

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н. Колпакова Федора Анатольевича
на диссертационную работу Арзуманян Виктории Арменовны
«Молекулярный профиль опухолевой клеточной линии HepG2»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.8. – Математическая биология, биоинформатика

Актуальность темы исследования

В работе Арзуманян В.А. внимание уделяется молекулярной гетерогенности клеточной линии HepG2, которая крайне востребована в фармакологических и токсикологических исследованиях и является четвертой по популярности клеточной культурой, согласно количеству упоминаний в базе данных PubMed. Цель своей работы автор обосновывает опубликованным данным по исследованию образцов из разных лабораторий одной клеточной линии, где на основании значительных различий в их молекулярных профилях выделяют подтипы клеток. Данный факт требует рассмотрения вопроса стабильности на молекулярном уровне используемых клеточных линий для корректного использования их в исследованиях, а также интерпретации полученных и получаемых данных. Анализ молекулярного профиля клеточной линии HepG2, как основной модели гепатоцитов, поможет улучшить точность и интерпретацию результатов, а также повысить качество биомедицинских исследований.

Структура диссертационной работы

Текст диссертации составляет 184 страницы машинописного формата и включает в себя 11 таблиц и 34 рисунка. Работа структурирована следующим образом: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты с их обсуждением, заключение и выводы. Кроме того, текст содержит разделы «Список сокращений», «Словарь терминов», «Список литературы», «Благодарности» и 9 приложений. В списке литературы приведено 301 источник, включая самые современные публикации.

Характеристика диссертации

В разделе «Обзор литературы» автор рассматривает ключевые методы омикс-профилирования, включая секвенирование нового поколения, микрочипы и масс-спектрометрию. Описаны подходы к обработке данных и алгоритмы интеграции мульти-омных данных. Автор также акцентирует внимание на клеточных моделях печени и их роли в исследовании. В заключительных разделах работы проводится сравнительный анализ геномных, транскриптомных и протеомных характеристик клеток HepG2, нормальных гепатоцитов, гепатобластомы и гепатоцеллюлярной

карциномы. На основе анализа литературы автор выделяет 102 гена, которые могут быть использованы как маркеры рака печени в диагностике и терапии. Надо отметить, что часть данной работы в рамках опубликованного автором и его коллегами обзора по применимости HepG2 в качестве модели нормальных гепатоцитов и раковых клеток, получила большой отклик среди исследователей.

В разделе «Материалы и методы» автор подробно объясняет, какие данные и методы были использованы в исследовании. В разделе приведены ссылки на необработанные данные в базе NCBI SRA, включая как собственные, так и опубликованные данные. Далее автор описывает детали биоинформатического анализа, охватывая полногеномное, эпигеномное, транскриптомное и транслятомное секвенирование. В разделе также представлены методы протеомного профилирования и обработки данных. Завершающая часть посвящена статистическому анализу и визуализации данных. Описание методов достаточно подробное, чтобы другие исследователи могли воспроизвести эксперимент.

Раздел «Результаты и их обсуждение» диссертационной работы Арзуманян Виктории Арменовны представляет собой тщательно проработанный и логично структурированный анализ результатов исследования. Работа охватывает ключевые аспекты молекулярного профиля клеточной линии HepG2, включая геномные, эпигеномные, транскриптомные, эпитранскриптомные, транслятомные и протеомные уровни.

Особое внимание уделено изучению хромосомных aberrаций, характерных для линии HepG2. Среди наиболее значимых изменений выявлены транслокация между 1p и 21p, трисомии хромосом 2, 6, 17 и тетрасомия хромосомы 20. Также обнаружены частичные делеции, такие как утрата q12 на 9-й хромосоме и короткие плечи SAT-хромосом (13, 14, 15, 21, 22). Эти результаты, подтвержденные данными цитогенетического анализа и полногеномного секвенирования, дают точное представление о генетической специфике линии HepG2.

Анализ транскриптомного профиля выявил высокую корреляцию экспрессии генов и транскриптов, что подтверждает молекулярное сходство образцов. В то же время иерархическая кластеризация показала различия, обусловленные географической принадлежностью: один кластер включал образцы из Китая и Израиля, а другой — из США, Японии, Южной Кореи, Турции, Колумбии, Италии, Китая и России. Эти кластеры различались путями, связанными с метаболизмом, такими как окисление через цитохром P450 и биотрансформация в фазах I и II. Филогенетический анализ подтвердил эволюционные связи между образцами, демонстрируя географическую вариабельность.

Анализ копийности генов показал важную роль структурных вариантов генома в молекулярных и клеточных процессах. Автор сопоставил данные о копийности генов с уровнями их метилирования и экспрессии. Выявлен эпигенетический механизм компенсации для генов с копийностью 2,5, который, вероятно, поддерживает стабильность клеточных функций.

Далее в работе сопоставляется копияность генов и уровень их экспрессии. В результате выявлена слабая корреляция, однако при увеличении копияности вдвое возрастает доля генов со средней и высокой экспрессией. Автором также обнаружено, что гены с м6А-модификациями имеют более низкий уровень трансляции, несмотря на высокий уровень экспрессии на уровне мРНК, связанных с фолдингом белков. Этот вывод демонстрирует значимость эпитранскриптного уровня в регуляции функциональной активности генов.

В работе также проведено сравнение культуры клеток HepG2 с линиями Huh7 и Hep3B, которое выявило общие хромосомные аномалии, включая трисомии хромосом 2 и 6. На транскриптном уровне эти линии формируют один кластер по сравнению с клетками иной природы. Сравнение HepG2 с первичными гепатоцитами показало высокий уровень корреляции на геномном уровне, однако выявило важные различия. Например, снижена экспрессия генов метаболизма стероидов и повышена экспрессия онкогенов.

Автор исследовал характеристики 102 потенциальных маркеров рака печени на геномном, эпигеномном, транскриптном, трансляционном и протеомном уровнях в клеточной линии HepG2, выделив их на основе анализа литературных данных. Для повышения полноты исследования целесообразно рассмотреть влияние выявленных генетических вариаций на функциональные свойства клеток. Также рекомендуется проводить сравнение HepG2 с первичными гепатоцитами не только на транскриптном уровне, но и на всех уровнях реализации генетической информации.

В завершение работы представлены выводы, подкрепленные результатами исследования. Основные итоги изложены в разделах «Заключение» и «Выводы». Также добавлены вспомогательные разделы, включая «Список сокращений» и «Словарь терминов».

Обоснованность научных выводов и положений

Объем проведенных экспериментов является достаточным для получения статистически достоверных результатов, а сформулированные выводы полностью соответствуют полученным данным. Обоснованность научных положений и выводов подтверждается публикацией результатов работы в восьми рецензируемых международных и отечественных научных журналах, а также их представлением на ряде научных конференций, включая международную. Арзуманян В.А. является первым автором четырех статей, опубликованных в англоязычных международных журналах уровня Q1, посвященных теме диссертации, что подтверждает ее ключевой вклад в исследование и дальнейшее развитие данной научной работы.

Автореферат и опубликованные работы достаточно полно отражают основное содержание диссертации и характеризуют результаты проведенных исследований. Название и содержание диссертации по объекту и методам исследования полностью соответствует специальности 1.5.8. – Математическая биология, биоинформатика.

Вопросы и замечания

1. Список литературы оформлен не по правилам соответствующего ГОСТ. Для многих публикаций не приведен год.
2. Раздел "1.4. Базы данных" очень короткий и неполный, всего пол-страницы.
3. Нет заключения по обзору литературы.
4. При поиске в базах данных необходимо везде приводить используемые запросы, чтобы результаты исследования были воспроизводимыми. В работе же запрос приведен только в разделе "2.2.2. Опубликованные данные".
5. Для анализа RNA-seq клеточной линии HepG2 было отобрано 40 экспериментов из SRA. На мой взгляд, таких экспериментов должно быть больше, поиск "HepG2 rna-seq" в SRA дает 16 000+ результатов.
6. Описание методов "2.3. Анализ данных секвенирования нового поколения" приведен очень кратко. Рекомендуется использовать сценарии на языках NextFlow, WDL и т.п., чтобы формально описать и сделать воспроизводимыми результаты исследования.
7. Для ряда участков генома HepG2 копийность была определена равной 2.5. Как это может быть с физической точки зрения?
8. На основе данных RNA-seq в диссертации определяется уровень экспрессии не только отдельных генов, но и уровень экспрессии разных транскриптов для одного генов. Оценивались ли автором доверительные интервалы для определения уровня экспрессии для разных транскриптов одного гена? Возможно более низкий уровень гомогенности между образцами на уровне экспрессии транскриптов связан с погрешностями в определении уровня экспрессии транскриптов для одного и того же гена.
9. На рисунке 17 приведено филогенетическое дерево линий HepG2. Видно четкое разделение на 2 кластера, однако внутри кластеров не видно никакого дальнейшего разделения клеточных линий на подкластеры, что является странным.
10. Отдельные замечания по тексту диссертации:
стр. 5.
На настоящий момент существует 1 970 клеточных линий человека (в соответствии с биобанком ATCC), полученных как из опухолевых, так и нормальных клеток.

Клеточных линий человека существует гораздо больше. Например в Cellosaurus (<https://www.cellosaurus.org>) их описано 119 920.

стр. 10.

На момент написания обзора известно около 25 видов омикс-данных
Хорошо было бы их перечислить или сослаться на соответствующую публикацию, чтобы понимать, что сюда относит автор.

стр. 11

Секвенирование полупроводников (Ion Torrent) применяет полупроводниковые сенсоры

Очень странная терминология.

стр. 13

Исследование транслирующей мРНК

Неправильная терминология.

стр. 20

Большинство изменений в ДНК не влияют на генетическую структуру

Не понятно, что здесь обозначает генетическая структура.

стр. 32

Клетки НерG2 могут иметь от трех до семи ядер [149],

В приведенной ссылке исследуются слияние клеток НерG2 и клеток мезенхимы крысы.
3-7 ядер или ядрышек?

стр. 53

2.1.2.3. Клеточные линии другой природы

Чем был обусловлен выбор именно 10 приведенных клеточных линий?

стр. 79

выявлено метилирование 44% последовательности генома

Имеется ввиду 44% от всех CpG пар в геноме?

Замечания, вопросы и комментарии, высказанные к работе, не оказывают влияния на общую высокую оценку и не снижают значимость выполненной работы.

Диссертационная работа Арзумянн Виктории Арменовны «Молекулярный профиль опухолевой клеточной линии НерG2» представляет собой завершенное научное исследование, выполненное на высоком методическом уровне. Работа соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842 (в ред. с последующими изменениями). Автор диссертации, Арзумянн Виктория

Арменовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. — «Математическая биология, биоинформатика».

Официальный оппонент:

Колпаков Федор Анатольевич, доктор биологических наук, Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, научный руководитель направления «Вычислительная биология». Федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., д. 1, 354340, Российская Федерация, Краснодарский край. Email: kolpakov.fa@talantiuspeh.ru, телефон - 8 913 943 1649.



Колпаков Федор Анатольевич
29.01.2025

(Специальность 1.5.8. - Математическая биология, биоинформатика)

Подпись Колпакова Ф.А. заверяю

Председатель Ученого совета,
директор Научного центра
трансляционной медицины



Иванов Р.А.