

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

**Нарыжного Станислава Николаевича**

доктора биологических наук на диссертационную работу

«Дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и экзосомы при раке молочной железы: диагностический потенциал и биологическая роль», представленную

Тамкович Светланой Николаевной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (биологические науки) и 1.5.4. Биохимия

### **Актуальность темы диссертационного исследования**

Рак молочной железы (РМЖ) является самым распространенным женским онкологическим заболеванием. Кроме того, ввиду сложности ранней диагностики он еще и лидирует в этой области по уровню инвалидизации и смертности так как эффективность лечения больных РМЖ на продвинутых стадиях заболевания остается невысока. Поэтому усилия ученых и медиков сосредоточены на поиске молекулярных маркеров, позволяющих уверенно диагностировать наличие опухоли на ранних стадиях ее развития. Диссертационное исследование С.Н.Тамкович посвящено изучению секретома опухоли и его участию в патогенезе РМЖ. Недостаток знаний о механизмах появления циркулирующей внеклеточной ДНК (внДНК) в кровотоке, состав белков, защищающих ее от нуклеаз крови, распределение между фракциями крови, а также биологическая роль затрудняют разработку подходов к диагностике и терапии онкологических заболеваний. Аналогичная ситуация наблюдается и для внеклеточных везикул (ВнВ), в том числе экзосом. В частности, в литературе скудно представлена информация о протеомном портрете экзосом и распределении этих ВнВ между фракциями крови в норме и при злокачественных заболеваниях, а также участии экзосом крови в опухолевой диссеминации.

Диссертационная работа С.Н.Тамкович выполнена на стыке дисциплин молекулярной онкологии, биохимии и молекулярной биологии, что делает ее чрезвычайно важной и исключительно современной. В своей работе С.Н. Тамкович ставит целью провести комплексное изучение молекулярно-биологических особенностей дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов (ДНПК) и экзосом крови, установить их роль в ключевых звеньях патогенеза опухолевого процесса и определить диагностическую ценность у больных РМЖ, что и определяет её актуальность.

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

В диссертации С.Н.Тамкович впервые выполнен комплексный анализ циркулирующих ДНПК и экзосом в крови первичных больных РМЖ и контрольных лиц с целью расширения уже имеющихся знаний о патогенезе РМЖ и выявления новых диагностических маркеров для «жидкостной биопсии».

С.Н.Тамкович впервые идентифицировала белки в составе циркулирующих в крови ДНПК и с помощью биоинформатического анализа предсказала их биологическую роль в диссеминации РМЖ. Кроме того, она показала, что при наличии опухоли, циркулирующие ДНПК имеют фундаментальные различия в молекулярной организации по сравнению с циркулирующими ДНПК здоровых доноров. Данные по размеру и индексу метилирования ДНК, ассоциированной с форменными элементами, могут быть использованы для повышения выявления опухолевой ДНК в крови онкологических больных, а опухоль-ассоциированные ДНК-связывающие белки ДНПК – для обогащения целевой ДНК.

Следует отметить, что новизной также обладают сведения об экзосомах, ассоциированных с форменными элементами. В частности, Тамкович С.Н. впервые показала изменение морфологии экзосом, повышение их концентрации и уровня протеаз (ADAM-10, 20S протеасом) в их составе при



РМЖ. Новыми также являются сведения о протеомном составе экзосом крови, что позволило автору выявить белки, значимые в патогенезе опухолевого процесса путем стимуляции эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), пролиферации и инвазии. Предсказанная биоинформатическим анализом биологическая роль экзосом была убедительно подтверждена в экспериментах *in vitro*. В частности, было показано, что экзосомы крови больных РМЖ и здоровых женщин стимулируют пролиферацию неопухолевых эпителиоцитов молочной железы и скорость миграции клеток карциномы молочной железы, при этом имеют противоположные эффекты на формирование капилляро-подобных структур.

Впервые установлена диагностическая ценность белков в составе ДНПК и экзосом для выявления РМЖ, что позволит своевременно выявлять опухоль, а это, в свою очередь, снизит инвалидизацию и смертность среди женщин.

### **Значимость для теории и практики полученных автором результатов**

Безусловна теоретическая и практическая значимость работы, которая раскрывает новые патогенетические звенья развития РМЖ, в частности, изменения состава циркулирующих в крови ДНПК и экзосом, что в свою очередь приводит к стимуляции ЭМП, ангиогенеза, пролиферации, миграции клеток и ускользанию опухоли от иммунного надзора.

Важнейшим для практики является выявление новых перспективных диагностических маркеров РМЖ, позволяющих с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять первичных больных на I-II стадиях заболевания.

Полученные результаты важны как для фундаментальной, так и для практической онкологии. Фундаментальную значимость составляют выявленные Тамкович С.Н. данные о строении и составе циркулирующих ДНПК и экзосом в крови больных РМЖ и контрольных лиц, влиянии экзосом опухолевого происхождения на первичные, нетрансформированные и злокачественные клетки. Практическая значимость работы определяется возможностью использования уникальных для РМЖ белков в составе

циркулирующих в крови ДНПК и экзосом, а также внеклеточной ДНК, ассоциированной с клетками крои, для выявления злокачественного заболевания.

Учитывая результаты диссертации С.Н. Тамкович, особенно следует указать на созданный потенциал продолжения научных исследований в сфере разработки искусственных экзосом для таргетной терапии.

### **Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений диссертации**

Диссертационная работа С.Н. Тамкович выполнена на современном высоком методологическом уровне и достаточном объеме выборки обследованных женщин.

В работе использованы современные, адекватные поставленным задачам, биохимические (масс-спектрометрия, синтез аффинных сорбентов и др.) и молекулярно-биологические методы (проточная цитофлуорометрия, количественная ПЦР и др.), что способствовало решению поставленных автором задач.

Обоснованность и достоверность полученных результатов определяются дизайном исследования, а также корректным использованием биоинформатических и статистических методов анализа.

Положения и выводы диссертационной работы корректны и соответствуют полученным результатам. Заключение аргументировано собственными результатами, литературными данными по теме диссертационной работы.

Результаты, представленные в диссертационной работе С.Н. Тамкович, апробированы на многих международных и российских научных конференциях.

По теме диссертации опубликовано 100 статей, из них 34 в ведущих рецензируемых журналах, оформлено 3 патента РФ на изобретение и 2 свидетельства о государственной регистрации базы данных.



Автореферат диссертации написан ясно и четко, иллюстрирует все полученные результаты и сделанные на их основе выводы, полностью соответствует содержанию диссертации и дает представление об основных положениях работы.

### **Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы**

Результаты диссертационной работы С.Н.Тамкович уже используются в курсе «Биохимия патологических состояний», который читается в Институте медицины и медицинских технологий Новосибирского государственного университета для студентов 3 курса.

### **Оценки содержания работы, ее завершенность и оформление диссертации**

Диссертационная работа С.Н.Тамкович изложена на 283 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, собственных результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, применения результатов и научных выводов, списка условных сокращений, содержит список литературы и приложения. Рукопись включает 30 таблиц и 51 рисунок. Список литературы состоит из 519 источников.

Во введении автором представлена актуальность работы и степень разработанности темы, четко сформулирована цель комплексно изучить молекулярно-биологических особенности ДНК и экзосом крови, установить их роль в ключевых звеньях патогенеза опухолевого процесса и определить диагностическую ценность у больных раком молочной железы. Поставленные С.Н. Тамкович задачи, цели исследования и сформулированные положения диссертации отражают результаты собственных исследований и не вызывают возражений. Научная новизна работы не вызывает сомнений, что подтверждается многочисленными публикациями автора. Кроме того, результаты проведенного исследования и основные положения работы были доложены и обсуждены автором на 52 международных и российских конференциях.

В главе «Обзор литературы» С.Н.Тамкович подробно обсуждает клинико-эпидемиологические особенности РМЖ и сложности диагностики ранних стадий этого заболевания. Из этих разделов главы 1 логично вытекает раздел по перспективам «жидкостной биопсии» в диагностике и оценке эффективности лечения РМЖ, приводятся достоинства и недостатки такого подхода. Подробно и качественно написан раздел, посвященный феномену ДНПК крови и обсуждению их роли в канцерогенезе, а также раздел о современном состоянии исследований экзосом крови онкологических больных. В заключении Главы 1 автор обосновывает целесообразность проведенного исследования.

Глава «Материалы и методы исследования» отражает вид, дизайн и особенности каждого этапа работы. Автор рукописи подробно указывает критерии включения и исключения, а также характеристики клинического материала. Все методы и подходы, использованные в диссертационном исследовании, подробно прописаны, что предоставляет возможность воспроизведения экспериментов по приведенным протоколам.

В третьей главе диссертационной работы на основании сравнительного анализа строения концов и размера ДНК в плазме и ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови здоровых женщин и больных РМЖ, автор делает выводы о механизмах появления циркулирующей ДНК. Путем комбинации MALDI-TOF масс-спектрометрии и биоинформатического анализа С.Н.Тамкович впервые удалось описать состав нативных ДНПК. Несмотря на то, что о внеклеточной ДНК известно с 50-х годов, информация о белках, обеспечивающих сохранность нуклеиновой кислоты в крови, а также, возможно, адресность ее доставки к клеткам-реципиентам, до сих пор отсутствовала. Более того, в диссертационной работе впервые была предпринята попытка описания архитектуры ДНПК и оказалось, что наибольшее разнообразие опухоль-ассоциированных белков представлено среди белков, которые непосредственно ДНК не связывают («белки-пассажиры»). С помощью оценки длины ДНК и индекса ее метилирования



автор убедительно доказывает, что ДНК, ассоциированная с форменными элементами крови, является более перспективным источником для поиска опухолевых маркеров, чем ДНК плазмы.

Глава 4 касается результатов сравнительного анализа концентрации и морфологии экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с поверхностью форменных элементов здоровых женщин и больных РМЖ. Для этого автором были использованы такие уникальные подходы, как анализ траектории частиц и криоэлектронная микроскопия. Было обнаружено, что при онкологическом заболевании увеличивается концентрация и изменяется морфология обеих фракций внеклеточных везикул. Увеличение уровня тетраспанин-ассоциированных (на примере ADAM-10) и тетраспанин-неассоциированных (на примере 20S протеасом) протеаз в составе экзосом крови больных РМЖ указывает на различные механизмы сортировки белков в везикулы при раке и значимую роль экзосом крови в развитии заболевания. На следующем этапе путем комбинации MALDI-TOF масс-спектрометрии и биоинформатического анализа автор проанализировал протеом экзосом крови и постарался предсказать его роль в патогенезе злокачественных заболеваний. Оказалось, что экзосомы крови больных РМЖ обогащены белками, стимулирующими опухолевую диссеминацию, а экзосомы крови контрольных лиц - белками, ингибирующими эпителиально-мезенхимальный переход, клеточную пролиферацию, инвазию и подвижность. Кроме того, было показано, что белки экзосом крови позволяют более эффективно дискриминировать больных РМЖ от контрольной группы, чем белки экзосом плазмы.

Глава 5 посвящена обсуждению результатов, полученных в экспериментах *in vitro*. Автор показал, что экзосомы плазмы и экзосом крови больных РМЖ обладают сходными, но не идентичными эффектами, направленными на стимуляцию канцерогенеза, а экзосомы крови здоровых женщин ингибируют формирование капилляроподобных структур, при этом стимулируют пролиферацию незлокачественных эпителиоцитов и увеличивают скорость миграции клеток карциномы молочной железы.

В «Заключении» представлено полное обобщение полученных в диссертационной работе результатов и их обсуждение с уже имеющимися литературными данными.

Выводы работы обоснованы и отражают собственные результаты исследования, соответствуют поставленным задачам. Автореферат полностью соответствует диссертации, отражает содержание диссертационной работы.

Принципиальных замечаний по рецензируемой диссертационной работе С.Н. Тамкович нет, однако имеются комментарии по оформлению, наличию опечаток (например, количество белков в базе Vesiclepedia) и стилистических погрешностей. На Рисунке 1 (Принцип «жидкостной биопсии» и перспективные опухолевые маркеры) отсутствуют белки плазмы, хотя далее в тексте о них речь идет. Есть также замечания по терминологии. Это применение слова «длина» в отношении белка, что корректно для полипептидной цепи, но не для белка, а также использование разных обозначений: SDS-ПААГ, SDS-диск-электрофорез, градиентный белковый электрофореза и диск-электрофорез и просто электрофорез для одного и того же метода. Есть также вопросы. 1) Почему белки окрашивали раствором коллоидного серебра на мембране, а не просто в геле? 2) Так как в работе не приведены данные по детектированным белкам экзосом и ДНПК у отдельных Здж и больных РМЖ, то необходимо прояснить как отбирали онкомаркеры и рассчитывали их чувствительность и специфичность.

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

### **Заключение**

Диссертационная работа Тамкович Светланы Николаевны на тему «Дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и экзосомы при раке молочной железы: диагностический потенциал и биологическая роль» является самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой решена научная проблема, имеющая важное значение для молекулярной онкологии и



биохимии – впервые установлены опухоль-ассоциированные белки в составе циркулирующих в крови ДНК-белковых комплексов и экзосом, вовлеченные в опухолевую прогрессию, и выявлены потенциальные онкомаркеры для диагностики РМЖ.

Диссертационная работа является законченным трудом, имеющим важное значение для молекулярной онкологии, и который по новизне, научной и практической ценности полученных результатов полностью соответствует пп.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» Постановления Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г (в ред. от 16 октября 2024 г), предъявляемым к докторским диссертациям, 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:

Руководитель группы протеомики

ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова  
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»  
доктор биологических наук

Нарыжный Станислав Николаевич

Подпись Нарыжного Станислава Николаевича заверяю

Ученый секретарь ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Воробьев Сергей Иванович



23 апреля 2026г

Контактная информация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; 188300, Ленинградская область, г. Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1; +7(81371) 4-60-47; dir@pnpi.nrcki.ru