ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.239.01

СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И

ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК», ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Аттестационное дело № _____

Дата защиты 14 октября 2026 г. протокол № 22

О присуждении Долговой Евгении Владимировне

(гражданка РФ)

ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация Долговой Е.В. «Интернализация двуцепочечной ДНК низкодифференцированными клетками млекопитающих и использование этого свойства при лечении экспериментальных опухолей» по специальности 1.5.22. Клеточная биология (биологические науки), принята к защите 27.05.2026 г, протокол №13, диссертационным советом 24.1.239.01 (Д 003.011.01), созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), (630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10). Диссертационный совет 24.1.239.01 (Д 003.011.01) утвержден ВАК 15.01.2010, приказ ВАК № 1-7 и переутвержден Министерством образования и науки РФ 11.04.2012 года, приказ № 105/нк.

Соискатель: Долгова Евгения Владимировна, 17.08.1988 года рождения, окончила Новосибирский государственный университет по специальности «биология» в 2010 году. В 2012 г. в диссертационном совете, созданном на базе ИЦиГ СО РАН, защитила кандидатскую диссертацию на тему:

«Токсический эффект синергичного воздействия цитостатика циклофосфана и экзогенной ДНК» и получила степень кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология» (диплом ДКН № 179518 от 11.03.2013 г.).

Долгова Е.В. работает в ИЦиГ СО РАН с 2009 года, в настоящее время в должности старшего научного сотрудника лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН.

Диссертация выполнена в лаборатории индуцированных клеточных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск, Россия.

Научный консультант: **Богачев Сергей Станиславович**, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН, Новосибирск.

Официальные оппоненты:

1. **Гришанова Алевтина Юрьевна**, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биохимии чужеродных соединений ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ), НИИ молекулярной биологии и биофизики (г. Новосибирск);
2. **Васильев Станислав Анатольевич**, доктор биологических наук, заместитель директора по развитию Томского НИМЦ, рук. лаборатории инструментальной геномики НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (НИМЦ РАН) (г. Томск);

3. **Миронова Надежда Львовна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ФГБНУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН) (г. Новосибирск).

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск в своем положительном отзыве, подписанном доктором биологических наук, заведующей лабораторией молекулярной генетики человека Е.Б. Стариковской и утвержденном директором ФГБУН Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН доктором биологических наук С.А. Демаковым, указала, что «Диссертация является законченной научной работой. В диссертации изложено целенаправленное исследование – от выявления уникальной особенности опухолевых стволовых клеток до успешной реализации таргетной терапии (эрадикация ОСК в экспериментальных опухолях). Результаты исследований и разработка новых стратегий, направленных на решение ключевых проблем по неоплазиям, имеют важное научно-практическое значение. Диссертационная работа Долговой Евгении Владимировны на тему «Интернализация двуцепочечной ДНК низкодифференцированными клетками млекопитающих и использование этого свойства при лечении экспериментальных опухолей» полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология (биологические науки)».

Отзыв на диссертационную работу обсужден и утвержден на семинаре Отдела структуры и функции хромосом Федерального государственного

бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук 16 июня 2026 года (протокол №2).

Долговой Е.В. опубликовано всего 83 научных работы и 23 тезиса конференций, из них по теме диссертации 42 публикации и 11 тезисов конференций, общим объемом 650 страниц, из них 41 публикация в журналах, индексируемых базами данных WOS и Scopus. Имеется 6 авторских свидетельств по теме диссертации. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах.

Наиболее значительные статьи Долговой Е.В. по теме диссертации:

1. Dolgova EV, Alyamkina EA, Efremov YR, Nikolin VP, Popova NA, Tyrinova TV, Kozel AV, et al. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination // Cancer Biol Ther. 2014. 15(10): 1378-94. DOI: 10.4161/cbt.29854. WOS, Scopus, Q1
2. Dolgova EV, Potter EA, Proskurina AS, Minkevich AM, Chernych ER, Ostanin AA, Efremov YR, et al. Properties of internalization factors contributing to the uptake of extracellular DNA into tumor-initiating stem cells of mouse Krebs-2 cell line // Stem Cell Res Ther. 2016. 7(1): 76. DOI: 10.1186/s13287-016-0338-8. WOS, Scopus, Q1
3. Dolgova EV, Mishinov SV, Proskurina AS, Potter EA, Efremov YR, Bayborodin SI, Tyrinova TV, et al. Novel Cancer Stem Marker and Its Applicability for Grading Primary Human Gliomas // Technol Cancer Res Treat. 2018. 17: 1533034617753812. DOI: 10.1177/1533034617753812. WOS, Scopus, Q2
4. Dolgova EV, Petrova DD, Proskurina AS, Ritter GS, Kisaretova PE, Potter EA, Efremov YR, et al. Identification of the xenograft and its ascendant sphere-forming cell line as belonging to EBV-induced lymphoma, and characterization of the status of sphere-forming cells // Cancer Cell Int. 2019. 19: 120. DOI: 10.1186/s12935-019-0842-x. WOS, Scopus, Q1

5. Dolgova EV, Andrushkevich OM, Kisaretova PE, Proskurina AS, Ritter GS, Dubatolova TD, Romanenko MV, et al. Efficacy of the new therapeutic approach in curing malignant neoplasms on the model of human glioblastoma // Cancer Biol Med. 2021. 18(3): 910-930. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0511. WOS, Scopus, Q1
6. Petrova DD*; Dolgova EV*; Proskurina AS; Ritter GS; Ruzanova VS; Efremov YR; Potter EA, et al. The New General Biological Property of Stem-like Tumor Cells (Part II: Surface Molecules, Which Belongs to Distinctive Groups with Particular Functions, Form a Unique Pattern Characteristic of a Certain Type of Tumor Stem-like Cells) // Int. J. Mol. Sci. 2022. 23: 15800. DOI: 10.3390/ijms232415800. * These authors contributed equally to this work. WOS, Scopus, Q1
7. Dolgova EV, Oshikhmina SG, Efremov YR, Ruzanova VS, Proskurina AS, Kirikovich SS, Levites EV, Ritter GS, Taranov OS, Leplina OY, Ostanin AA, Chernykh ER, Strunkin DN, Kolchanov NA, Bogachev SS. Internalization of extracellular double-stranded DNA as a potential marker of cancer stem cells in Epstein-Barr virus-induced B-cell lymphoma. Cancer Biomark. 2025; 42(5): 18758592251322040. WOS, Scopus, Q2

На диссертацию поступило 6 отзывов, все положительные. Отзывы прислали:

1. Шевела Е.Я., д.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск.
2. Тыринова Т.В., д.б.н., зав. лабораторией клеточно-молекулярных механизмов иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск.

3. Сидоров С.В., д.м.н., профессор, заведующий отделением опухолей молочных желез ГБУЗ НСО «ГКБ №1», зав. кафедрой хирургических болезней ИММТ НГУ, г. Новосибирск.
4. Гуляева Л.Ф., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза НИИ молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск.
5. Верещагин Е.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой анестезиологии и реаниматологии ФПК и ППВ ФБГОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» РФ, г. Новосибирск.
6. Августинович Д.Ф., д.б.н., доцент, в.н.с. лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов ФИЦ ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что официальные оппоненты являются компетентными специалистами в области молекулярной и клеточной биологии, генетики, биохимии и экспериментальной онкологии, имеют публикации в ведущих журналах биологического и медицинского профиля и дали свое письменное согласие быть оппонентами. Ведущая организация является одной из ключевых организаций, в которой активно проводятся исследования в области молекулярной и клеточной биологии, геномики, клеточных технологий, а также разработки методов диагностики и терапии онкологических и инфекционных заболеваний.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований доказано, что интернализация фрагментов экстраклеточной двуцепочечной (дц) ДНК низкодифференцированными клетками млекопитающих, включающих стволовые гемопоэтические клетки мыши и опухолевые стволовые клетки на примере карциномы мыши Кребс-2

и В-лимфомы человека, индуцированной вирусом Эпштейна-Барр, происходит без участия трансфецирующих агентов благодаря особенностям строения их клеточной мембраны (гликокаликса), которая, в отличие от коммитированных опухолевых клеток, обогащена белками, содержащими положительно заряженные сайты связывания полианионов, включая молекулы дцДНК.

Доказано, что механизм поглощения экстраклеточной ДНК стволовыми опухолевыми клетками обеспечивается через природные механизмы эндоцитоза и макропиноцитоза и обусловлен возможностью формирования прочных контактов между фрагментами ДНК и структурными компонентами клеточной мембраны этих клеток.

Теоретическая значимость работы обоснована тем, что **впервые,** на примере опухолевых стволовых клеток и гемопоэтических стволовых клеток мыши, несущих маркеры CD34, c-Kit и Sca-1, изучены особенности структуры мембраны клеток млекопитающих с низкой степенью дифференцировки, что позволило обосновать и доказать их способность к захвату фрагментов экстраклеточной дцДНК через механизмы эндо- и макропиноцитоза.

Впервые показано, что особенностью структурно-функциональной организации гликокаликса опухолевых стволовых клеток является обязательное присутствие таких мембранных компонентов, как протеогликаны/гликопротеины, гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки и скавенджер-рецепторы, которые содержат положительно заряженные участки белковых последовательностей, что и обеспечивает их связывание с полианионами, включая гепарин и молекулы дцДНК.

Доказано, что механизм захвата стволовыми клетками фрагментов дцДНК осуществляется через несколько последовательных этапов, включая электростатическое притяжение отрицательно заряженных молекул ДНК к положительно заряженной поверхности клеток, формирование прочных

контактов с кластерами положительно заряженных аминокислотных остатков, находящихся в структуре белков гликокаликса, и последующее включение фрагментов ДНК в клетку посредством клатрин- и/или кавеоло-зависимого эндоцитоза, а также макропиноцитоза.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что впервые разработаны и реализованы принципиально новый подход к идентификации опухолевых стволовых клеток (TAMRA-ДНК зонд, патент № 2530170**)** в общей клеточной массе опухолей различного происхождения **и режим противоопухолевого воздействия** (режим «Каранахан», патент № 2595864), основанные на выявленном природном свойстве низкодифференцированных клеток млекопитающих поглощать фрагменты экстраклеточной дцДНК без участия трансфецирующих агентов.

Установлено, что техническое решение режима противоопухолевого воздействия «Каранахан» не имеет аналогов (патенты № 2662354, № 2675233, № 2717218, № 2542410) и включает трехкратное низкодозовое введение кросслинкирующего цитостатика, хронометрически привязанное к длительности цикла репарации двуцепочечных разрывов в ДНК клеток конкретной опухоли, которое сочетается с введением многокомпонентного препарата ДНК (нативная ДНК человека, нативная и модифицированная ДНК спермы лосося в соотношении 7:5:2) точно в момент смены двух репарационных программ – эксцизионной репарации нуклеотидов и гомологичной рекомбинации, причем разные компоненты препарата адресно интерферируют с каждой из них.

Апробирование режима «Каранахан» на моделях карциномы мышей Кребс-2 в асцитной и солидной формах, а также карциномы Льюис показало наличие устойчивой ремиссии у 50-86% животных, ограниченной временем естественного дожития.

Полученные в диссертационной работе результаты используются в образовательном процессе при чтении курса «Физиология 21 века» студентам ФЕН НГУ (Новосибирск), а также одобрены к использованию в открытом пилотном клиническом исследовании персонифицированной химиотерапии рака молочной железы малыми дозами циклофосфана с учетом репаративного цикла опухолевых клеток на основании договора № 582020 от 9.10.20 о научно-практическом сотрудничестве между Государственной клинической больницей № 1, ИЦиГ СО РАН, Институтом фундаментальной и клинической иммунологии СО РАМН и ООО «КАРАНАХАН». Результаты пилотного исследования опубликованы (Proskurina *et al.*, Transl Cancer Res 2026, doi: 10.21037/tcr-2025-1-2722). В 2020 году результаты этого направления отмечены премией Президента Российской Федерации в области науки и инноваций.

Применительно к проблематике диссертации результативно использованы методы клеточной биологии, включая многопараметрическую проточную цитометрию, флуоресцентную и конфокальную лазерную микроскопию для визуализации локализации поглощенного материала, а также набор молекулярно-генетических методов – RNAseq с последующим биоинформатическим анализом и отбором генов-кандидатов, количественный ПЦР в реальном времени, радиоактивное мечение α-^{32}P ДНК-зонда для оценки доставки фрагментов ДНК, фракционирование геномной ДНК в градиенте концентраций, а также мультиплексный иммунологический анализ.

Кинетику репарации ДНК оценивали методом «ДНК-комет» (микрогелевый электрофорез отдельных клеток); для характеристики свойств клеточной поверхности применяли электрофорез клеток в свободном объеме, обработку полианионными соединениями (гепарин, декстран сульфат) и ингибиторный анализ путей эндоцитоза с использованием азида натрия, EIPA, цитохалазина Д, метил-β-циклодекстрина, нистатина и диназора.

Все манипуляции с экспериментальными животными и перевивку опухолей проводили в условиях SPF-вивария. Функциональные исследования включали комплексный патоморфологический и гистологический анализ органов и тканей, интрацеребральную ортотопическую ксенотрансплантацию, нейрохирургическое удаление ксенотрансплантата, а также МРТ головного мозга мышей для контроля роста графта. Функциональные свойства клеток оценивали в тестах сферообразования (клоногенность) и по способности формировать графт при перевивке.

Оценка достоверности результатов выявила их обоснованность и воспроизводимость, которая обеспечена использованием независимых методических подходов и различных экспериментальных моделей. Эффективность терапевтического режима «Каранахан» продемонстрирована на пяти моделях опухолей мышей и культуре глиобластомы человека U87, что исключает объяснение наблюдаемых эффектов особенностями отдельной экспериментальной модели. Достоверность результатов подтверждается оценкой статистической значимости полученных результатов и их сравнением с независимыми данными других авторов. Результаты работы широко цитируются в публикациях, связанных с исследованиями в области опухолевых стволовых клеток, межклеточного взаимодействия и механизмов транспорта биомолекул в клетку, а также разработки новых методов диагностики и лечения опухолевых заболеваний.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в постановке цели и задач исследований, в разработке экспериментального дизайна работы, в обосновании выбора методов при решении конкретных задач, а также в обработке данных и интерпретации полученных результатов.

Полученные соискателем научные результаты соответствуют п. 6. «Мембраны клетки и органелл, их состав и структурно-функциональная организация. Ионные каналы, транспортеры и другие механизмы транспорта через мембрану. Механизмы поддержания ионного гомеостаза»; п. 7.

«Везикулярный транспорт и механизмы его регуляции. Межклеточный транспорт»; п. 9. «Клеточный цикл, его контроль и регуляция»; п. 15. «Стволовые клетки, регуляция их жизненного цикла, функции. Особенности биологии стволовых опухолевых клеток. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки»; п. 19. «Клеточные технологии как основа для разработки терапевтических подходов для лечения различных патологий. Создание клеточных моделей различных заболеваний, в том числе наследственных» паспорта научной специальности 1.5.22. Клеточная биология (биологические науки).

В дискуссии принимали участие: д.б.н. Рубцов Н.Б., д.б.н. Меркулова Т.И., к.б.н. Ефремов Я.Р., чл.-корр. РАН, д.м.н. Черных Е.Р., д.б.н. Пономаренко М.П., д.б.н. Бородин П.М., д.м.н. Шевела Е.Я., академик РАН Колчанов Н.А., академик РАН Кочетов А.В.

Д.б.н. Рубцовым Н.Б. были высказаны замечания относительно интерпретации данных по визуализации интернализации экстраклеточной ДНК клетками и параллельного анализа с применением нескольких антител, меченных флуоресцентными метками. Д.б.н. Меркуловой Т.И. были высказаны замечания относительно подхода к оценке сайтов связывания молекул экстраклеточной ДНК с белками, входящими в состав гликокаликса опухолевых клеток. Д.б.н. Бородиным П.М. были высказаны замечания по структуре написания литературного обзора диссертации и статистической обработки полученных данных.

На все замечания Долговой Е.В. были даны аргументированные ответы.

Диссертационным советом сделан вывод о том, что диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную работу, соответствует критериям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

Диссертационный совет 14 октября 2026 г. принял решение присудить Долговой Е.В. ученую степень доктора биологических наук за решение научной задачи, связанной с изучением структурно-функциональных особенностей клеточных мембран стволовых опухолевых клеток и реализацию на их основе режима противоопухолевого воздействия «Каранахан», направленного на таргетную эрадикацию указанных клеток.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 6 докторов наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология (биологические науки), из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 15, против – 5, недействительных бюллетеней – 1.

Председатель
диссертационного совета,
д.б.н., Академик РАН А.В. Кочетов

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук Т.М. Хлебодарова
14.10.2026 г.

12