

## **ОТЗЫВ**

члена диссертационного совета НТУ.1.5.3.11

Шарапова Марса Галиевича

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**

Онкологические заболевания остаются одной из ведущих причин смертности в мире, что обуславливает неослабевающий интерес исследователей к поиску новых молекулярных мишеней для диагностики и таргетной терапии злокачественных новообразований. Среди таких мишеней важное место занимают лизосомальные протеиназы – катепсины, в частности катепсин В (CTSB), участвующий в инвазии, эпителиально-мезенхимальном переходе, ангиогенезе и метастазировании опухолевых клеток за счёт деградации компонентов внеклеточного матрикса и активации каскада матриксных металлопротеиназ. Протеолитическая активность CTSB в клетке контролируется системой эндогенных ингибиторов – цистатинов, среди которых особое значение имеет стефин А (STFA). Несмотря на значительный объём накопленных данных о структуре и функциях CTSB и STFA по отдельности, закономерности их взаимной регуляции – прежде всего на уровне экспрессии, внутриклеточной локализации и поведения в условиях терапевтического воздействия – остаются изученными фрагментарно. В частности, вопрос о ядерной локализации STFA и возможном участии комплекса CTSB–STFA во взаимодействии с хроматином ранее в литературе практически не рассматривался. В этом контексте тема диссертации, посвящённая поиску и характеристике молекулярных механизмов взаимной регуляции экспрессии CTSB и STFA человека, представляется актуальной как с фундаментальной точки зрения – для понимания принципов организации систем «протеиназа–ингибитор» в норме и при злокачественной трансформации клеток, так и с прикладной точки зрения – в контексте поиска новых биомаркеров и мишеней противоопухолевой терапии. Таким образом, актуальность данной работы не вызывает сомнений.

### **Структура и содержание диссертационной работы**

Диссертация изложена на 110 страницах машинописного текста и включает оглавление, введение, обзор литературы (глава 1), главу «Материалы и методы» (глава 2), главу «Результаты и обсуждение» (глава 3), заключение, выводы, список сокращений и список литературы из 172 источников; работа иллюстрирована 32 рисунками и содержит 8 таблиц. Заявленные количественные параметры работы (объём, число рисунков, таблиц и литературных источников) подтверждаются при их подсчёте и соответствуют действительности.

Введение содержит все элементы, традиционно характеризующие квалификационную работу подобного рода: обоснование актуальности и степени разработанности темы, цель и пять задач исследования, положения научной новизны, теоретическую и практическую значимость, сведения о методологии и методах, четыре положения, выносимые на защиту, сведения о степени достоверности и апробации результатов (5 публикаций в журналах, индексируемых Web of Science и Scopus, рекомендованных ВАК Минобрнауки России), описание личного вклада автора и сведения о структуре и объеме работы.

Глава 1 «Обзор литературы» (с. 11–39) последовательно раскрывает общие представления о цистеиновых катепсинах, структуру и биосинтез CTSB, его функции в норме и при злокачественной трансформации клеток, многоуровневую систему регуляции его продукции (эпигенетическую, транскрипционную, посттранскрипционную, трансляционную и посттрансляционную), регуляцию его активности цистатинами, в том числе стефином А, а также влияние химиотерапевтического воздействия (на примере доксорубицина) на экспрессию CTSB. Обзор написан на хорошем уровне, опирается на актуальные литературные источники и логично подводит к формулировке задач исследования.

Глава 2 «Материалы и методы» (с. 40–51) детально описывает использованные клеточные линии (Hek293T, Du145, 769p), плазмидные конструкции (7 типов, включая конструкции для сверхэкспрессии, нокдауна посредством shRNA и создания каталитически неактивного мутанта CTSB), а также основные экспериментальные методы – трансформацию и трансфекцию, ОТ-ПЦР в реальном времени, электрофорез белков и вестерн-блоттинг, иммуноцитохимическое окрашивание с конфокальной микроскопией, МТТ-тест и иммунопреципитацию хроматина (ChIP). Методическая часть изложена с достаточной детализацией, что в целом должно обеспечить воспроизводимость представленных экспериментов.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» (с. 52–89) построена по логичному и последовательному плану: от анализа корреляции экспрессии генов CTSB и STFA на уровне мРНК (раздел 3.1) и белка (3.2) – через изучение их субклеточной локализации и колокализации (3.3) – к доказательству зависимости продукции STFA от протеолитической активности CTSB (3.4), исследованию влияния доксорубицина на ось CTSB–STFA (3.5) и, наконец, к демонстрации взаимодействия ядерных форм CTSB и STFA с гистоном H3 (3.6). Такая структура отражает последовательное развитие гипотезы исследования и органично подводит к итоговым выводам.

Заключение и выводы (4 пункта) логично обобщают результаты, соответствуют положениям, выносимым на защиту, и не содержат противоречий с основным текстом диссертации.

В целом структура диссертации отвечает требованиям, предъявляемым к квалификационным работам данного уровня, является логически выстроенной и обеспечивает последовательное раскрытие темы исследования.

## **Научная новизна результатов диссертационной работы**

К числу научных результатов, обладающих признаками новизны, можно отнести следующие.

Во-первых, в работе впервые на нескольких клеточных линиях (нетрансформированной Нек293Т и опухолевых Du145, 769р) показана статистически значимая взаимосвязь между уровнями экспрессии CTSB и STFA как на уровне мРНК, так и на уровне белка, при этом выявлены признаки разнонаправленной, реципрокной регуляции, согласующиеся с моделью отрицательной обратной связи.

Во-вторых, с использованием конфокальной микроскопии впервые продемонстрирована ядерная локализация белка STFA, ранее в литературе не описанная, а также показана колокализация CTSB и STFA как в цитоплазматическом, так и в ядерном компартментах с количественной оценкой посредством коэффициента Мандера.

В-третьих, с применением независимых экспериментальных подходов – пептидного ингибитора цистеиновых катепсинов PLVE и плазмидной конструкции для нокдауна CTSB – показано, что именно протеолитически активная форма CTSB необходима для поддержания нормального уровня продукции STFA, что описывает ранее не охарактеризованный регуляторный механизм.

В-четвёртых, впервые исследовано дозозависимое влияние доксорубина на ось CTSB–STFA в сопоставлении нормальных и опухолевых клеток, выявлены различия в характере ответа между клеточными линиями.

В-пятых, методом иммунопреципитации хроматина с последующим вестерн-блот анализом впервые показано, что ядерные формы CTSB и STFA способны образовывать комплексы с гистоном H3, что открывает новое направление в изучении ядерных функций данной протеиназно-ингибиторной пары.

Совокупность перечисленных результатов обладает достаточными признаками научной новизны для диссертационного исследования, поскольку расширяет существующие представления о механизмах регуляции системы CTSB–STFA и впервые описывает ряд её ранее неизвестных аспектов, прежде всего связанных с ядерной локализацией STFA и его взаимодействием с хроматином.

## **Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы**

Теоретическая значимость работы заключается в углублении представлений о принципах взаимной регуляции протеиназы и её эндогенного ингибитора, в том числе о возможном существовании петли отрицательной обратной связи в системе CTSB–STFA, а также о её клеточно-специфических особенностях в нормальных и трансформированных клетках. Полученные данные о ядерной локализации STFA и взаимодействии комплекса CTSB–STFA с гистоном H3 вносят вклад в формирующееся

в последние годы направление, связанное с изучением непротеолитических и эпигенетических функций лизосомальных протеиназ и их ингибиторов.

Практическая значимость, заявленная автором, связана с перспективой использования соотношения CTSB/STFA в качестве потенциального прогностического биомаркера ответа опухоли на терапию, а также с возможностью разработки комбинированных терапевтических стратегий, основанных на модуляции данной регуляторной оси. Следует отметить, что на сегодняшний день данные практические предложения носят преимущественно концептуальный характер и подкреплены результатами, полученными исключительно на иммортализованных клеточных линиях *in vitro*; их клиническая применимость потребует дальнейшей валидации. Тем не менее в качестве задела для последующих исследований полученные результаты представляют несомненный интерес.

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

Научные положения и выводы диссертации в целом обоснованы результатами, полученными с использованием современных и адекватных задачам исследования молекулярно-биологических, биохимических и микроскопических методов: количественной ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинга, иммуоцитохимического окрашивания с конфокальной микроскопией и количественным анализом колокализации, МТТ-теста и иммунопреципитации хроматина. Существенным достоинством работы является использование взаимодополняющих экспериментальных подходов – сверхэкспрессии, нокдауна с помощью shRNA и фармакологического ингибирования, – дающих согласующиеся между собой результаты (например, сопоставимое снижение уровня мРНК STFA при нокдауне CTSB плазмидой pShCTSB и при обработке клеток ингибитором PLVE, разделы 3.1 и 3.4), что повышает надёжность сделанных заключений. Эксперименты выполнены с соблюдением принципа биологической повторности (как правило, 3 биологических повтора) и сопровождаются статистической обработкой данных.

Вместе с тем ряд выводов, прежде всего касающихся конкретного молекулярного механизма выявленной взаимосвязи (транскрипционная природа регуляции, механизм «отрицательной обратной связи», функциональное значение комплекса CTSB–STFA–гистон H3), в значительной степени опирается на корреляционные данные и интерпретируется на уровне рабочей гипотезы. Это не снижает ценности полученных экспериментальных данных как таковых, однако требует определённой осторожности при формулировке итоговых выводов и является закономерным направлением дальнейших исследований.

### **Соответствие автореферата основному содержанию диссертации**

Автореферат в целом соответствует содержанию диссертационной работы. Цели, задачи, основные положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая

значимость в автореферате изложены последовательно и согласуются с текстом диссертации.

### **Оценка диссертационного исследования**

В целом диссертационная работа Сырочевой А.О. представляет собой самостоятельное, методически грамотно выполненное экспериментальное исследование, посвящённое актуальной и недостаточно изученной проблеме взаимной регуляции экспрессии катепсина В и его эндогенного ингибитора стефина А. Работа отличается логичной структурой, последовательным изложением материала, использованием комплекса современных методов молекулярной и клеточной биологии и получением ряда оригинальных результатов, в том числе данных о ядерной локализации STFА и его взаимодействии с хроматином, ранее не описанных в литературе.

Результаты исследования апробированы в 5 публикациях в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, что свидетельствует о признании полученных данных научным сообществом. Отмеченные ниже замечания носят преимущественно частный, методический и редакционный характер и не ставят под сомнение общую научную состоятельность и значимость выполненной работы.

### **Замечания по диссертации**

При в целом положительной оценке диссертации необходимо отметить ряд замечаний методического, редакционного и дискуссионного характера.


1. Текст диссертации содержит ряд опечаток, стилистических и грамматических погрешностей (например, «феомента», «опузоли», «внуклеточном», «плазмдами», а также отдельные пропуски и повторы предлогов / союзов).
2. 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 «\*\*\*\*» ( $p < 0,001$ ).
3. 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.
4. 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.

5. 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 экспериментах, и если нет - планируется ли её применение в дальнейшем для разграничения каталитически зависимых и независимых функций CTSB в отношении STFA?
6. 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?
7. 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?
8. Для количественной ПЦР в реальном времени в качестве референсного гена использовался только GAPDH. Учитывая, что экспрессия генов «домашнего хозяйства» может изменяться под действием химиотерапевтических агентов, рассматривалась ли возможность использования нескольких референсных генов для повышения надёжности нормализации данных, в особенности в экспериментах раздела 3.5?
9. Используемый 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?
10. 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 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?

**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 НТУ.1.5.3.11  
доктор биологических наук, ведущий  
научный сотрудник лаборатории  
Механизмов редокс-регуляции клеточных  
процессов, Института биофизики клетки  
РАН (ФИЦ ПНЦБИ РАН)  
19.06.2026

  
(подпись)

Шарапов М. Г.

**Сведения:**

Шарапов Марс Галиевич  
докторская диссертация защищена по специальностям:  
1.5.2 Биофизика, 1.5.3 Молекулярная биология.  
Института биофизики клетки РАН (ФИЦ ПНЦБИ РАН),  
142290, г. Пущино Московская область, ул. Институтская, 3,  
+79164226880,  
[sharapov-mg@pbcras.ru](mailto:sharapov-mg@pbcras.ru)

Подпись д.б.н. Шарапова М.Г. заверяю  
Ученый секретарь Института биофизики клетки РАН, обособленного подразделения  
«Федерального исследовательского центра «Пущинского научного центра  
биологических исследований Российской академии наук»

кандидат биологических наук  Шавкунов К.С.

19.06.2026

