

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Албаковой Заремы
на тему: «Протективные и иммуномодулирующие эффекты белков
теплового шока в лимфоме»
по специальности 3.2.7 – «Аллергология и иммунология»

Работа соискателя посвящена исследованию роли семейства белков теплового шока в реакциях иммунитета при разных видах В-клеточных лимфом. **Актуальность исследования** не оставляет сомнений, поскольку, несмотря на то что иммунологические подходы в лечении лимфомы показали многообещающие результаты, значительная часть онкологических больных не отвечает на лечение. Таким образом, изучение молекулярных механизмов канцерогенеза и, в частности, участие системы белков теплового шока в этом процессе, может иметь не только перспективы в диагностике, но и в разработке персонализированного подхода к терапии такого гетерогенного заболевания как В-клеточные лимфомы.

Диссертация построена по традиционному плану и содержит все необходимые разделы: оглавление, список сокращений, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, благодарности, список цитируемой литературы и приложения.

Во введении представлена актуальность и степень разработанности темы исследования, цель и поставленные задачи, перечислены объект и предмет исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, степень достоверности результатов и личный вклад автора, а также информация об апробации результатов и список опубликованных соискателем работ по теме диссертации.

Обзор литературы представляет собой перечисление большого количества фактов без их детального анализа. При том, что этот раздел насчитывает 292 ссылки, следует отметить отсутствие в обзоре ряда фундаментальных разделов, посвященных структуре и функциям разных

групп белков теплового шока и описанию классических иммунологических путей. Это делает крайне затруднительным введение читателя в проблематику, понимание логического построения экспериментальной части, полноты и связанности представленных задач. Сами задачи диссертации зачастую сформулированы нечетко. В частности, первая задача - «Определить ключевые и диагностически значимые Hsp - биомаркеры рака» допускает очень широкое поле для интерпретаций. Поэтому у читателя возникают сложности с пониманием того, какие конкретные этапы экспериментальной работы должны быть проведены для достижения цели диссертационного исследования.

Знакомство с диссертацией затрудняет путаница с использованием разных номенклатур белков теплового шока. В обзоре литературы на странице 12 указано, что все «HSP подразделяются на несколько семейств, таких как HSP110, HSP90, HSP70, HSP40, шаперонины и HSPB». Однако, далее по тексту автор использует названия для одного и того же белка то Hsp27, то HspB1, для семейства - то Hsp70, то HspA. Кроме того, на странице 15 автор обсуждает белок-шаперон GRP94. Однако, не указывает, что это другое название белка gr96, которое используется авторами оригинальной статьи, на которую в этот момент ссылается соискатель. Далее по тексту автор использует это второе название без всяких объяснений (см страницу 25). Все это в лучшем случае запутывает читателя, а в худшем вызывает подозрение, что автор не различает старую (основанную на разнице молекулярных масс) и новую (HspA, HspB и т.д., предложенную Х. Кампингой) номенклатуру и даже воспринимает синонимы одних и тех же белков как разные молекулы.

Также возникают некоторые вопросы по ряду биохимических путей, описанных в обзоре литературы. На странице 15 на рисунке 2 и в описании к нему указано, что одним из путей выхода Hsp во внеклеточную среду является слияние лизосомы или эндосомы с плазматической мембраной. В случае, если это действительно имеет место, возникает вопрос - каким

образом белки теплового шока сохраняют свою функциональную активность в условиях лизосомы - низкого рН и высокой концентрации протеаз?

В «Обзоре литературы» автор указывает: «HSP также были обнаружены в плазме, моче, сыворотке онкологических больных». В данном случае автор отправляет читателя к собственной экспериментальной работе, которая входит в перечень статей по теме данной диссертации (Albakova Z *et al.* *Front Med (Lausanne)*. 2021 Oct 8;8:743476.). Таким образом, у читателя может создаться впечатление, что наличие Hsp в моче онкологических больных - это общепризнанный факт. В связи с этим возникает вопрос к диссертанту, какие еще независимые исследования доказывают заявленный феномен? Описан ли механизм проникновения Hsp белков через фильтрационный барьер почки? Как проводился отбор пациентов для анализов? Проводили ли пациентам хотя бы общий анализ мочи, чтобы подтвердить отсутствие лимфоцитов в пробах, которые также могут быть источником сигнала? Это не отражено ни в разделе «Методы», ни в разделе «Результаты».

Иногда данные литературы процитированы не достаточно аккуратно, например, на странице 15 автор пишет: «eGRP94 способствует созреванию дендритных клеток (ДК), повышая экспрессию молекул МНС класса II, CD83 и CD86, и усиливая продукцию IL-12 и TNF-а через Toll-подобный рецептор 2 (TLR2) и TLR4...». Из второй части предложения «... усиливая продукцию IL-12 и TNF-а через Toll-подобный рецептор 2 (TLR2) и TLR4» следует, что секреция сигнальных молекул идет через рецептор. Стоит быть очень внимательным к случайно возникающим двусмысленным предложениям. Так же стоит отметить, что в цитируемой статье выделено, что GRP94 взаимодействует преимущественно с TLR4 и TLR9, а не TLR4 и TLR2, как сказано в тексте диссертации. В представленном виде такое цитирование некоторым образом подрывает доверие к сведениям, изложенным в литературном обзоре.

Следующий раздел диссертации «Материалы и методы» написан чрезвычайно скупо в ущерб ясности. В качестве примера можно привести

раздел, посвященный клонированию гена, выделению и очистке рекомбинантного Hsp70 (страница 30), где нет никаких данных по поводу подобранных условий экспрессии рекомбинантного белка (среда, температуры, времена инкубаций, способ индукции и т.д.). Нет информации о том, каким образом был приготовлен клеточный лизат для последующей очистки белка, какие использовали буферы и т.д. Раздел, посвященный очистке Hsp70, также не содержит достаточной для воспроизведения методики информации. «Для оптимального выделения белка Hsp70 был проведен скрининг следующих условий: 1. 100 мМ NaCl, 2. 100 мМ KCl..., 9. 10% глицерин». Такая методика выделения белка, будь это попытка публикации в реферируемом журнале, была бы отвергнута на стадии рецензирования статьи. Также нет никакой информации, о проверке последовательности кДНК методом секвенирования и выделенного белка методом масс-спектрометрии. Достаточно небрежно описаны и другие части раздела «Материалы и методы». Например, не описана пробоподготовка и параметры электрофореза и вестерн-блоттинга для разделения и иммунохимического окрашивания белков. Отсутствует важная информация по клеточной цитофлуориметрии, не написаны условия культивации Т и В лимфоцитов, не указано, в какой плотности, какое время донорские клетки инкубировались перед экспериментами. Непонятно, как получали чистую популяцию NK-клеток для эксперимента по дегрануляции и измерению уровня INF γ . Нет информации, какой итоговый процент DMSO был в клеточной среде, чтобы достичь необходимые 0,1 мкМ гелданамицина. Как получали чистую популяцию лимфоцитов В для эксперимента, представленного на рисунке 10? Если же анализ проводили только путем цитофлуориметрии смешанной популяции, то отсутствуют данные по поводу используемых меченых антител на исследуемые белки (Hsp90, TRAP1 и STIP1).

В разделе «Результаты» также не всегда понятно, результаты каких методик описываются. Без этой информации совершенно невозможно дать

оценку и интерпретировать полученные результаты. Например, из названия главы «Определение ключевых гомологов HSP в раковых заболеваниях» абсолютно неясно, какие конкретно раковые заболевания исследуются, более того, догадаться, что в данном разделе проводится обсчет чужих данных, полученных методом масс-спектрометрии, возможно только по аббревиатуре ССА, поскольку она расшифровывается только в одном пункте раздела Методы (рак шейки матки), посвященном «тестированию гипотезы и машинному обучению». Кроме того, количественный анализ данных масс-спектрометрического исследования, основанного на «анализе триптических пептидов белков из геля» вызывает изумление, т.к. этот метод по своей природе не является количественным и не позволяет количественно определить изменение белка в пробах. Остаются вопросы, касающиеся причины появления Hsp белка в моче онкологических больных, о которых было сказано выше.

На странице 33 описана методика работы с образцами пациентов. Возникает вопрос: насколько правомерен статистический анализ данных, полученных на столь малых выборках ($n=2$, $n=3$, страница 44), и экстраполяция выводов на всю популяцию раковых больных?

На основании каких данных следует заключение автора на странице 38: «Поскольку J-домен HSP40 способен связываться с доменом HSP70-NBD, можно предположить, что аналогичный механизм связывания используется HSP70 для взаимодействия с различными рецепторами [256]»?

На странице 45 написано: «анализ В-клеточной клональности (анализ перестройки генов IgH) показал, что в периферической крови и костном мозге пациентов с ЛХ и НХЛ не было обнаружено злокачественных клонов В клеток (Рис. 11А-Д), что позволяет предположить, что высокое содержание HSP90 в В клетках не связано с их злокачественным фенотипом». Возникает вопрос - почему автор связывает изменения в уровне экспрессии и распределения разных Hsp в здоровых лимфоцитах с лимфомой? Какие автор может предположить механизмы, лежащие в основе влияния

злокачественных клонов на здоровые лимфоциты, которые могут привести к наблюдаемым эффектам? Может ли фактор слишком маленькой выборки иметь значительный эффект на полученные выводы?

К разделу «Результаты» есть еще ряд незначительных замечаний. Каким образом рисунок 8А «Модель прогнозирования рака» подтверждает утверждение диссертанта: «Модель прогнозирования рака, обученная на HSP и ко-шаперонах, привела к ~90 % точности и сбалансированной точности 84,61% (точность 87,041%), усредненной по 10-кратным тестам перекрестной проверки (Рис. 8А)»? Что представляют собой и чем отличаются указанные «точности»? Насколько правомерно округление процентов до третьего знака? Чем отличаются «сбалансированная» точность от точности, указанной в скобках?

Нельзя не отметить качество форматирования в диссертационной работе. Практически все рисунки в диссертации оформлены крайне небрежно. В частности на рисунке 6 надписи налезают на гель, контрастность рисунков не выровнена, полностью «слепая» хроматограмма с неподписанными осями, подписи электрофореграммы пункта В не читаемы и заслоняют собой гель. На рисунке 8 надписи настолько маленькие и нечитаемые, что оценить представленные данные не представляется возможным. Кроме того, части рисунков и подписи к ним должны быть на одной странице, а не разорваны, как это встречается в диссертации. На странице 40 дана, видимо, неправильная ссылка на рисунок 17Е вместо 8Е. На рисунке 9 ось ОХ подписана как «Экспрессия (%)». Экспрессия какого гена имеется в виду? Каким методом это было измерено? И почему это не описано в разделе «Методы»? На рисунке 11 не подписана ось ОХ. Верхний колонтитул и межстрочный интервал у списка опубликованных работ отличается от форматирования остального текста диссертации. Также в диссертации встречаются смысловые опечатки, в частности, на странице 32: «В анализ были включены HSP, такие как HSP70, HSP90, HSP40, HSP27, HSP110, шаперонины и ко-шапероны. Белки, которые имели > 30% 0,0099

(отсутствующие значения), были исключены из анализа». Какой показатель автор имеет в виду и почему на основании этого значения белки были исключены из анализа? Видимо, пропущен и какой-то коэффициент, который равен 0,0099... Что значит уточнение «отсутствующие значения»?

Кроме указанного выше, ознакомление с диссертацией в большой степени затрудняет присутствие большого количества некорректных выражений. Для примера можно привести лишь некоторые из них. На странице 8 написано: «...у пациентов с В-клеточной лимфомой нарушено содержание внутриклеточных и внеклеточных Hsp». Имел ли ввиду автор нарушение соотношения между разными формами Hsp или что-то другое, остается непонятным. На странице 49: «Ингибирование HSP90 приводило к небольшому снижению PD-1 и небольшому увеличению CTLA-4». Небольшое снижение экспрессии PD-1? На странице 40: «Для идентификации белков, которые положительно влияли на модель прогнозирования рака, мы внедрили подход...». Как белки могут положительно влиять на модель? На странице 42: «Первичные пациенты с лимфомой Ходжкина (ЛХ) и неходжкинскими лимфомами (НХЛ) различались по частоте иммунных клеток в периферической крови и костном мозге». Вероятно, автор имел в виду, что пациенты различались по количеству или по процентному содержанию иммунных клеток, но никак не по «частоте». Кроме того, в этом разделе не указано, каким методом проводили исследование, можно только догадаться, что это результаты проточной цитофлуориметрии.

В качестве мелких замечаний можно добавить: **1.** Пример опечатки на странице 27: «Несколько лет спустя были одобрены антитела против запрограммированной смерти-1 (PD-1), такие как ниволумаб и пембролизумаб». Вероятно, автор имел в виду антитела против рецептора «запрограммированной смерти» -1. Скорее всего, перевод на русский язык здесь вообще излишен. **2.** Список сокращений составлен не по алфавиту, кроме того, сокращения на русском и английском языке представлены

вперемешку. Все указанное затрудняет ознакомление с текстом диссертации, особенно учитывая, что перечисление аббревиатур занимает целых 3 страницы. Некоторые сокращения не расшифрованы, например, расшифровка сокращения BCL (B-клеточные лимфомы) обнаружена только на странице 50, притом что до этого сокращение использовалось многократно. В списке сокращений аббревиатуры также нет. 3. Странным образом указана аффилиация Норинхо Д.Д: департамент статистики, Португалия. Видимо, автор имел в виду Data Science Department, NOS SGPS, Porto, Portugal.

Для оценки степени **обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций** необходимо проводить проверку правильности используемых методических подходов и правильность логических построений диссертанта. Однако, форма представления результатов, выбранная соискателем, делает этот анализ практически невозможным. Тем не менее, нет никакого сомнения, что автором диссертации проделана огромная работа с использованием самых современных методов исследования. Автором получены **новые данные**, которые вызывают интерес, стимулируют к дальнейшим исследованиям и могут иметь как фундаментальное, так и прикладное значение. Результаты опубликованы в 8 статьях в высоко рейтинговых журналах, принадлежащих к группе Q1 и Q2.

В связи с этим, указанные замечания не умаляют значимости научной проблемы диссертационного исследования. Диссертация отвечает формальным требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 3.2.7 – «Аллергология и иммунология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6

Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Албакова Зарема заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7 – «Аллергология и иммунология».

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,

НАУЧНЫЙ СОТРУДНИК биологического

факультета кафедры биохимии

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ

ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

"Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова"

МУРАНОВА Лидия Константиновна

08.12.2022

Контактные данные:

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:

03.01.04 – «Биохимия»

Адрес места работы:

119234, г.Москва, ул.Ленинские горы, д.1 стр.12,

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет

Тел.: +74959392747; e-mail: info@mail.bio.msu.ru

Подпись сотрудника

МГУ имени М.В. Ломоносова Л.К. Мурановой удостоверяю: