

ОБЗОР ОТЗЫВОВ,
поступивших на диссертацию и автореферат диссертации Сырочевой Анастасии Олеговны
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по научной специальности 1.5.3. Молекулярная биология,
тема: «Исследование взаимной регуляции экспрессии катепсина В и стефина А в процессе
онкогенной трансформации клеток».

Фамилия И.О., организация	Вопросы/Замечания	Ответы/Комментарии
От Прохорчука Е.Б., доктора биологических наук, руководителя лаборатории Научно-технологического университета «Сириус»(федеральная территория «Сириус»), заведующего лабораторией геномики и эпигеномики позвоночных Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (г. Москва), декана медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, член-корреспондента РАН (г. Москва).	В тексте встречаются редакционные и технические неточности: опечатки, неудачные формулировки, несогласованность отдельных терминов, а также использование формы первого лица множественного числа в разделе 3.5, что нежелательно для единоличной диссертационной работы.	С замечанием согласна.
	В ряде случаев не вполне последовательно оформлены ссылки на заимствованные или созданные с использованием BioRender иллюстрации; желательно единообразно указывать источник или способ подготовки рис. 4. сунков.	С замечанием согласна.
	В разделе материалов и методов целесообразно более подробно указать сведения об использованных антителах, включая каталожные номера, а также уточнить, какие именно антитела к гистону H3 применялись.	С замечанием согласна. Привожу каталожные номера всех использованных антител: Поликлональные первичные антитела Cathepsin В (CTSB) Cloud CloneCorp. PAC964Hu01 Поликлональные первичные антитела Cystatin A (STFA)

		Affinity Biosciences Cat #DF7458 Поликлональные первичные антитела Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Cloud CloneCorp. PAB932Hu01 Поликлональное вторичное FITC-меченное антитело Caprine Anti-Rabbit IgG Cloud CloneCorp. SAA544Rb18 Поликлональное вторичное Texas Red-меченное антитело Goat Anti-Rabbit FineTest FNSA-0051 Вторичное HRP- меченое антитело Goat Anti-Rabbit Abcam ab97051 В работе были использованы антитела к тотальному гистону H3, высокой степени очистки и имеющие маркировку IP, Chip Affinity Biosciences Cat#DF6932, RRID:AB_2838891..
	Имеются несоответствия в обозначениях плазмидных конструкций в материалах и методах и в разделе результатов, например pcDNA-3.1-CTSB и PCTSB, а также путаница в ссылках на рисунки и их нумерации на страницах 51-54.	С замечанием согласна. В таблице 7 материалов и методов мне следовало указать сокращенные обозначения плазмид.
	Для ряда рисунков следовало бы более явно указать метод измерения соответствующих величин, в частности способ определения уровня мРНК целевого гена на рисунке 12, а также пояснить отдельные вопросы статистической значимости при визуальном заметных различиях и малых погрешностях.	С замечанием согласна. В главе 3 подглаве 3.1 3.1 Гены катепсина В и стефина А ко-экспрессируются в нетрансформированных и опухолевых клетках, а также в подглаве 3.4 Каталитическая активность катепсина В влияет на продукцию стефина А данные об экспрессии генов были получены с использованием метода количественной ПЦР в реальном времени , для детекции сигнала

		были использованы коммерческие наборы с интеркалирующим красителем Sybr green.
	Интерпретация результатов трансфекции требует дополнительной осторожности: при экзогенной экспрессии одного белка и детекции эндогенной транскрипции другого возникает сложная система, включающая эндогенные и экзогенные регуляторные элементы, а сверхэкспрессия может влиять на физиологическую внутриклеточную локализацию белка.	С замечанием согласна. Экзогенная экспрессия действительно может влиять на функции и локализацию белков.
	Формулировки о функциональном взаимодействии CTSB и STFA и о репрессирующем эффекте на транскрипционную активность гена CTSB. представляются чрезмерно сильными; представленные данные скорее указывают на возможность такого взаимодействия и на сложный опосредованный эффект, требующий дальнейшей проверки.	С замечанием согласна. Это правда слишком сильная формулировка.
	Требуется обсуждения кажущееся противоречие между эффектами снижения уровня STFA и воздействием пептида PLVE: если уменьшение STFA повышает уровень CTSB, то необходимо объяснить, почему обработка PLVE, сопровождающаяся снижением STFA, не приводит к ожидаемому повышению CTSB	Отсутствие ожидаемого повышения CTSB при обработке PLVE, несмотря на снижение уровня STFA, может быть объяснено тем, что PLVE является необратимым ингибитором цистеиновых катепсинов и напрямую влияет на ферментативную активность самого катепсина В и других представителей этого типа (например, CTSL, CTSS), которые участвуют в регуляции процессинга или стабильности CTSB, что создаёт сложный разнонаправленный эффект и маскирует дерепрессию, ожидаемую при снижении

		STFA. Но это лишь гипотеза и требуется экспериментальное подтверждение.
	Часть работы, связанная с иммунопреципитацией хроматина, является интересной, но нуждается в дополнительных технических контролях и пояснениях: важно соотнести количество связанного с хроматином CTSB/STFA с ядерным уровнем этих белков, показать отрицательные контроли на хроматин-несвязанные белки и обсудить возможность обратной иммунопреципитации или дальнейшего ChIP-seq анализа.	С замечанием согласна. Определение соотношения связанных с хроматином форм к общему пулу ядерных форм исследуемых белков позволило бы объективно оценить долю хроматин-ассоциированных форм. Для подтверждения специфичности преципитации действительно стоит добавить контроль с неспецифическим антителом (например, антитело к IgG человека). С данными преципитатами была проведена серия вестерн блот анализа с антителами к GAPDH (Cloud Clone Corp. PAB932Hu01), на которых не было выявлено специфически связанных полос. Данные не были представлены в работе, это мое упущение. Обратная иммунопреципитация была бы логичным продолжением данной главы и помогла бы выяснить находятся ли исследуемые белки на одном участке ДНК. Данные эксперимент действительно планировался, но мы столкнулись с трудностями – на тот момент в продаже не было антител для CTSB и STFA с пометкой IP или Chip.
От Буздина А.А., доктора биологических наук, профессора РАН, руководителя исследовательской группы Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно	В работе присутствуют грамматические ошибки и опечатки. Это технический комментарий, не снижающий ценности работы.	С замечанием согласна.

технологический университет «Сириус» (федеральная территория «Сириус»).	В разделе 2.2.6 описано последовательное иммуноцитохимическое окрашивание препаратов сначала на CTSSB, затем на STFA с последующей оценкой колокализации. Оценивалась ли возможная перекрёстная реактивность вторичных антител между каналами и проводился ли для каждого канала контроль с исключением первичных антител?	Да, для каждой клеточной линии были приготовлены препараты без использования первичных антител, сигнал от вторичных антител не наблюдался. Перекрытие каналов было исключено на этапе настройки микроскопа: для настройки были использованы контрольные образцы с единичными флуорофорами, на основе которых выставили границы детекции таким образом, чтобы спектры излучения не перекрывались.
	Что являлось положительным контролем трансфекции?	Для выбора трансфецирующего агента и определения соотношения «агент: ДНК» использовалась плаزمид. кодирующая GFP. Однако это являлось этапом отработки метода и не вошло в текст диссертационного исследования. Плазмиды, использованные в работе, не несли репортерный белок т.к это помешало бы дальнейшим экспериментам.
От Рихтера В.А., доктора биологических наук, заведующего лабораторией биотехнологий, г.н.с., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск).	Вызывает недоумение почти полное отсутствие ссылок на «свежие публикации». Список цитируемых источников весьма обширен, но многие из них довольно «старые».	С замечанием согласна.
	На стр. 53 – 54 представлены результаты по изменению уровня транскрипции целевых генов после трансфекции, кажется, что было полезно проделать эксперименты, подтверждающие работоспособность модели (положительный контроль).	«Положительный контроль» использовался только на этапе отработки метода трансфекции и выбора трансфецирующего агента и определения соотношения «агент: ДНК». В качестве положительного контроля использовалась плазмид. кодирующая GFP.

	трансфекции соответствующей плазмидой. Выводы бы звучали более весомо.	
	В последнем абзаце текста на стр. 53 рассматривается рисунок № 9. Мне кажется, что речь идет о рисунке 13.	С замечанием согласна. Нумерация рисунков в этой главе была не полностью изменена.
	Известно, что доксирубицин не специфично блокирует деление раковых клеток путём остановки синтеза всех белков в клетке. Как удалось оценить избирательное действие препарата на исследуемые ферменты?	Основной мишенью доксорубина является молекула ДНК. Встраиваясь между парами оснований, он блокирует работу ферментов репликации и транскрипции. Помимо этого, доксирубицин связывается с топоизомеразой II, препятствуя нормальной денатурации цепей ДНК в процессе деления клеток. Его влияние на биосинтез белка является следствием повреждения ДНК и нарушения транскрипции. Из-за этого синтез белка нарушается неспецифически, что усугубляет общее цитотоксическое действие препарата. В наших экспериментах мы не использовали дополнительные соединения и оценивали исключительно эффект самого доксорубина.
От Костюшева Д.С., доктора биологических наук, профессора кафедры биотехнологии Института фармации им. А.П. Нелюбина, Сеченовский Университет (г. Москва).	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», «ремоделлинг» и проч. Актуальность работы: «прогресс в области	С замечанием согласна.

	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 Наблюдали «аналогичную картинку распределения» картину распределения.	
	«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	С замечанием согласна. В этом месте должна быть ссылка на источник 152. В pdf версии она осталась, возможно, в версии word с ссылкой возникли проблемы. В будущем буду осмотрительнее – буду высылать pdf версии.
	Эффективность трансфекции указанных клеточных линий явно был различным – как это контролировалось, корректировались ли эффекты исходя из этих отличий?	На этапе отработки метода и выбора трансфецирующего агента, использовалась плазмида, кодирующая GFP, интенсивность флуоресценции через 48 часов была сопоставим в исследуемых линиях. Это не вошло в диссертационное исследование т. к. являлось отработкой метода. Плазмиды, использованные в работе, не несли репортерный белок т.к это мешало бы дальнейшим экспериментам.
	НЕК293Т — это не нормальная, а трансформированная клеточная линия, которая продуцирует вирусный Т-антиген. Возможно ли, что вирусный антиген	С замечанием согласна. НЕК293Т действительно не является здоровой клеточной линией. Были проведены дополнительные эксперименты с линией

	приводит к отсутствию наблюдаемой обратной связи между стефином и катепсином В?	эндотелиальных клеток Ea. hy 926. При анализе данных конфокальной микроскопии, было выявлено, что в случае трансфекции плазмидой для увеличения экспрессии CTSB, уровень экспрессии CTSB не отличается от контроля, при этом уровень экспрессии STFA увеличивается. Аналогичный результат наблюдается в линии HEK293T. (Syrocheva, A. O., Kolesova, E. P., Parodi, A., & Zamyatnin, A. A., Jr (2025). Stefin A Regulation of Cathepsin B Expression and Localization in Cancerous and Non-Cancerous Cells. <i>International journal of molecular sciences</i>, 26(19), 9321. https://doi.org/10.3390/ijms26199321). Полученные данные не вошли в диссертационное исследование в виду своей ограниченности (был проведен только иммуноцитохимический анализ).
	Почему не изучали изменения распределения в катепсинах в митохондриях, а ограничились только цитоплазмой? Катепсин В известен способностью локализоваться в митохондриях и вызывать клеточную гибель.	С замечанием согласна. Это действительно было бы хорошим дополнением работы, как в контексте изучения внутриклеточного распределения, так и в контексте изучения влияния терапевтического агента на ось CTSB/STFA.
От Покровского В.С., доктора медицинских наук, исполняющего обязанности директора НИИ экспериментальной онкологии и канцерогенеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (г. Москва), заведующего Лабораторией биохимических основ фармакологии, заведующего кафедрой	В работе автор несколько раз делает вывод о том, что «STFA не только контролирует активность CTSB по принципу отрицательной обратной связи, но и сам является мишенью для протеолитической модификации со стороны CTSB». При этом экспериментов, прямо доказывающих протеолиз STFA под	С замечанием согласна. Это неудачная формулировка, имелось в виду, что каталитически активный CTSB вовлечен в каскад регуляции экспрессии STFA.

биохимии им. Т.Т.Березова Российского университета дружбы народов (г. Москва).	действием CTSB, не приводится, и отсутствуют даже рассуждения о том, пептидные связи между какими аминокислотными остатками могут такому протеолизу подвергаться. Если же идет речь о механизмах ингибирования на транскрипционном уровне, то было бы целесообразно подробнее исследовать эту гипотезу. Белок в протеолитически активной конформации способен регулировать экспрессию генов? Осуществлять протеолиз иных белков, которые по каскаду влияют на активности STFA? Возможны ли иные механизмы	
	В обзоре литературы автор отмечает, что продукция катепсина может изменяться под действием разных препаратов, при этом экспериментальная работа проведена только с доксорубицином. Для полноты картины было бы целесообразно изучить влияние препаратов разного механизма действия.	С замечанием согласна. Действительно, расширение спектра исследуемых фармакологических агентов за счет включения препаратов с альтернативными механизмами цитотоксического действия является необходимым условием для повышения практической значимости данного исследования.
	В работе в достаточно большом количестве присутствуют грамматические ошибки и опечатки, а форматирование ряда таблиц и рисунков (в частности, табл. 7) выглядит небрежно. Это технический комментарий, не снижающий ценности работы.	С замечанием согласна.
От Шарапова М.Г., доктора биологических наук, старшего научного сотрудника, руководителя Лаборатории ранней разработки биологических препаратов АО Р-	Текст диссертации содержит ряд опечаток, стилистических и грамматических погрешностей (например, «феомента», «опузоли», «внуклеточном», «плазмдами»,	С замечанием согласна.

Фарм (Московская область, г.о. Серпухов, г. Пушкино)	а также отдельные пропуски и повторы предлогов / союзов)	
	На ряде графиков (например, рисунки 18, 25) используется обозначение значимости «****», не определённое ни в подписях к рисункам, ни в разделе «Статистическая обработка данных», где приведена шкала лишь до «***» ($p < 0,001$).	С замечанием согласна. В подписях к рисункам следовало оставить только те расшифровки, которые на них встречаются. Во всей работе **** = $p < 0.0001$.
	Панель клеточных линий не является полностью единообразной на протяжении работы: если в разделах 3.1–3.4 используются три линии (Hek293T, Du145, 769p), то в разделах 3.5 и 3.6 исследование ограничено линиями Hek293T и 769p (для ChIP - только 769p) без подробного обоснования критериев выбора, помимо качественного указания на сходство Du145 и 769p в предыдущих экспериментах.	Сужение панели в разделе 3.5 обусловлено тем, что линия клеток Du145 склонна к развитию резистентности к доксорубицину (David-Beabes GL, Overman MJ, Petrofski JA, Campbell PA, de Marzo AM, Nelson WG. Doxorubicin-resistant variants of human prostate cancer cell lines DU 145, PC-3, PPC-1, and TSU-PR1: characterization of biochemical determinants of antineoplastic drug sensitivity. Int J Oncol. 2000 Dec;17(6):1077-86. doi: 10.3892/ijo.17.6.1077. PMID: 11078791. , Tatar C, Avci CB, Acikgoz E, Oktem G. Doxorubicin-induced senescence promotes resistance to cell death by modulating genes associated with apoptotic and necrotic pathways in prostate cancer DU145 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ cells. Biochem Biophys Res Commun. 2023 Nov 5;680:194-210. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.09.032. Epub 2023 Sep 16. PMID: 37748252.) В разделе 3.6. протокол отличался многоступенчатостью и включал ряд последовательных манипуляций каждая из которых сопряжена с риском частичной деградации образца. В связи с этим исследование было продолжено на модели с

		повышенным базальным уровнем CTSB, что позволило нивелировать потери образца.
	В разделе 1.1.1 и подписях к рисункам 1 и 2 для активного центра CTSB приводятся разные номера каталитических остатков (Cys25/His159 в тексте; Cys29 - в подписи к рисунку 1; Cys108/His278/Asn298 - в подписи к рисунку 2; Cys108 - для мутанта pSecTag2B-mutCTSB C108A в Таблице 7; Cys29 - при описании механизма действия PLVE). В тексте следовало привести пояснение нумерации остатков активного центра.	Разные номера каталитических остатков, возникли в результате использования разных систем нумерации для одной и той же молекулы. Я учту это на будущее и в дальнейшем буду дополнять тексты информацией о пересчете нумерации.
	В Таблице 7 описана плазмидная конструкция pSecTag2B-mutCTSB C108A, кодирующая каталитически неактивный мутант CTSB, однако в главе 3 результаты её использования не приводятся. Этот вопрос представляется тем более существенным, что в линии 769p трансфекция CTSB «дикого типа» сопровождается снижением уровня мРНК STFA (рисунок 12), тогда как на уровне белка в той же линии, напротив, наблюдается повышение STFA (рисунок 17), что автор объясняет возможным усилением трансляции. Не вступает ли это наблюдение в противоречие с выводом о том, что именно протеолитическая активность CTSB определяет уровень продукции STFA, и позволили бы данные по каталитически неактивному мутанту разрешить указанное противоречие? Использовалась ли конструкция C108A в каких-либо	Да, действительно, данная плазида упоминается в материалах и методах и отсутствует в результатах. Это моя невнимательность. Информация о работе с данной плазмидой не была представлена в тексте диссертационного исследования, однако в статье (Syrocheva AO, Ivanov KI, Laktyushkin VS, Gorokhovets NV, Parodi A, Zamyatnin AA Jr. Expression Interplay Between Cathepsin B and Its Natural Inhibitor Stefin A in Cancer and Embryonic Cell Lines. Cell Biol Int. 2025 doi: 10.1002/cbin.70077) мы показали, что в случае с каталитически неактивным CTSB уровень мРНК STFA в раковых клетках статистически не отличался от контроля, а уровень белка снижается.

	экспериментах, и если нет - планируется ли её применение в дальнейшем для разграничения каталитически зависимых и независимых функций CTSB в отношении STFA?	
	В разделе 2.2.6 описано последовательное иммуноцитохимическое окрашивание препаратов сначала на CTSB, затем на STFA с последующей оценкой колокализации. Оценивалась ли возможная перекрёстная реактивность вторичных антител между каналами и проводился ли для каждого канала контроль с исключением первичных антител?	Да, для каждой клеточной линии были приготовлены препараты без использования первичных антител, сигнал от вторичных антител не наблюдался. Перекрытие каналов было исключено на этапе настройки микроскопа: для настройки были использованы контрольные образцы с единичными флуорофорами, на основе которых выставили границы детекции таким образом, чтобы спектры излучения не перекрывались.
	В обсуждении результатов (с. 53) выдвигается гипотеза об ускоренной деградации мРНК STFA после трансфекции pCTSB, основанная на отсутствии AU-богатых элементов и предсказанных сайтов связывания miRNA в базе TargetScanHuman. Проводилась ли экспериментальная проверка стабильности транскрипта STFA (например, оценка периода его полураспада) для верификации данной гипотезы, либо она остаётся умозрительной?	Экспериментальная проверка стабильности транскрипта не проводилась, поэтому это остается на уровне гипотезы.
	Для количественной ПЦР в реальном времени в качестве референсного гена использовался только GAPDH. Учитывая, что экспрессия генов «домашнего хозяйства» может изменяться под действием	С замечанием согласна. В работе в качестве референса действительно использовался только GAPDH, как в экспериментах для оценки уровня экспрессии гена, так и для оценки экспрессии белка.

	химиотерапевтических агентов, рассматривалась ли возможность использования нескольких референсных генов для повышения надёжности нормализации данных, в особенности в экспериментах раздела 3.5?	Так как мишенью доксорубина в первую очередь является молекула ДНК, действительно, следует использовать несколько референсных генов для оценки экспрессии мРНК. Однако на данный момент не существует единого мнения о том, какие референсные гены использовать для определенных клеточных линий, поэтому в главе 3.5 не проводился qPCR анализ. Однако, в контексте изучения изменения экспрессии белков методом вестерн блот анализа, действительно, стоило использовать дополнительный референсный белок, например β-актин или α-тубулин.
	Использованный в разделе 3.4 ингибитор PLVE, согласно приведённым в главе 1 данным, действует на цистеиновые катепсины широкого спектра, а не избирательно на CTSB. Каким образом исключался возможный вклад других цистеиновых катепсинов (например, CTSL, CTSS) в наблюдаемое снижение уровня STFA?	Вклад других катепсинов не исключался, однако были проведены дополнительные эксперименты, не вошедшие в текст диссертационного исследования, которые показали, что в случае с каталитически неактивным CTSB уровень мРНК STFA в раковых клетках статистически не отличался от контроля, а уровень белка снижается. (Syrocheva AO, Ivanov KI, Laktyushkin VS, Gorokhovets NV, Parodi A, Zamyatnin AA Jr. Expression Interplay Between Cathepsin B and Its Natural Inhibitor Stefin A in Cancer and Embryonic Cell Lines. Cell Biol Int. 2025 doi: 10.1002/cbin.70077)
	В разделе 3.5 показано разнонаправленное изменение экспрессии CTSB и STFA при низкой дозе доксорубина в раковых (повышение) и нормальных (снижение) клетках, тогда как при высокой дозе	Данный дозозависимый характер клеточного ответа не противоречит модели, предложенной в разделах 3.1–3.2. В каждой отдельной линии сохраняется та же тенденция: снижение уровня экспрессии

	наблюдается снижение экспрессии в обеих линиях. Как данный дозозависимый и клеточно-специфичный характер ответа согласуется с моделью отрицательной обратной связи CTSB– STFA, предложенной в разделах 3.1–3.2?	CTSB всегда сопряжено с уменьшением уровня экспрессии STFA.
От Крицкой К.А. , кандидата биологических наук, научного сотрудника Института биофизики клетки Российской академии наук - обособленного подразделения Федерального исследовательского центра Российской академии Наук (ФИЦ ПНЦБИ РАН)	В тексте автореферата встречаются опечатки и технические неточности (например, в нумерации рисунок в разделе 3.6 в тексте упомянут Рисунок 27 при фактическом Рисунке 11; ряд орфографических погрешностей), которые желательно устранить при подготовке финальной версии.	С замечанием согласна.
	Хотелось бы уточнить, рассматривается ли автором конкретный молекулярный механизм, опосредующий снижение уровня мРНК STFA после трансфекции pCTSB, учитывая отмеченную в работе устойчивость транскрипта STFA к AU- и miR зависимой деградации.	Нет, в работе не рассматривался конкретный молекулярный механизм, опосредующий снижение уровня мРНК STFA после трансфекции pCTSB.

Обзор составлен Сырочевой А.О по отзывам, поступившим на дату 26.06.2026 г