



«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора ИОГен РАН д.б.н.

Мисюрин Андрей Витальевич

«28» января 2025 года

Отзыв ведущей организации
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

Современные достижения в области высокопроизводительных технологий способствовали получению огромного массива данных, которые требуют систематизации и всестороннего анализа для выявления взаимосвязей между различными биологическими уровнями. Существующие подходы при этом не позволяют полностью преодолеть ограничения в понимании сложных биологических процессов, что подчеркивает важность разработки интегрированных подходов для обработки и интерпретации мультиомных данных.

Диссертация Арзуманян Виктории Арменовны посвящена исследованию молекулярного профиля клеточной линии HepG2, которая занимает лидирующее место среди клеточных культур, применяемых в фармакологических и токсикологических исследованиях. Автор обосновывает цель своей работы опубликованными данными, которые демонстрируют значительные различия в молекулярных профилях образцов одной клеточной линии, полученных из разных лабораторий, что позволяет выделить её подтипы. Этот факт подчёркивает необходимость пересмотра вопросов стабильности клеточных линий на молекулярном уровне для их корректного применения в исследованиях и достоверной интерпретации результатов. Исследование молекулярного профиля клеточной линии HepG2, которая широко используется как модель гепатоцитов и гепатобластомы, направлено на повышение точности интерпретации данных и оптимизацию качества биомедицинских исследований.

Научная новизна работы

Впервые в рамках данной работы был создан комплексный молекулярный портрет опухолевой клеточной линии HepG2, основанный на данных широкомасштабного анализа генома, метилома, транскриптома и протеома. Полученные результаты обеспечивают более точное и корректное применение этой клеточной линии в исследованиях, а также способствуют минимизации ошибок при интерпретации экспериментальных данных.

Личный вклад автора

Автор разработал методологические подходы для анализа и обработки данных молекулярного профилирования, полученных в рамках проектов ИБМХ и опубликованных в открытом доступе. Он самостоятельно осуществил поиск и биоинформатический анализ необработанных данных, применяя интеграционные протоколы и современные алгоритмы, а

также провёл статистическую обработку и визуализацию результатов. Кроме того, автор осуществил поиск и анализ научных публикаций, которые легли в основу литературного обзора и интерпретации полученных результатов.

Рекомендации по использованию результатов работы и выводов диссертации

Результаты диссертационной работы представляют собой научный вклад, который имеет как фундаментальное, так и прикладное значение. В ходе работы автором выявлены стабильные хромосомные aberrации клеточной линии HepG2, такие как транслокация между короткими плечами 1 и 21 хромосом и частичная трисомия 6, 16 и 17 хромосом, и тетрасомия 20 хромосомы. Была составлена детализированная карта молекулярного профиля клеточной линии HepG2, включающая информацию о копийности генов, их экспрессии на транскриптомном и транслятомном уровне, и представленность белков. В результате клеточная линия демонстрирует стабильность на уровне генома и вариативность на уровне протеома.

Выводы диссертационной работы углубляют понимание молекулярной специфики клеточной линии HepG2 и вносят значительный вклад в повышение воспроизводимости экспериментов с её использованием. Разработанные молекулярные карты наглядно отражают взаимосвязи между различными омикс-уровнями и предоставляют возможность системной оценки клеточной линии, что ранее не осуществлялось в таком широком масштабе. Более того, предложенные подходы могут быть адаптированы для исследования других клеточных линий, что открывает новые перспективы для системной биологии и мультиомных исследований.

Материалы диссертации также могут найти широкое применение в образовательных программах, направленных на подготовку специалистов в областях молекулярной биологии, онкологии и биомедицинских исследований. В рамках таких программ возможно рассмотрение разделов, посвящённых биоинформатике и системной биологии. Учебные и научные учреждения, такие как РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, МГУ им. М.В. Ломоносова, ФНКЦ ФХМ ФМБА, Институт медико-биологических проблем РАН, ИБХ им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, а также другие ведущие научные и клинические организации могут использовать эти материалы для подготовки будущих специалистов и проведения передовых исследований.

Структура и оформление диссертации

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 приведен 301 источник.

В разделе «Обзор литературы» автор подробно рассматривает современные подходы к изучению омикс-профилирования, фокусируясь на его методах и применении в исследованиях клеточных линий печени. В первой части раздела представлены ключевые технологии омикс-исследований, такие как секвенирование нового поколения (NGS), микрочипы и масс-спектрометрия. Автор раскрывает особенности каждого метода, включая

их технические характеристики, области применения, преимущества и ограничения, а также приводит примеры успешного использования в биомедицинских исследованиях. Далее рассматриваются методы обработки данных, включая биоинформатические подходы к анализу данных и интеграцию мультиомной информации.

Автор отдельно обсуждает источники гетерогенности генетической информации, связанные с биологической вариабельностью, техническими ошибками и экспериментальными ограничениями, указывая их влияние на интерпретацию данных. Важным разделом является анализ клеточных линий, в частности HepG2 и других печеночных моделей, с упором на их использование в изучении молекулярных механизмов рака печени.

Заключительные разделы посвящены сравнению различных типов рака печени, включая анализ клеток HepG2, нормальных гепатоцитов, гепатобластомы и гепатоцеллюлярной карциномы. Автор проводит сравнение на уровнях генома, транскриптома и протеома, выделяя ключевые отличия в молекулярных профилях. На основании анализа литературы были идентифицированы 102 потенциальных гена-маркера рака печени, которые представляют интерес для дальнейших исследований в области диагностики и терапии.

Обзор демонстрирует глубокое понимание современных технологий, их применения и интеграции, а также способность автора анализировать и обобщать данные на мировом уровне исследований в данной области.

В разделе «Материалы и методы» автор подробно описывает использованные данные и методологию исследования. Приведены ссылки на необработанные данные, размещённые в базе NCBI SRA, которые включают как собственные результаты, так и данные, опубликованные другими исследователями. Автор детально рассматривает биоинформатические подходы, применённые для анализа полногеномного, эпигеномного, транскриптомного и транслятомного секвенирования. Также описаны методы протеомного профилирования и обработки данных. Завершающая часть раздела посвящена методам статистической обработки и визуализации. Предоставленные описания достаточно полные, чтобы обеспечить воспроизводимость экспериментов другими исследователями.

Глава «Результаты и их обсуждение» содержит всесторонний и структурированный анализ данных, полученных в ходе исследования. Работа охватывает все основные аспекты молекулярного профиля клеточной линии HepG2, включая геномные, эпигеномные, транскриптомные, эпитранскриптомные, транслятомные и протеомные уровни.

Особое внимание уделено изучению хромосомных аномалий, характерных для HepG2. Среди ключевых изменений были выявлены транслокация между короткими плечами хромосом 1 и 21, трисомии 2, 6 и 17 хромосом, а также тетрасомия 20-й хромосомы. Были также обнаружены частичные утраты, включая делецию q12 на 9-й хромосоме и утрату коротких плеч хромосом 13, 14, 15, 21 и 22. Эти данные, подтверждённые результатами цитогенетического анализа и полногеномного секвенирования, предоставляют детализированное представление о генетических особенностях HepG2.

Анализ транскриптомного профиля выявил высокую степень согласованности экспрессии генов и транскриптов, что свидетельствует о молекулярной однородности образцов. Однако иерархическая кластеризация продемонстрировала различия, обусловленные географическим происхождением образцов: один кластер объединял образцы из Китая и Израиля, а другой — из США, Японии, Южной Кореи, Турции, Колумбии, Италии и России. Эти кластеры различались по путям, связанным с метаболическими процессами, такими как окисление через цитохром P450 и биотрансформация фаз I и II. Филогенетический анализ подтвердил эволюционные различия между образцами, подчёркивая географическое разнообразие.

Изучение копияности генов показало важную роль структурных геномных изменений в молекулярных и клеточных процессах. Автор сопоставил данные о копияности с уровнями метилирования и экспрессии генов, выявив эпигенетический механизм компенсации для генов с копияностью 2,5, который, вероятно, стабилизирует клеточные функции. Однако для окончательных выводов требуются дополнительные исследования. Анализ взаимосвязи копияности и экспрессии генов выявил слабую корреляцию, но при увеличении числа копий наблюдается рост доли генов со средней и высокой экспрессией.

Дополнительно проведено сравнение клеточной линии HepG2 с линиями Huh7 и Hep3B. Обнаружены общие хромосомные аномалии, такие как трисомии 2-й и 6-й хромосом. На транскриптомном уровне печеночные линии образуют отдельный кластер по сравнению с клетками другой природы. Все три печёночные клеточные линии автор сравнил с первичными гепатоцитами на транскриптомном уровне. В результате были выявлены значительные различия в экспрессии генов, связанных с метаболизмом стероидов и ксенобиотиков, а также повышенная экспрессия онкогенов в клеточных линиях. Автор также проанализировал 102 гена, потенциально являющихся маркерами рака печени, на различных молекулярных уровнях. Эти гены были выделены на основе литературных данных.

В заключении автор представляет визуализацию молекулярной карты клеточной линии HepG2, охватывающей весь геном. Также для каждой хромосомы выполнена визуализация всех изученных омикс-уровней, включая графики и краткие описания, которые подробно изложены в приложении 9. Дополнительно работа включает вспомогательные материалы, такие как «Список сокращений» и «Словарь терминов», что повышает её доступность и удобство для читателей.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Результаты проведённых экспериментов являются статистически значимыми, а сделанные выводы полностью соответствуют полученным данным. Научные положения и выводы имеют обоснование, что подтверждается публикацией работы в восьми рецензируемых научных журналах, как отечественных, так и международных. Результаты также были представлены на нескольких научных конференциях, в том числе международных. Особо стоит подчеркнуть, что Арзуманян В.А. является первым автором четырёх статей, опубликованных в англоязычных журналах уровня Q1 (по данным SJR), что подтверждает её значительный вклад в исследование и дальнейшее развитие работы. Следует отметить, что статья с первым авторством «The Curious Case of the HepG2 Cell Line:

40 Years of Expertise» (Arzumanyan et al, 2021), посвящённая применению клеточной линии HepG2 в качестве модели нормальных гепатоцитов и раковых клеток, вызвала значительный интерес среди исследователей. На январь 2025 года она имеет более 200 цитирований.

Автореферат и опубликованные статьи в полной мере отражают ключевые результаты исследования и содержание диссертации. Тема и методы исследования, изложенные в диссертации, соответствуют специальности 1.5.8. – Математическая биология, биоинформатика.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Диссертационная работа очень хорошо оформлена, особенно следует отметить тщательное выполнение рисунков. Наиболее интересным вопросом является происхождение вариаций копийности, отмеченное в работе. В последнее время становится очень популярным исследование внехромосомной циркулярной ДНК, не могут ли быть отмеченные вариации копийности на самом деле являться примером такой ДНК? Хотелось бы услышать комментарии диссертанта по этому поводу. На рисунке 28 выделяются два кластера образцов, включающих в себя как HepG2 так и Huh7. Проверяли ли авторы не является ли такое поведение результатом разных протоколов выделения мРНК (например PolyA обратная транскрипция и рРНК деплеция)? Как диссертант объясняет большую разницу для клеток НАСАТ на уровне экспрессии генов и транскриптов (панели 1 и 2 рис. 28)? Все эти замечания являются скорее вопросами для дальнейшего исследования, и не сказываются на высоком уровне работы.

Заключение

Диссертационная работа Арзуманян Виктории Арменовны «Молекулярный профиль опухолевой клеточной линии HepG2» представляет собой завершённое 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, Арзуманян Виктория Арменовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. — Математическая биология, биоинформатика.

Отзыв обсужден и одобрен на межлабораторном семинаре ИОГен РАН от 15 января 2025 года, протокол №.1

Отзыв составил заведующий лабораторией
системной биологии и вычислительной генетики
ИОГен РАН, д.ф.-м.н., член-корреспондент РАН

Макеев Всеволод Юрьевич

Подпись Макеева В.Ю. заверяю:
Ученый секретарь ИОГен РАН,
д.б.н.

Горячева Ирина Игоревна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им.
Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН).

Адрес: 119991, Москва, ул. Губкина, д. 3

Телефон: +7 (499) 135-62-13

Электронная почта организации: iogen@vigg.ru

Официальный сайт организации: www.vigg.ru