

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Ерохина Максима Максимовича, на диссертационную работу Камыниной Маргариты Игоревны на тему «Анализ роли белков-транспортёров цинка и марганца как прогностических и диагностических маркеров в колоректальном раке», представленную в диссертационный совет ДСУ 208.003.03 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.3. Молекулярная биология, 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Актуальность темы исследования

Внутриклеточная регуляция баланса ионов переходных металлов — важнейший процесс, однако до сих пор нет исчерпывающего системного понимания того, какую роль он играет в опухолевых клетках. Цинк и марганец входят в состав ключевых металлоферментов, участвуют в защите от активных форм кислорода, в частности, в составе супероксиддисмутаза: СОД1 — с цинком и СОД2 с марганцем. Роль этих микроэлементов важна и в процессах регуляции транскрипции, в модуляции сигнального пути cGAS-STING, определяющего иммунный ответ. Таким образом, нарушение внутриклеточного распределения ионов этих металлов способно затрагивать сразу несколько ключевых молекулярных процессов, особенно значимых в канцерогенезе.

Перенос цинка и марганца через мембраны обеспечивается двумя семействами ионных транспортеров: SLC30A (являются белками ZnT) и SLC39A (ZIP белки). Эти ионные переносчики входят в число наиболее измененных по экспрессии генов в целом ряде опухолей, включая колоректальный рак. При этом функциональные последствия направленного изменения активности отдельных переносчиков для транскрипционного профиля клетки и для её чувствительности к препаратам остаются почти неизученными. Отдельные имеющиеся сведения носят преимущественно корреляционный характер.

На этом фоне диссертационная работа выглядит актуальной и логичной. Автор переходит от наблюдательной геномики к прямой функциональной верификации, создав изогенные клеточные модели с таргетно-измененной экспрессией четырёх ионных транспортеров и проследив последствия этих изменений на уровне транскриптома, баланса ионов в жизнеспособных клетках и элементного анализа клеточной массы, метаболической активности и лекарственного ответа. Такая постановка отвечает приоритетам современной молекулярной биологии опухоли и не дублирует ранее решенных задач.

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

Диссертационная работа Камыниной М.И. характеризуется обоснованностью научных положений и выводов. Дизайн исследования выстроен последовательно: от получения и молекулярно-генетической валидации моделей к их функциональной и транскриптомной характеристике. Достоверность внесенных генетических изменений подтверждена независимыми методами на разных уровнях: секвенированием целевых локусов по Сэнгеру; детекцией белкового продукта трансгена по FLAG-эпиту и количественной оценкой транскриптов по данным РНК-секвенирования. Совпадение результатов, полученных разными способами, исключает случайный характер наблюдений. Формулировки выносимых на защиту положений соразмерны фактическому материалу.

Достоверность полученных результатов и новизна исследования

Достоверность результатов подтверждается достаточным числом независимых биологических повторов (не менее трех для каждого эксперимента), наличием всех необходимых контролей для клеток с мутациями (клетки дикого типа и клетки, трансдуцированные пустым GFP-вектором), корректным применением статистических критериев (t-критерий Стьюдента, однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки) и согласованностью данных с независимыми ресурсами: выборкой данных по колоректальному раку («COAD-READ» проекта TCGA) и базой данных OncoBox PD. Экспериментальные наблюдения не противоречат ранее опубликованным сведениям о локализации и субстратной специфичности изученных ионных транспортеров.

В работе получены новые данные, имеющие прямое отношение к пониманию функциональной роли транспортеров ионов переходных металлов в опухолевых клетках. Впервые в едином методическом цикле получена панель изогенных линий аденокарциномы кишечника с направленно измененной экспрессией генов *SLC30A3*, *SLC30A10*, *SLC39A8* и *SLC39A14* и выполнен анализ и сопоставление их транскриптомных профилей. Установлено, что изменение экспрессии *SLC30A10* сопровождается противоположно направленным изменением экспрессии *SLC39A8*, что свидетельствует о включении компенсаторных механизмов поддержания ионного гомеостаза. Впервые показано, что отдельные представители семейств SLC30A и SLC39A выступают не только регуляторами ионного гомеостаза, но и модуляторами лекарственной чувствительности опухолевых клеток, в частности, значимо меняя чувствительность к цисплатину.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Теоретическая значимость работы определяется вкладом в понимание функциональной роли переносчиков ионов переходных металлов. Показано, что направленная модуляция экспрессии генов семейств SLC30A и SLC39A сопровождается системной перестройкой транскрипционного профиля опухолевых клеток с вовлечением сигнальных путей, контролирующих апоптоз, окислительно-восстановительный баланс, клеточную адгезию и репарацию ДНК. Полученный массив данных РНК-секвенирования, а также созданная панель изогенных клеточных линий могут служить основой для дальнейших исследований в области ионного транспорта и его роли в канцерогенезе.

Автор демонстрирует, что профили экспрессии генов семейств SLC30A/SLC39A могут выступать в качестве кандидатных молекулярных маркеров лекарственного ответа. Также выявлен концептуально важный тезис: биологически значимым параметром является не суммарное содержание цинка в клетке, а его внутриклеточное перераспределение, задаваемое активностью конкретных переносчиков. Это открывает перспективы для разработки подходов, нацеленных на модуляцию активности конкретных ионных переносчиков.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Диссертация соответствует паспортам научных специальностей 1.5.3. Молекулярная биология, а именно пунктам 3 (структура геномов, геномика, эпигеномика и транскриптомика; биоинформатические методы анализа последовательностей при патологии у человека), 11 (молекулярные основы патологий, в том числе канцерогенеза) и 13 (геновая, белковая и клеточная инженерия, геномное конструирование), а также 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, а именно пункту 2 (исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях естественных наук).

Полнота освещения результатов диссертации в печати

Результаты диссертационного исследования отражены в 7 работах, в том числе в трех научных статьях в изданиях, индексируемых в международных базах Scopus, PubMed, и четырех публикациях в сборниках материалов всероссийских и международных научных конференций. Следует особо отметить, что в статье, наиболее полно раскрывающей содержание диссертации (International Journal of Molecular Sciences, 2024), автор диссертации является первым автором статьи, что подтверждает определяющий вклад

Камыниной М.И. в работу. Количество и уровень публикаций соответствуют требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Характеристика структуры и содержания диссертации

Диссертация построена по классической схеме и изложена на 163 страницах. Она включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, обширную главу результатов, разделённую на одиннадцать тематических подразделов, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список литературы из 257 источников и приложение. Работа иллюстрирована 31 рисунком и 11 таблицами.

Введение содержит обоснование актуальности выбранной темы, сформулированные цель и восемь экспериментальных задач. Последовательно изложены научная новизна, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту, а также сведения о степени достоверности, апробации и структуре работы.

В Главе 1 «Обзор литературы» систематизированы современные данные о роли ионов переходных металлов в организме, о регуляции гомеостаза цинка и марганца, их участии в детоксикации активных форм кислорода, регуляции транскрипции и передаче сигнала, а также о влиянии этих катионов на путь cGAS–STING и о роли гена *KRAS* в канцерогенезе колоректального рака. Обзор построен логично – от общих закономерностей к частным функциям отдельных белков-транспортёров.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны использованные в работе методы: ведение клеточных линий, CRISPR/Cas9-редактирование, получение стабильных линий с экспрессией, электрофорез и вестерн-блоттинг, флуоресцентная микроскопия, измерение скорости роста и восстанавливающего потенциала, определение концентрации полумаксимального ингибирования – IC₅₀, анализ клеточного цикла, масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, подготовка библиотек, секвенирование и биоинформатическая обработка данных РНК-секвенирования, а также статистический анализ. Детализация раздела материалов и метода достаточна для воспроизведения экспериментов.

Глава 3 представляет описание экспериментальной части и объединяет одиннадцать разделов: 3.1 - 3.11.

В разделе 3.1 на основании статистического анализа депонированных в открытых источниках данных РНК-секвенирования оценены исходные уровни экспрессии генов семейств SLC30A и SLC39A. Объяснена стратегия для выбора мишеней будущих вносимых мутаций.

В разделе 3.2 методом CRISPR/Cas9 получены и охарактеризованы линии с нокаутами *SLC39A8* (делеции 17 и 20 п.н. в экзоне 3, оба аллеля, HuTu80) и *SLC39A14* (делеции в экзоне 2 в обеих линиях). Мутации подтверждены секвенированием по Сэнгеру, онлайн-инструментом TIDE и РНК-секвенированием. Валидация внесенных изменений проведена на нескольких независимых уровнях. Пояснены ограничения метода.

В разделе 3.3 с помощью лентивирусного вектора с FLAG-тегированными открытыми рамками считывания получены стабильные линии, экспрессирующие *SLC30A3*, *SLC30A10* и *SLC39A8* (подтверждение иммуноблоттингом; после РНК-секвенирования кратности повышения транскриптов достигали трёх порядков). Автор корректно фиксирует и те случаи, когда получить клон не удалось (нокаут *SLC39A8* в НСТ-15, экспрессия *SLC39A8* в НСТ-15), не маскируя ограничений модели.

В разделе 3.4 зондом FluoZin-3 AM визуализировано внутриклеточное распределение свободного цинка: снижение при нокауте *SLC39A14* и экспрессии *SLC30A10*, характерный гранулярный паттерн при экспрессии *SLC30A3* и увеличение содержания визуализируемого цитоплазматического цинка при экспрессии *SLC39A8* – что согласуется с известными функциями этих белков.

Раздел 3.5 посвящён анализу микроэлементного состава методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Автор не обошёл кажущееся противоречие: парадоксальное накопление цинка в клетках HuTu80 с нокаутом импортера *SLC39A14*, а корректно объяснил его компенсаторной активацией альтернативного переносчика (*TRPM6* в HuTu80, *SLC30A10* в НСТ-15), одновременно разграничив понятия общего и лабильного цинка. То, как автор интерпретирует полученные данные, показывает, что он разбирается в методических ограничениях и умеет их учитывать при анализе результатов.

В разделе 3.6 исследовано влияние изменённой экспрессии белков-транспортёров на чувствительность к противоопухолевым препаратам. Для цетуксимаба значимых различий не выявлено, для винкристина и иматиниба зафиксированы умеренные изменения жизнеспособности, специфичные для каждой линии. Наиболее выраженный эффект получен для цисплатина: сверхэкспрессия *SLC30A10* повышала IC₅₀ в 2,7–4 раза (формирование устойчивости), тогда как сверхэкспрессия *SLC30A3*, напротив, снижала IC₅₀ примерно в 3,3 раза, усиливая чувствительность к препарату.

Разделы 3.7–3.11 содержат полнотранскриптомный анализ: рассчитаны уровни активации 3044 молекулярных путей с помощью инструмента Oncobox PD и проведено аннотирование по терминам Генной Онтологии. Показаны дифференциально экспрессированные гены и затронутые пути при сверхэкспрессии *SLC30A3* и *SLC30A10*, и

при нокауте *SLC39A14*. Сопоставление транскрипционных эффектов нокаута и сверхэкспрессии *SLC39A8* позволило идентифицировать 16 генов с противоположно направленной регуляцией (включая *SLC30A10*), а также 89 сигнальных путей, активация которых изменялась в противоположные стороны при двух типах модуляции экспрессии данного гена.

В четвёртой главе «Обсуждение» полученные данные проанализированы и сопоставлены с современной литературой, что свидетельствует о свободном владении автором предметом.

Раздел «Заключение» обобщает результаты, а сформулированные пять выводов полностью соответствуют поставленным задачам.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, отражает логику и последовательность решения задач исследования и раскрывает основные положения, выносимые на защиту. Приведённые в нём фактические сведения, числовые показатели и иллюстрации согласуются с полным текстом диссертации. Расхождений, искажающих смысл полученных результатов, не выявлено.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

К достоинствам работы следует отнести методическую многоплановость, сочетание адресного редактирования генома с полнотранскриптомным анализом, тщательность валидации моделей и взвешенность интерпретаций. Тем не менее по содержанию и оформлению диссертации имеется ряд замечаний, преимущественно уточняющего характера.

1) Не очень подробно описано семейство SLC белков. Остается не понятным, сколько всего таких белков в геноме человека, чем они отличаются друг от друга по строению и профилю экспрессии. Было бы уместно показать строение данных факторов, их доменную организацию и длину полипептидных цепей.

2) Было бы полезно показать на схеме таргетные последовательности для гидовых РНК относительно экзон-интронной структуры генов. Автор пишет, что для гена *SLC39A8* мишенью был выбран 3 экзон, а для гена *SLC39A14* мишенью был выбран экзон 2. С чем связан такой выбор? Какие домены/участки белка остаются интактными в полученных линиях?

3) Остаётся открытым вопрос о валидации нокаутов на белковом уровне: в работе отсутствуют данные вестерн-блоттинга, подтверждающие снижение соответствующих белков-транспортёров. Проводились ли такие эксперименты?

4) Фотографии флуоресцентного окрашивания внутриклеточного пула цинка в живых клетках носит качественный характер. Количественная оценка интенсивности сигнала в пересчёте на клетку усилила бы доказательность этого раздела.

5) Отсутствует какое-либо измерение уровня марганца в живых клетках, хотя в теме диссертации этот микроэлемент фигурирует вместе с цинком.

6) Единственным геном, экспрессия которого согласованно снижалась в обеих линиях при сверхэкспрессии *SLC30A10*, оказался *HIST1H4J*, кодирующий белок семейства гистона H4. Учитывая известную связь марганца и цинка с активностью гистон-модифицирующих ферментов, не является ли выявленное изменение отражением эпигенетического механизма, и может ли оно быть одной из причин наблюдаемой перестройки транскрипционного профиля? Данный вопрос представляется интересным для обсуждения и намечает направление дальнейших исследований.

Тем не менее, диссертационное исследование выполнено на высоком методологическом уровне. Вышеуказанные замечания носят уточняющий характер и не снижают научную ценность диссертации.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Камыниной Маргариты Игоревны на тему: «Анализ роли белков-транспортёров цинка и марганца как прогностических и диагностических маркеров в колоректальном раке», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершённым научно-квалификационным исследованием, в котором автором решен ряд задач в области молекулярной биологии, в частности, в области функционального анализа роли генов-транспортёров цинка и марганца семейств *SLC30A* и *SLC39A* в регуляции транскрипционных программ и лекарственной чувствительности клеток колоректального рака. Существенным вкладом является установление того, что направленное изменение экспрессии этих генов перестраивает молекулярные пути апоптоза, редокс-регуляции и репарации ДНК и разнонаправленно модулирует чувствительность опухолевых клеток к цисплатину. Работа полностью соответствует требованиям п. 16 Положения о присуждении ученых степеней в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский

Университет), утвержденного приказом ректора № 0692/Р от 06.06.2022 года (с изменениями, утвержденными: приказом № 1179/Р от 29.08.2023 г., приказом № 0787/Р от 24.05.2024 г., приказом № 1085/Р от 10 июля 2025 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Камынина Маргарита Игоревна, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.3. Молекулярная биология и 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук (1.5.3. Молекулярная биология),
ведущий научный сотрудник, руководитель группы биологии хроматина
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук

12 августа 2026 года




Ерохин Максим Максимович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук
Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5
e-mail: yermahbio@yandex.ru
Телефон: +7 (499) 135-60-89

