в составе экзосом крови выявлены уникальные для РМЖ опухоль-ассоциированные белки с высоким диагностическим потенциалом.

Глава 5 посвящена изучению влияния молекулярного груза экзосом крови на диссеминацию РМЖ. Показано, что основная часть циркулирующей в крови ДНК не связана с экзосомами. В экспериментах *in vitro* показано, что экзосомы крови больных РМЖ стимулируют формирование капилляро-подобных структур и пролиферацию незлокачественных эпителиоцитов молочной железы, а также статистически значимо увеличивают долю подвижных клеток линии MCF10A и скорость миграции клеток карциномы SKBR-3. Экзосомы плазмы онкологических больных обладают менее выраженными биологическими эффектами на клетки по сравнению с экзосомами крови. Впервые установлено, что экзосомы крови здоровых женщин обладают биологической активностью: ингибируют формирование капилляро-подобных структур, при этом стимулируют пролиферацию незлокачественных эпителиоцитов молочной железы и увеличивают скорость миграции клеток SKBR-3.

В целом, работа выполнена на хорошем уровне, с привлечением современных методик, и принципиальных замечаний к работе нет. Из комментариев хотелось бы отметить, что к оценке биологических эффектов экзосом *in vitro* следует подходить с осторожностью, поскольку корректно смоделировать *in vitro* условия, при которых реализуются эффекты экзосом в организме, достаточно сложно. Подтверждением этому могут служить полученные автором данные сравнительного анализа белков экзосом онкологических больных и здоровых доноров: анализ протеома экзосом онкобольных показал увеличенное содержание белков, стимулирующих ЭМП, инвазию и пролиферацию, в то время как у здоровых доноров протеом экзосом обогащен белками, ингибирующими эти процессы. Но в условиях *in vitro* оба варианта экзосом обладают сходной активностью, стимулируя и пролиферацию, и миграцию клеток – скорее всего, в результате

особенностей культивирования *in vitro* (это и микроокружение, и эффективная концентрация экзосом и проч.).

Однако, в целом анализ протеомного профиля экзосом крови является безусловной заслугой автора, поскольку изменения белкового состава экзосом являются одной из универсальных характеристик опухолевого роста. В отличие от жидкостной биопсии, эффективной лишь при наличии известных мутаций ДНК (что работает далеко не для всех опухолей), изменения протеомного профиля экзосом (большая часть из них неопухолевого происхождения) отражает системное действие опухоли на организм и является универсальным следствием, характеристикой опухолевого процесса и может служить эффективным критерием развития опухоли.

Заключение выполнено в обычном стиле и содержит широкое обсуждение полученных результатов с позиций современных научных представлений о предмете исследований. Десять выводов, сделанных диссертантом, обоснованы, отражают основные результаты исследования и полностью соответствуют поставленным задачам. Автором диссертации предложено ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ для повышения эффективности жидкостной биопсии.

Автореферат полностью соответствует диссертации, адекватно отражает ее содержание и дает представление об основных положениях работы. Принципиальных замечаний по рецензируемой диссертации нет, и приведенные выше комментарии отнюдь не снижают ценности работы.

Заклучение

Таким образом, диссертационная работа Тамкович Светланы Николаевны на тему ««Дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и экзосомы при раке молочной железы: диагностический потенциал и биологическая роль», является самостоятельной, законченной научно-исследовательской работой, в которой содержится решение актуальной

проблемы молекулярной онкологии – определение роли циркулирующих ДНК-белковых комплексов и экзосом в опухолевой прогрессии РМЖ, показана возможность использования полученных данных для разработки жидкостной биопсии. Автором соблюдены все требования, предъявляемые к диссертационным работам на соискание ученой степени доктора наук в части полноты опубликованных результатов исследования, корректного соблюдения заимствований, определения личного участия в выполнении исследования, требований к оформлению текста работы. Диссертация по своей актуальности, новизне, объему, научной и практической значимости результатов полностью соответствует современным требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям в соответствии с пп.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г (в ред. от 16 октября 2024 г), а ее автор, Тамкович Светлана Николаевна, 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 отделом экспериментальной биологии
опухолей НИИ экспериментальной онкологии и
канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
доктор биологических наук, профессор

М.А. Красильников
12.05.2026

Подпись М.А. Красильникова заверяю.

Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России,
кандидат медицинских наук



И.Ю. Кубасова

Контактная информация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России); г. Москва, Каширское ш., д. 24; +7 (499) 444-24-24; info@ronc.ru