

119121, гор. Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

тел.: (+7/499) 246-69-80, (+7/499) 246-34-66, факс: (+7/499) 245-08-57, эл. почта: inst@ibmc.msk.ru, http://www.ibmc.msk.ru
ОКПО 01897373, ОГРН 1027739053792, ИНН/КПП 7704084419 / 770401001, ОКАТО 45286590000

№ 103/1

«06» марта 2018 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного
бюджетного научного учреждения

«Научно-исследовательский
институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича»,
академик РАН



А.В. Лисица

«06» марта марта 2018 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Пашинцевой Натальи Валентиновны «Протеомное изучение отдельных белков, участвующих в регуляции жизнеспособности культивируемых опухолевых клеток человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.04 Биохимия и 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Актуальность темы исследования

Проблемы, связанные с поддержанием жизнеспособности культивируемых клеток человека, исследуются уже не одно десятилетие, но продолжают оставаться весьма актуальными для биохимии и для биотехнологии. Особый интерес естественно вызывает определение белков и других участников молекулярных механизмов, обеспечивающих клеточную жизнеспособность в злокачественных опухолях. Вполне обоснованно считается, что изучение таких белков может принести новую важную информацию об особенностях метаболизма злокачественных клеток, а также будет способствовать решению многих прикладных задач. Некоторые из подобных белков могут представлять интерес как потенциальные диагностические маркеры, а другие – как молекулярные мишени при разработках таргетной терапии. С началом 21-го века при решении задач, связанных с выявлением белков, участвующих в поддержании жизнеспособности злокачественных клеток

человека, активно используются различные технологии и методы, среди которых значительное место занимают протеомные технологии и методы клеточного культивирования. Таким образом, тему рассматриваемой диссертационной работы Н.В. Пашинцевой можно оценить как вполне актуальную, а избранные подходы – как современные и адекватные.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Диссертант определила в качестве основной цели своей работы изучение в культивируемых клетках рабдомиосаркомы человека (RD) отдельных белков, участвующих в регуляции жизнеспособности, и создание на основе этих клеток биотест-системы для определения антипролиферативной активности некоторых биологически активных веществ. Для достижения поставленной цели Н.В. Пашинцева использовала протеомные технологии и методы культивирования *in vitro* различных клеточных линий человека. Соответственно, на первом этапе работы автор охарактеризовала методом двумерного электрофореза в клетках RD 100 мажорных белковых фракций по электрофоретической подвижности, из которых масс-спектрометрическими методами идентифицировала 61 фракцию. Среди идентифицированных оказался ряд белков, ассоциируемых со злокачественной трансформацией клеток. При этом особое внимание диссертанта привлекли четыре белка DJ-1, кофиллин 1, гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 (hnRNP A1), сплайсинг-фактор, богатый пролином и глутамином (SFPQ), которые далее прицельно изучались и в других линиях культивируемых злокачественных и нормальных клеток человека.

На втором этапе исследований материалы, полученные при протеомном анализе белков в клетках RD, а также двух других сарком, трех линий рака почки, одной линии аденокарциномы кишечника, линии нормальных мезенхимальных стволовых клеток и нормальных миобластов, были использованы для формирования новой отечественной базы данных «Протеомика злокачественных клеток». Этот биоинформационный ресурс был зарегистрирован в Государственном реестре баз данных (свидетельство № 2017620475), что является несомненным подтверждением высокой научно-практической значимости рассматриваемой диссертационной работы.

Далее сравнительный протеомный анализ белков изученных клеточных линий показал, что SFPQ присутствует в качестве одного из мажорных белков во всех исследованных опухолевых клетках и не выявляется в нормальных мезенхимальных клетках. Кроме того, автор отметила повышенное содержание белков DJ-1 и hnRNP A1 в злокачественных

клетках по сравнению с нормальными, что дало основания для заключений об избирательности и важной роли этих белков в метаболизме злокачественных клеток.

На заключительном этапе работы Н.В. Пашинцева с помощью биотест-системы, разработанной на основе клеточной линии RD, провела изучение влияния на пролиферацию клеток трех новых БАВ, синтезированных на основе флавоноидов (олигомерный катехин, олигомерный дигидрокверцетин и препарат, полученный ферментативной дериватизацией дигидрокверцетина с парааминобензойной кислотой). Оказалось, что эти БАВ проявляют сходную доза-зависимую антипролиферативную активность. При этом впервые было обнаружено, что в клетках RD, культивированных в присутствии олигомерного катехина, происходят достаточно специфичные изменения протеомного профиля и, в частности, исчезают фракции, идентифицированные как полноразмерные изоформы белка SFPQ.

В целом, выше отмеченные новые данные и ряд других материалов, имеющихся в рассматриваемой диссертации, позволяет сделать заключение о ее несомненной научно-практической ценности.

Структура и основное содержание диссертации

Представленная работа Н.В. Пашинцевой написана по общепринятому плану и содержит следующие основные разделы «Введение», три главы, среди которых «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», а также «Заключение» и «Выводы». Общий объем диссертации (со списком литературы) составляет 132 стр. машинописи. Работа хорошо иллюстрирована - иллюстративный материал представлен 30 рисунками и 10 таблицами. В диссертации имеется обширный список цитированной литературы, который насчитывает 329 ссылок на публикации отечественных и зарубежных авторов.

Рукопись диссертации начинается с краткого введения, в котором автор отмечает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи работы, дает характеристику научной новизны и научно-практической значимости результатов диссертации, приводит сведения об апробации полученных данных на научных конференциях и в публикациях результатов, а также затрагивает ряд других традиционных вопросов.

Глава 1, представляющая собой обзор литературы, посвящена современным результатам исследований некоторых белков, участвующих в регуляции жизнеспособности опухолевых клеток. Она состоит из пяти взаимосвязанных разделов, в первом из которых Н.В. Пашинцева характеризует роль культивируемых опухолевых клеток человека в изучении злокачественных новообразований и понятие клеточной жизнеспособности. Затем рассматриваются ключевые сигнальные пути и белки, участвующие в обеспечении жизне-

способности клеток. В третьем и четвертом разделах представлены сведения об основных протеомных подходах, применяемых в исследовании белков культивируемых клеток человека, и культивируемых клеточных линий как *in vitro* модели для изучения веществ, влияющих на жизнеспособность эукариотических клеток. Завершает главу 1 раздел, содержащий сведения о четырех белках (DJ-1, кофилине 1, SFPQ и hnRNP-A1), которые участвуют в регуляции жизнеспособности культивируемых опухолевых клеток и стали главными объектами работы диссертанта. Таким образом, можно сделать заключение, что материал, собранный и проанализированный автором в «Обзоре литературы», непосредственно связан с проблематикой проводившихся исследований.

Использованные в диссертации материалы и методы кратко описаны в главе 2. В начале главы дается краткая, но достаточно подробная сводка о разнообразных реагентах и клеточных культурах, применявшихся в работе. Затем следует описание методов культивирования для получения клеточной биомассы, необходимой для изучения белков в соответствующих клеточных линиях, после чего приводятся сведения о ряде известных протеомных методах – нескольких модификациях двумерного электрофореза и масс-спектрометрической идентификации. Кроме того, в нескольких разделах данной главы представлены биотехнологические методы определения жизнеспособности клеток и анализа биологических эффектов от действия производных дигидрокверцетина и катехина на культивируемые клетки. В целом, из знакомства с главой 2 рассматриваемой диссертации следует, что выбранные автором биохимические и биотехнологические методы вполне адекватны решавшимся задачам. Соответственно, вполне обоснованным является представление данной работы к защите по двум специальностям: 03.01.04 – Биохимия и 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Полученные результаты вместе с их обсуждением диссертант сгруппировала в трех разделах главы 3. Сначала Н.В. Пашинцева представляет материалы протеомного изучения белков клеток RD. При этом ей удалось построить соответствующую двумерную белковую карту, на которой были определены электрофоретические характеристики для 100 мажорных белковых фракций, причем шестьдесят одна из них была идентифицирована. Полностью результаты протеомного анализа белков клеток RD суммированы в виде двух приложений, имеющих в рассматриваемой диссертации. Особо надо отметить, что автор охарактеризовала по литературным данным более десятка идентифицированных белков, как имеющих отношение к регуляции жизнеспособности злокачественных клеток. Полученные экспериментальные материалы о четырех отмеченных белках (DJ-1, кофилине 1, SFPQ и hnRNP-A1) стали основой для дальнейшей работы.

Второй раздел главы 3 диссертации является основным по своему содержанию. Здесь диссертант приводит результаты сравнительного протеомного изучения белка DJ-1, кофилина 1, а также белков SFPQ и hnRNP A1 в ряде злокачественных клеточных линий мезенхимального и эпителиального происхождения, а также описывает создание новой отечественной базы данных «Протеомика злокачественных клеток» (БД «ПЗК»). Сравнивая эту базу данных с предыдущей (которая называлась «Протеомика рака простаты»), Н.В. Пашинцева указала на определенные различия между ними. Во-первых, БД «ПЗК» была принципиально расширена до 17 информационных модулей. Во-вторых, в БД «ПЗК» появились сведения о белках клеточных линий, которые были выделены из злокачественных опухолей не только простаты, но и почки, а также толстого кишечника.

Заключительный раздел главы 3 можно определить как в основном биотехнологический. В этом разделе автор описала разработанную на основе клеток RD биотест-систему и полученные с ее помощью результаты изучения влияния олигомерного катехина и двух производных дигидрокверцетина на злокачественные клетки.

Таким образом, можно сделать заключение, что представленные в главе 3 результаты исследований, выполненных Н.В. Пашинцевой, соответствуют цели и задачам, поставленным в рассматриваемой диссертации, а сделанные из них выводы являются достаточно обоснованными. Эти материалы могут быть использованы в исследованиях, проводимых в ряде Федеральных государственных бюджетных учреждений, в частности в Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина и других учреждениях, медико-биологического профиля.

Материалы диссертации Н.В. Пашинцевой нашли полное отражение в автореферате, а также в публикациях автора. Всего по теме диссертации имеется 14 научных работ: 3 статьи в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 1 статья в журнале РИНЦ, и 3 статьи в сборниках, содержащих материалы отечественных и международных научных конференций, а также 5 тезисов докладов.

Замечания

Принципиальных замечаний к диссертации Н.В. Пашинцевой нет, однако при рассмотрении данной работы все же возникли некоторые частные замечания, вопросы и пожелания.

Во-первых, представляется, что раздел «Заключение», имеющийся в диссертации, весьма краток (полторы страницы машинописи) и носит в значительной степени формальный характер. Хотя автор справедливо отметила в этом разделе, что изучавшиеся в работе «...белки SFPQ и hnRNP A1 относят к так называемым РНК-связывающим белкам, которые вовлечены в обеспечение сплайсинга - одного из ключевых этапов в реализации генетической информации и важнейшего процесса обеспечения жизнеспособности эукариотических клеток...», она не стала далее рассматривать указанный аспект проблемы. Вместе с тем, в настоящее время в литературе активно обсуждают значимость нарушений сплайсинга в формировании некоторых отличительных характеристик злокачественных клеток. С учетом основной тематики рассматриваемой диссертации было бы правильным в «Заключении», хотя бы в краткой форме, отразить перспективность указанного направления исследований.

Во-вторых, в таблице 9 автор представила более 20-ти триптических пептидов белка hnRNP A1, в которых по результатам масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF) можно было предполагать наличие различных постсинтетических модификаций. Из них для четырех пептидов tandemной масс-спектрометрией было подтверждено диметилирование по аргинину. В связи с этим возникает вопрос – не лучше ли было ограничиться только экспериментально подтвержденными данными.

Наконец, в работе присутствуют отдельные недостатки в оформлении. Так, в тексте диссертации для обозначения белков многократно используются различные аббревиатуры (например, SFPQ) и английские символы (например, hnRNP A1), но они почему-то не включены в имеющийся в диссертации список сокращений. При цитировании иностранных авторов диссертант приводит только фамилии без имен, что при одинаковых фамилиях и годах публикации вынуждает его применять дополнительные буквенные индексы. Например, на стр. 5 имеется ссылка [Wang et al., 2016b], а на стр. 35 [Wang, Gao, 2016a]. Такой способ цитирования создает некоторые трудности для читателя, которые можно было бы легко избежать, традиционно добавив к фамилии первую букву имени, например, Wang F. et al., 2016 (№291 в списке литературы) и Wang H., Gao W. 2016 (№293 в списке литературы)

Очевидно, что сделанные замечания, пожелания и поставленные вопросы не затрагивают основного содержания рассматриваемой диссертации и не влияют на ее общую положительную оценку.

Заключение

Таким образом, все вышеизложенное позволяет сделать заключение о том, что диссертационная работа Пашинцевой Натальи Валентиновны, является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая выполнена на высоком научно-методическом уровне и содержит решение научной задачи, имеющей важное значение для развития биохимии белков и биотехнологии клеточных культур. Эта работа соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. №650) к кандидатским диссертациям, а ее автор Пашинцева Н.В. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по двум специальностям – 03.01.04 Биохимия и 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв на диссертацию Пашинцевой Натальи Валентиновны обсужден и одобрен на расширенном научном заседании лаборатории медицинской биотехнологии (« 02 » марта 2018 г., протокол № 3).

Отзыв составил

заведующий лабораторией медицинской биотехнологии

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт

биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

доктор биологических наук, профессор

«06 » марта 2018 г.



Соколов Николай Николаевич

Подпись Н.Н. Соколова заверяю.

Ученый секретарь ИБМХ, кхн



Карпова Е.А.

119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИМБХ)

Телефон: +7 (499) 246-69-80; +7 (499) 246-34-66

Факс: +7 (499) 245-08-57

Электронная почта: inst@ibmc.msk.ru

Сайт: www.ibmc.msk.ru