

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента Буздина Антона Александровича  
на диссертационную работу Зориной Елены Сергеевны  
«Протеоформное профилирование ткани печени в норме и при  
гепатоцеллюлярном раке с использованием двумерного гель-  
электрофореза и масс-спектрометрии», представленную на соискание  
ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. –  
«Биохимия»**

**Актуальность исследования.** Диссертационная работа представляет собой значимое исследование в области биохимии, посвящённое изучению протеоформ печени человека в норме и при гепатоцеллюлярном раке (ГЦР). Тема исследования является актуальной, поскольку гепатоцеллюлярный рак (ГЦР) занимает лидирующие позиции среди причин онкологической смертности. Несмотря на существование маркеров ГЦР, таких как альфа-фетопротеин (АФП), их чувствительность и специфичность недостаточны для ранней диагностики и прогноза заболевания. Особый интерес представляют протеоформы – различные варианты белков, возникающие в результате альтернативного сплайсинга, мутаций и посттрансляционных модификаций (ПТМ), которые могут играть ключевую роль в развитии и прогрессировании раковых заболеваний. Использование комбинации протеомных методов позволяет детализировать изменения на уровне протеоформ и выявить их диагностический потенциал. Таким образом, работа направлена на решение одной из актуальных задач современной биохимии – поиск белковых сигнатур, характерных для ГЦР.

**Структура и содержание диссертационной работы.** Диссертация изложена на 126 страницах, содержит 9 таблиц и 26 рисунков, и 5 приложений. Работа структурирована и включает все необходимые элементы научного исследования: введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы и приложения. Библиографический список включает 158 источников.

В главе «Обзор литературы» представлен подробный анализ современных исследований в области протеомики, с акцентом на протеоформы белков и их значимость при заболеваниях, включая рак. Автор рассматривает роль посттрансляционных модификаций в разнообразии белков и подробно описывает протеом печени человека как один из

ключевых объектов исследования. Отдельное внимание уделено изучению транскриптомных изменений при ГЦР и их интеграции с протеомными данными для поиска биомаркеров. Рассмотрены современные методы диагностики рака печени, включая молекулярные и генетические маркеры. Описаны основные методы изучения белков, такие как двумерный гель-электрофорез и масс-спектрометрия, с акцентом на их преимущества и ограничения в контексте исследования протеоформ.

Методология исследования обоснована и соответствует современным требованиям к протеомным исследованиям. Подробно представлены методы подготовки образцов, включая экстракцию белков и их фракционирование. Особое внимание уделено применению двумерного гель-электрофореза (2DE) для разделения белков по изоэлектрическим точкам и молекулярным массам, а также масс-спектрометрическому анализу с использованием жидкостной хроматографии и ионизации распылением (LC-ESI-MS/MS). Описаны процедуры биоинформатической обработки данных, нормализации и функциональной аннотации белков. Для повышения достоверности результатов использованы современные статистические методы обработки данных.

В главе «Результаты и обсуждение» автор представляет результаты протеомного профилирования нормальной ткани печени, клеточной линии HepG2 и опухолевых образцов пациентов с ГЦР. Продемонстрировано, что секционное протеомное профилирование позволяет выявить значительно большее количество белков и их протеоформ по сравнению с традиционным панорамным анализом. В работе описаны различия в протеоформных паттернах между нормальными и опухолевыми тканями печени, что позволило выявить потенциальные биомаркеры ГЦР. Представлен сравнительный анализ белков, полученных из нормальной ткани, клеточной культуры HepG2 и опухолевых образцов, с акцентом на их функциональную значимость в развитии канцерогенеза. Автор также проводит функциональную аннотацию обнаруженных белков, демонстрируя их вовлеченность в ключевые биологические процессы, связанные с раком печени. Автор справедливо подчёркивает важность выявления специфичных протеоформных паттернов, которые могут быть использованы для идентификации новых биомаркеров. Особую ценность представляют выводы о значимости секционного профилирования, которое не только увеличивает количество обнаруженных белков, но и позволяет получить их детальный молекулярный профиль (паттерны протеоформ) согласно физико-химическим параметрам.

**Научная новизна.** Диссертационное исследование Зориной Елены Сергеевны представляет собой значимый вклад в изучение молекулярных механизмов развития ГЦР на уровне протеоформ. В работе впервые проведено комплексное исследование белковых профилей тканей печени человека в норме и при ГЦР с использованием комбинации, двумерного гелевого электрофореза и масс-спектрометрии высокого разрешения. Такой подход позволил детализировать изменения протеоформных паттернов и выявить специфические белки и их модификации, которые могут служить потенциальными биомаркерами ГЦР.

Особая ценность работы заключается в применении разработанного автором секционного протеомного анализа, который продемонстрировал более высокую чувствительность по сравнению с панорамным протеомным профилированием. Это позволило не только расширить спектр идентифицированных белков, но и установить их специфичные протеоформные паттерны, характерные для нормальной ткани печени и опухолевых образцов. Таким образом, работа открывает новые перспективы для поиска и валидации маркерных белковых сигнатур, применимых для диагностики, прогноза и мониторинга ГЦР.

Кроме того, результаты функционального анализа обнаруженных белков показывают их значимую роль в канцерогенезе печени, что не только расширяет понимание молекулярных механизмов заболевания, но и обосновывает целесообразность дальнейших исследований для разработки новых терапевтических подходов.

**Теоретическая и научно-практическая значимость.** Полученные результаты вносят существенный вклад в развитие протеомики и биохимии онкологических заболеваний. В работе показана высокая информативность секционного протеомного профилирования для выявления протеоформ и их изменений при канцерогенезе. Исследование подтверждает, что протеоформы играют важную роль в патогенезе ГЦР и могут быть использованы в качестве маркеров для диагностики и мониторинга заболевания. Результаты работы расширяют представление о динамике изменений протеоформ при ГЦР и демонстрируют возможности использования современных протеомных методов для решения фундаментальных и прикладных задач биохимии. Обнаруженные протеоформные паттерны могут стать основой для разработки новых биомаркеров ГЦР с более высокой чувствительностью и специфичностью по сравнению с существующими маркерами, такими как АФП. Разработанный подход на основе комбинации секционного и панорамного протеомного

профилирования может быть использован для изучения изменений протеоформ при других онкологических и неонкологических заболеваниях. Результаты исследования открывают перспективы для использования протеоформных сигнатур в клинической практике для диагностики и прогноза ГЦР.

**Полнота освещения результатов диссертации в печати.** По теме диссертации автором опубликовано 15 работ, из которых 5 статей в рецензируемых научных журналах и 10 публикаций в трудах конференций. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

#### **Вопросы и замечания.**

- 1) Стр. 15, «На мышах инбредной линии BALB/c было показано, что нокдаун гена *CCNB1* с помощью микроРНК-144 ингибирует миграцию, инвазию и пролиферацию клеток ГЦР, что делает его потенциальной терапевтической мишенью для лечения ГЦР.»  
-микроРНК-144 имеет несколько молекулярных мишеней, помимо гена *CCNB1*, и наблюдаемые фенотипические эффекты вполне могут быть результатом её плеiotропного действия, поэтому для доказательства ценности *CCNB1* как мишени требуются более строгие доказательства.
- 2) Для экстракции белков брали клетки НерG2 в логарифмической фазе роста. Почему автор уверена, что именно максимально быстро растущие и делящиеся клетки лучше всего моделируют состояние реальных опухолевых клеток? В условиях реальной опухоли раковые клетки сильно пространственно ограничены контактами с другими клетками и межклеточным матриксом.
- 3) стр. 56, «Количество идентифицированных протеоформ для клеток линии НерG2 согласуется с результатами транскриптомно-протеомного профилирования, полученными Киселевой О.И. и др. [123]. Небольшая разница в количестве идентифицированных протеоформ, по-видимому, обусловлена использованием в нашей работе стандартной библиотеки и комбинации других поисковых алгоритмов с целью оптимизации машинного времени обработки данных.»  
- автору следовало бы подробно описать результаты упомянутой работы. Что значит «небольшая» разница, каковы критерии, отличающие большую разницу от небольшой? Пока же нам предлагается слепо принять на веру, что в ходе той работы было получено что-то похожее на представленные в диссертации результаты.
- 4) рисунок 9 и многие другие места в диссертации. Видно, что очень многие предполагаемые диссертантом как разные протеоформы одних и тех же

белков на самом деле были получены из соседних секций геля для двумерного разделения белков. Не может ли присутствие белка в обеих секциях быть следствием присутствия белкового пятна на границе двух секций – так, что пятно разрезается на две части и попадает в обе? В таком случае многие предполагаемые независимые протеоформы могут на самом деле таковыми не являться.

5) стр. 62, «При сравнении результатов секционного и панорамного профилирования даже без учета идентифицированных протеоформ для каждого белка, было показано, что применение секционного протеомного профилирования позволило идентифицировать большее количество белков как для клеточной линии HepG2 (Рисунок 10), так и для нормальной ткани печени (Рисунок 11)»

-я полагаю, что с учетом огромного разброса в числе детектированных белков для биологических повторов, автору стоило бы использовать более осторожную формулировку. Это же относится к началу Заключение (стр. 96).

6) стр. 64, «При более детальном рассмотрении, для каждого из пациентов наблюдается примерно одинаковое количество идентифицированных белков (Рисунок 13).»

-лучше бы дать более точную формулировку

7) стр. 65, я не смог понять фразу: «Несмотря на гетерогенность опухолевой ткани, общее число копий клеток и баланс между белками с разным числом копий остается неизменным.»

8) непонятная фраза на стр. 66: «На Рисунке 14 представлен график относительного количественного содержания белков (emPAI), которые были определены у всех пациентов (1306 белков), и, как уже ранее было сказано, мы видим, что баланс между белками с разным числом копий при различных состояниях между белками сохраняется.»

9) стр. 67, «При равных условиях эксперимента вероятной причиной улучшения качества анализа является замена предварительной колонки для фракционирования перед проведением МС.» - но это является исключительно умозрительным предположением автора и никак не было исследовано в реальной работе.

10) стр. 68, «Для дальнейшего анализа были отобраны белки, соответствующие следующим критериям: кратное изменение (Fold change, FC)  $\geq 1,5$  и/или присутствие только в злокачественных клетках,»

-важно понимать, что в образце опухолевой ткани на самом деле содержатся не только злокачественные клетки, как пишет автор, а обязательно еще и

окружающие опухоль нормальные клетки, нераковые клетки опухолевой ниши, инфильтрирующие иммунные клетки. И приписываемая злокачественным клеткам специфичность может на самом деле относиться к двум последним клеточным типам.

11) Таблица 8 и другие, слишком мелкий шрифт на иллюстрациях

12) стр. 79, «Разница в количестве идентифицированных белков между контрольной и нормальной тканью печени, вероятно, связана с тем, что образцы, полученные от пациентов с ГЦР, были заражены вирусами гепатита Б и С.»

- Но ведь разница может быть также связана с тем, что окружающие опухоль «нормальные» ткани на самом деле не нормальны, поскольку подвергаются системному влиянию опухоли – например экспозиции ростовых факторов, а также несут признаки воспаления. Эти эффекты системны и, если автору интересно, например, описаны в нашей недавней статье: doi: 10.1016/j.csbj.2023.07.040.

13) стр. 91, правильное написание препарата – сорафениб

Тем не менее, замечания, вопросы и комментарии к работе не влияют на общую высокую оценку и не умаляют значимость данной работы.

Таким образом, диссертационная работа Зориной Елены Сергеевны «Протеоформное профилирование ткани печени человека в норме и при гепатоцеллюлярном раке с использованием двумерного гель-электрофореза и масс-спектрометрии» является завершённой научно-исследовательской работой, содержащей новые фундаментальные и практические результаты. Работа выполнена на высоком научном уровне и полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Зорина Елена Сергеевна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – «Биохимия».

### Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник группы геномного анализа сигнальных систем  
клетки федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Государственный Научный Центр Российской Федерации  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.  
Овчинникова Российской академии наук

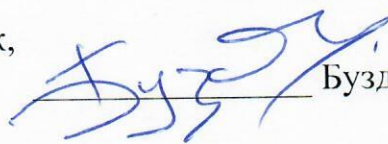
Специальность: 03.00.03 – «Молекулярная биология»

Почтовый адрес: 117997, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10

Телефон: 8 916 389 10 19

Адрес электронной почты: buzdin\_a\_a@staff.sechenov.ru

Доктор биологических наук,  
профессор РАН



Буздин Антон Александрович

24.01.2025 г.

Подпись Будзина А.А. заверяю

Ученый секретарь федерального государственного бюджетного учреждения  
науки «Государственный научный центр Российской Федерации Институт  
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.  
Овчинникова Российской академии наук», доктор физико-математических  
наук.



Олейников Владимир Александрович