

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Чевкиной Елены Максимовны на диссертационную работу Тутанова Олега Сергеевича “Протеомный анализ экзосом и нуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих в крови здоровых женщин и больных раком молочной железы”, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

### **Актуальность работы.**

Рак молочной железы занимает первое место по заболеваемости и смертности среди онкологических заболеваний у женщин в мире и в Российской Федерации, в частности. Поиск новых прогностических молекулярных маркеров для диагностики данного заболевания является актуальной задачей, востребованной современной медициной. Несмотря на неуклонно растущий интерес мирового научного сообщества к секретируемым экстраклеточным везикулам и активные попытки применения циркулирующих внеклеточных везикул и нуклеиновых кислот в качестве источников для жидкой биопсии, на сегодняшний день в мире отсутствуют тесты, основанные на биомаркерах в составе данных структур. Помимо практической значимости исследования циркулирующих экзосом и внеклеточной ДНК в контексте разработки новых подходов к диагностике, изучение их молекулярного состава (в том числе белкового компонента) имеет важное фундаментальное значение с точки зрения развития наших представлений о роли данных структур в межклеточной коммуникации, в том числе в процессах малигнизации и опухолевой диссеминации. Таким образом, исследование направлено на решение актуальных задач экспериментальной онкологии.

### **Научная новизна и практическая значимость полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации**

В работе Тутанова О.С. впервые предпринята попытка выделения и характеристики всех экзосом крови, а не только экзосом плазмы, что позволяет получить более полную картину и указывает на перспективы использования суммарной популяции экзосом крови в качестве источника диагностического материала, а также в контексте изучения роли данных везикул в процессах опухолевой диссеминации. Кроме того, в данной работе исследован протеомный состав циркулирующих в крови нуклеопротеиновых комплексов – данные структуры описаны в литературе очень скупо, и это первая работа, посвященная характеристике белков, участвующих в транспорте внеклеточной ДНК. Использование разработанных в данной работе методов в дальнейших научно-исследовательских работах

будет способствовать исследованию их роль в развитии онкологических заболеваний, предоставляя новые подходы для поиска белковых маркеров рака молочной железы.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Степень обоснованности научных положений и выводов базируется на обширном экспериментальном материале, полученном Тутановым О.С. и статистическом анализе полученных данных. Дизайн экспериментов отвечал поставленным задачам и позволил сформулировать выводы и обобщения, в том числе выявить в составе циркулирующих экзосом и нуклеопротеиновых комплексов крови больных раком молочной железы белки, участвующие в процессах регуляции апоптоза, иммунного ответа, пролиферации, клеточной адгезии и клеточного роста. Олег Сергеевич продемонстрировал хорошее владение современными теоретическими представлениями о структуре и функциях экзосом и внеклеточной ДНК в норме и при развитии злокачественных новообразований.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация оформлена в соответствии с требованиями “Положения о порядке присуждения ученых степеней”. Структура диссертации соответствует традиционной схеме. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, а также собственных результатов, полученных автором, их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 211 страницах машинописного текста, включает 36 рисунков, 11 таблиц и 9 приложений. Список цитированной литературы включает 468 источников.

Во “Введении” Олег Сергеевич приводит доказательства актуальности исследуемой проблемы, освещает основные проблемы, требующие решения, и обозначает основные цели и задачи своего исследования.

В разделе “Обзор литературы” Олег Сергеевич отражает современные представления о составе экзосом, их роли в организме в нормальных физиологических процессах и в процессе канцерогенеза и опухолевой прогрессии, анализирует имеющиеся данные о белковых маркерах онкологических заболеваний в составе экзосом. Вторая часть обзора литературы описывает феномен внеклеточной ДНК, формы её циркуляции, роль в развитии онкологических заболеваний и оценивает внеклеточную ДНК в качестве источника биомаркеров для жидкой биопсии. Обзор производит очень хорошее впечатление - степень подробности, уровень обобщения и анализа имеющихся литературных данных свидетельствуют о высоком уровне теоретической подготовки

автора. Обзор написан хорошим литературным языком, хорошо иллюстрирован, большинство источников – это публикации последних десяти лет.

В разделе “Материалы и методы” автор придерживается классического стиля, описывая отдельно материалы и методы исследования. В работе использован широкий спектр самых современных молекулярно-биологических, биохимических и биоинформационных методов исследования, включая высокотехнологические методы анализа, такие как масс-спектрометрия, а также современные методики работы с внеклеточными везикулами. Раздел свидетельствует о высоком экспериментально-методическом уровне исследования. В качестве замечания к данному разделу работы следует отметить предоставление ссылки при описании авторской методики получения суммарных экзосом крови на протокол, описанный автором в ранее опубликованной работе (стр.58), вместо описания самой методики.

Раздел “Результаты и обсуждение” разбит на подразделы, снабжен иллюстрациями и приложениями, позволяет легко ориентироваться в представляемом экспериментальном материале и сопровождается обсуждением полученных данных на всех этапах исследования. Результаты исследования достаточно полно обсуждены автором, проанализировано их соответствие выдвигаемым идеям, их согласованность с данными, полученными другими учеными, работающими в близкой области.

Диссертацию завершают семь выводов, полностью соответствующие поставленной цели и задачам, в которых отражены основные результаты исследования. Выводы обоснованы полученными результатами.

Таким образом, работа Тутанова О.С. посвящена актуальному направлению современной биологии - изучению состава и роли циркулирующих экзосом и нуклеопротеиновых комплексов крови в норме и при раке молочной железы. Автор показал значимость использования фракции суммарных экзосом крови и потенциал исследования белковой компоненты нуклеопротеиновых комплексов для разработки подходов к жидкостной биопсии. Использование общепринятых методов выделения и характеристики внеклеточных везикул, величина выборок образцов для статистического анализа, применение современных методов для подробного и разностороннего биоинформационного анализа, а также статистического анализа полученных данных свидетельствует об обоснованности выводов и выносимых на защиту положений. Получены новые знания и показана перспектива трансляции результатов в клинику.

По теме диссертации опубликовано 9 статей в периодических изданиях, индексируемых в базах научного цитирования Scopus и Web of Science. Основные результаты обсуждены на многочисленных конференциях российского и международного уровня.

Автореферат отражает содержание диссертационной работы, оформлен в соответствии с требованиями ВАК.

Принципиальных замечаний по работе не имею. В порядке дискуссии хотелось бы отметить несколько моментов:

1. Фотоизображение частиц, полученных при анализе морфологии везикул с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (Рисунок 9, стр.74) недостаточно информативно. Следует улучшить качество изображения для возможности оценить размер и морфологию частиц для подтверждения их соответствия внеклеточным везикулам.

2. Данные анализа траекторий движения наночастиц (NTA-анализа) приведены в виде таблицы (Таблица 7, стр. 72), в которой указаны медиана и диапазон концентрации частиц, а также медиана и значения стандартной ошибки среднего (SEM) для характеристики размера экзосом. Такое представление не позволяет в достаточной мере оценить исследуемые характеристики в популяции везикул. Рекомендуется приводить данные NTA в виде среднечислового размерного распределения, отражающего концентрацию везикул различного размера и их долю в общей популяции везикул.

## **Заключение**

Диссертационная работа Тутанова Олега Сергеевича “Протеомный анализ экзосом и нуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих в крови здоровых женщин и больных раком молочной железы”, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством кандидата биологических наук Тамкович Светланы Николаевны. По актуальности проблемы, объёму и методическому уровню проведённых исследований, достоверности, научной новизне и практической значимости полученных результатов представленная работа полностью отвечает современным требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в соответствии с п.9 “Положения о порядке присуждения ученых степеней” №842 от 24 сентября 2013 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335 и от 2 августа 2016 года №748), предъявляемым к диссертациям на

соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия, а её автор заслуживает присуждения искомой степени.

**Официальный оппонент**

Доктор биологических наук, заведующая лабораторией регуляции клеточных и вирусных онкогенов Научно-исследовательского института канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России

Чевкина Елена Максимовна

дата

25.12.2021

Адрес организации: 115478,  
им. Н.Н. Блохина» Минздрава

23, ФГБУ «НМИЦ онкологии

4, e-mail: info@ronc.ru

Подпись д.б.н. Чевкиной Е.М. заверяю

Ученый секретарь НИИ канцерогенеза

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ,



Чева