

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета НТУ.1.5.3.11

Костюшева Дмитрия Сергеевича

на диссертацию **Сырочевой Анастасии Олеговны**

«Исследование взаимной регуляции экспрессии катепсина В и стефина А в процессе онкогенной трансформации клеток»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 Молекулярная биология

Актуальность темы диссертации

Представленная научная работа посвящена изучению молекулярных механизмов регуляции системы «протеиназа–ингибитор» на примере катепсина В (CTSB) и его эндогенного ингибитора стефина А (STFA), и без сомнения отличается высокой степенью актуальности, что обусловлено сразу несколькими фундаментальными и прикладными аспектами. Прежде всего, дисбаланс в системе CTSB/STFA традиционно рассматривается как один из ключевых драйверов опухолевой инвазии и метастазирования, однако большинство предшествующих работ ограничивалось изучением их взаимодействия преимущественно во внеклеточном матриксе. В данном же исследовании акцент смещается в сторону внутриклеточных, и что особенно важно, ядерных процессов, что значительно расширяет горизонты понимания роли этих белков. Кроме того, стремительное развитие персонализированной онкологии требует дифференцированного подхода к оценке ответа нормальных и трансформированных клеток на химиотерапевтические агенты, и именно эту проблему авторы ставят в центр своей экспериментальной модели – завершая эксперименты изучением особенностей поведения катепсина В и стефина А при обработке клеток рака почки химиотерапевтическим препаратом доксорубицином. Таким образом, тематика работы является своевременной, напрямую затрагивает вопросы регуляции экспрессии, локализации и взаимодействия катепсина В со

стефином А, определяет ответ данных факторов на использование противоопухолевых препаратов. Помимо фундаментального значения, результаты могут быть использованы в создании новых противоопухолевых подходов для лечения различных онкологических заболеваний – потенциально, с минимальными эффектами на здоровые клетки.

Структура и содержание диссертационной работы

Работа построена по стандартному принципу, содержит Введение, разбитое на 4 подглавы, которые дают подробное изложение об основных свойствах цистеиновых катепсинов с упором на катепсин В, механизмы регуляции продукции катепсина В в клетке с указанием особенностей эпигенетической регуляции, регуляции на уровне транскрипции, пост-транскрипционных и трансляционных особенностях. Вслед за этим, приводится информация об особенностях влияния цистатинов на активность катепсина В и его взаимодействие со стефином А. Наконец, излагаются особенности влияния химиотерапевтических воздействий на экспрессию катепсина В. Далее следуют рубрики материалы и методы, объемную часть посвященную результатам исследования и обсуждению, затем следуют рубрики «заключение», «выводы», «список сокращений и условных обозначений», заканчиваясь списком использованной литературы.

Научная новизна результатов диссертационной работы

Говоря о научной новизне полученных результатов, необходимо подчеркнуть, что работа содержит несколько принципиально новых положений, многие из которых были установлены впервые. Ключевым результатом является экспериментальное доказательство функционирования системы ко-регуляции по принципу отрицательной обратной связи, где CTSB выступает не только как мишень для ингибирования, но и как активный протеолитический модулятор, влияющий на биосинтез STFA. Это переворачивает классическую линейную парадигму «фермент–ингибитор» и

демонстрирует каскадный характер регуляции, что ранее в литературе не описывалось. Не менее значимым результатом является обнаружение способности STFA взаимодействовать с хроматином в ядре раковых клеток, причем с помощью метода ChIP-вестерн блоттинга авторы впервые показали, что оба белка входят в хроматиновую фракцию и ассоциированы с гистоном H3, при этом между уровнями их хроматин-связанных форм выявлена строгая положительная корреляция. Особого внимания заслуживает также установленный факт клеточно-специфических различий в регуляции: в эмбриональных клетках Hek293T механизм контроля экспрессии характеризуется значительно более высокой степенью точности по сравнению с трансформированными линиями, а различный ответ на доксорубицин (повышение экспрессии в раковых клетках 769p и снижение в нормальных при одинаковой концентрации) демонстрирует принципиально различную регуляторную архитектуру в норме и при патологии, что ранее системно не исследовалось.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость выполненной работы заключается в существенном расширении и пересмотре фундаментальных концепций внутриклеточного протеостаза и регуляции активности протеиназ. Авторы обоснованно доказывают, что взаимодействие CTSB и STFA не ограничивается цитоплазматическим компартментом, а представляет собой сложную пространственно-временную систему, интегрированную в регуляцию транскрипционных процессов. Обнаружение колокализации белков в ядре, подтвержденной количественным анализом, указывает на их функциональную взаимосвязь не только в протеолитических каскадах, но и в эпигенетической регуляции, что заставляет по-новому взглянуть на роль ингибиторов протеиназ как потенциальных модуляторов структуры хроматина. Более того, выявленные различия в степени точности регуляции

между нормальными и раковыми клетками позволяют предположить, что дерегуляция системы CTSB–STFA является не просто следствием, а возможной движущей силой онкогенной трансформации, связанной с утратой тонких механизмов отрицательной обратной связи. Это расширяет теоретический базис для понимания ранних этапов канцерогенеза и открывает новые научные направления, связывающие протеолиз с транскрипционным контролем, что является бесспорным вкладом в развитие молекулярной биологии.

Практическая значимость полученных результатов также не вызывает сомнений и имеет прямой выход на клинически значимые аспекты онкологии. Прежде всего, установление факта ассоциации CTSB и STFA с хроматином через гистон H3 предлагает новые потенциальные биомаркеры, которые могут быть использованы для оценки агрессивности опухолевого процесса и прогнозирования течения заболевания, поскольку уровень хроматин-связанных форм этих белков может отражать степень эпигенетической дестабилизации клетки. Однако наиболее ценным в прикладном аспекте представляется вывод о дозозависимом и разнонаправленном действии доксорубина: тот факт, что низкие концентрации препарата стимулируют экспрессию онкоассоциированных белков в раковых клетках, но подавляют их в нормальных, является серьезным основанием для рассмотрения возможности оптимизации терапевтических стратегий и схем химиотерапии, особенно в отношении режимов низких дозировок, которые могут давать парадоксальный эффект. Кроме того, клеточно-специфическая чувствительность к Dox позволяет рассматривать систему CTSB-STFA как потенциальный предиктивный маркер ответа на антрациклиновые антибиотики, что открывает перспективы для разработки более селективных подходов к лечению, минимизирующих повреждение здоровых тканей и повышающих эффективность воздействия именно на опухолевые клетки.

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

Оценивая степень обоснованности научных положений и достоверность выводов, следует отметить, что работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием комплекса взаимодополняющих современных подходов, что обеспечивает надежность полученных данных. Авторы грамотно сочетают различные методы исследования на уровне транскриптов и белков, а также белок-белковых взаимодействий, что позволяет проследить регуляцию одновременно на уровне экспрессии генов и биосинтеза белка, исключая возможные артефакты, связанные с пост-трансляционными модификациями. Применение конфокальной микроскопии с количественной оценкой колокализации по коэффициенту Мандера дает объективные доказательства пространственной организации белков в цитоплазматическом и ядерном компартментах, а использование метода ChIP-вестерн блоттинга строго верифицирует взаимодействие с гистоном H3, что является золотым стандартом для подобных исследований. Особого внимания заслуживает дизайн эксперимента с использованием парных клеточных линий Нек293Т и 769р, позволяющий напрямую сравнивать регуляторные механизмы в нормальном и трансформированном фенотипе, что придает выводам высокую степень валидности. Все четыре представленных вывода логически вытекают из экспериментальных данных, являются конкретными и непротиворечивыми и; особенно убедительно обоснован вывод о дозозависимом эффекте доксорубицина, поскольку он базируется на прямом контрасте в поведении двух клеточных линий в идентичных условиях. Общий уровень доказательности и глубина проработки материала позволяют однозначно утверждать, что работа выполнена на высоком методическом и научном уровне.

Соответствие автореферата основному содержанию диссертации

Автореферат отражает ключевые результаты диссертации, с упором на положения, выносимы на защиту, а именно

Изучение особенностей взаимодействия катепсина В и стефина А на уровне транскрипции и трансляции

Определение роли протеолитической активности катепсина В в продукции стефина А

Различия во взаимодействии стефина А и катепсина В в нормальных и раковых клетках

Определение распределения данных факторов между ядром и цитоплазмой при различных воздействиях (сверхэкспрессия либо нокдаун факторов, обработка доксорубицином)

Взаимодействие и импорт факторов в ядро с образованием комплексов с гистоном H3

Доз-зависимость и различия в ответе нормальных и раковых клеток на различные дозировки доксорубицина, их влияния на поведение изучаемых факторов

Оценка диссертационного исследования

С учетом полученных результатов, полноты исследования, завершенности изучения поставленных фундаментальных и прикладных вопросов, а также значимости результатов для фундаментальной онкологии и области разработки новых противоопухолевых препаратов, оценка диссертационного исследования «отлично».

Замечания по диссертации

Опечатки, лишние точки и запятые, орфографические ошибки, отсутствие либо несвоевременная расшифровка аббревиатур

Вместо символа умножения используется буква «х», где-то большой буквой, где-то маленькой

Присутствуют различные англицизмы, которые стоит заменить на русские слова и термины, такие как «оверэкспрессия», которая часто заменена на «гиперэкспрессия», «ремоделинг» и проч.

Актуальность работы: «прогресс в области молекулярной диагностики... обеспечили улучшение показателей выживаемости» - корректно будет указать прогресс в диагностике, поскольку инструментальные методы исследования являются по крайней мере не менее значимыми

На рисунках следует использовать ось У одного масштаба и размерности – иначе интерпретация данных становится затруднительной

«Как показал протеомный анализ, уровень белка CTSB был статистически значимо повышен в образцах рака щитовидной железы...» - кем показан? Если авторами – необходимо представить данные; если в литературе – необходимо сделать ссылку на исследование

Эффективность трансфекции указанных клеточных линий явно был различным – как это контролировалось, корректировались ли эффекты исходя из этих отличий?

НЕК293Т – это не нормальная, а трансформированная клеточная линия, которая продуцирует вирусный Т-антиген. Возможно ли, что вирусный антиген приводит к отсутствию наблюдаемой обратной связи между стефином и катепсином В?

Наблюдали «аналогичную картинку распределения» - картину распределения.

Почему не изучали изменения распределения в катепсинах в митохондриях, а ограничились только цитоплазмой? Катепсин В известен способностью локализоваться в митохондриях и вызывать клеточную гибель.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней Автономной некоммерческой образовательной организацией высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»

Диссертационная работа Сырочевой Анастасии Олеговны «Исследование взаимной регуляции экспрессии катепсина В и стефина А в процессе онкогенной трансформации клеток», отвечает требованиям пп.2.1–2.6, п.п.2.8-2.9 Положения о присуждении ученых степеней Автономной некоммерческой образовательной организацией высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», утвержденного приказом от 02 апреля 2026 г. № 469-ОД-У, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Сырочева Анастасия Олеговна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 Молекулярная биология

Член диссертационного совета

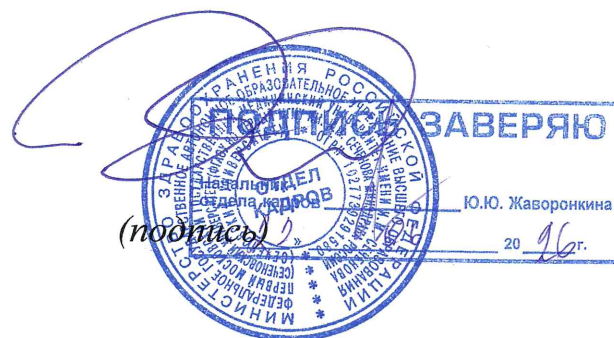
Костюшев Д.С.

НТУ.1.5.3.11

д.б.н., профессор кафедры биотехнологии

Сеченовского Университета

15.06.2026



Сведения:

Докторская диссертация защищена по специальности 1.5.10 «Вирусология»

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение

высшего образования Первый Московский государственный медицинский

университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения

Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Адрес организации: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2

Телефон: +7-926-085-93-37

e-mail: dkostushev@gmail.com