

## ОТЗЫВ

официального оппонента 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).

Одной из важных проблем современной биомедицины считается установление молекулярных механизмов, благодаря которым обеспечивается высокий уровень жизнеспособности опухолевых клеток человека. Данные, полученные во многих лабораториях мира, свидетельствуют о том, что ключевыми участниками этих механизмов могут быть отдельные белки, и, соответственно, разработки способов целенаправленных воздействий на такие белки рассматриваются как перспективный путь к созданию новых методов терапии злокачественных опухолей. Значительная клеточная гетерогенность и различное тканевое происхождение опухолей существенно усложняют экспериментальные подходы к данной проблеме. Однако на первых этапах такого пути вполне эффективный подход способны обеспечить современная биотехнология, которая располагает специально выведенными линиями культивируемых клеток человека и методами их культивирования, в сочетании с современной биохимией, активно использующей протеомные технологии, позволяющие проводить системный анализ белков в изучаемых клетках. Соответственно, тема диссертационной работы Н.В. Пашинцевой, которая предусматривает протеомное изучение отдельных белков, участвующих в регуляции жизнеспособности культивируемых опухолевых клеток человека, представляется важной и актуальной.

Представленную диссертационную работу можно в целом характеризовать как определенный симбиоз биохимических и биотехнологических исследований, что обеспечило получение ряда новых и интересных результатов. Сначала автор провела изучение протеомного профиля в клетках линии рабдомиосаркомы человека (RD). Для решения этой задачи Н.В. Пашинцева выполнила крупномасштабное культивирование клеток RD и провела протеомный анализ белков в полученных клетках. Поскольку ранее белки клеток RD сравнительно мало исследовались протеомными технологиями то, в результате были получены новые данные о присутствии в этих клетках десятков известных белков, среди которых оказались предполагаемые участники механизмов поддержания клеточной жизнеспособности, в частности сплайсинг фактор, богатый пролином и глутамином (SFPQ) и гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 (hnRNP A1). При этом впервые удалось показать, что среди мажорных белков в клетках RD присутствуют наряду с полноразмерным

SFPQ три укороченных варианта этого белка с молекулярными массами 55, 55 и 46 кДа, соответственно.

Далее, диссертант продолжила целенаправленное изучение белков SFPQ, hnRNP A1 а также DJ-1 и кофилина 1 в других линиях злокачественных клеток человека. Для решения указанных задач Н.В. Пашинцева выполняла культивирование еще двух клеточных линий сарком (SK-UT-1B, U2-OS), трех линий рака почки (769-P, A-498, OKP-GS) и одной линии рака толстого кишечника (HT-29). В качестве контрольных культур выращивались клетки линии SC5-MSC (нормальные стволовые мезенхимальные клетки), а также нормальные миобласты человека. Во всех этих клеточных культурах с помощью протеомных технологий был проведен анализ белков SFPQ, hnRNP A1, DJ-1 и кофилина 1, что позволило получить новые, интересные результаты. В частности, оказалось, что белок SFPQ обнаруживается во всех изученных злокачественных клеточных линиях, но не выявляется такими же методами в нормальных клетках; hnRNP A1 и DJ-1 присутствуют в злокачественных клетках как мажорные белки, а в нормальных клетках их удается выявить лишь в следовых количествах; содержание кофилина 1 в злокачественных клетках было сопоставимо с его содержанием в нормальных клетках.

Существенное значение для решения биотехнологической задачи, связанной с определением влияния БАВ на злокачественные клетки мезенхимального происхождения очевидно имеет выполненная диссидентом разработка клеточной биотест-системы на основе клеток RD и ее апробация с помощью трех препаратов синтетических флавоноидов (производных дигидрокверцетина и катехина). Представляется важным отметить, что анализ динамики клеточного роста в биотест-системе с подсчетом клеток в режиме реального времени был проведен с использованием самого современного оборудования (прибор xCELLigence RTCA DP Analyzer, компании ACEA Biosciences, Inc., США).

Таким образом, рассматриваемая работа обладает несомненной научно-практической ценностью, поскольку в ней содержится ряд новых и важных результатов, которые можно характеризовать как решения экспериментальных задач, имеющих значение для развития белковой биохимии и биотехнологии клеточных культур. При этом следует отметить, что результаты диссертационной работы Н.В. Пашинцевой нашли отражение в 14 публикациях автора, включая 3 статьи в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также в 1 статье в журнале РИНЦ.

Анализ рукописи диссертации Н.В. Пашинцевой показывает, что написана она по традиционному плану. В ней содержатся следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение» и «Выводы». В диссертации имеется весьма значительный список цитированной литературы, в

котором имеются 329 ссылок в основном на публикации зарубежных авторов и только 12 ссылок на работы отечественных авторов.

В разделе «Введение» автор вполне аргументировано обосновывает выбор темы своей работы и ее актуальность, описывает цель и задачи исследования, перечисляет положения, характеризующиеся новизной и отмечает результаты, обладающие определенным научно-практическим значением.

Имеющийся в диссертации обзор литературы (глава 1) Н.В. Пашинцева посвятила рассмотрению биохимических и биотехнологических подходов к изучению различных белков, участвующих в регуляции жизнеспособности опухолевых клеток человека. Значительное место в этой главе отведено рассмотрению современных протеомных технологий, используемых для анализа белков в злокачественных клетках человека и культивируемым клеточным линиям, которые применяются в различных модельных экспериментах. Завершающий раздел обзора литературы содержит сведения о некоторых белках (DJ-1, кофилине 1, SFPQ и hnRNP-A1), специально отобранных диссидентом для своей работы. В целом, в данной главе Н.В. Пашинцева собрала и проанализировала обширный литературный материал, который позволяет составить хорошие представления о развитии исследований в данной области и об имеющихся нерешенных вопросах.

В главе 2 представлена краткая, но достаточно полная информация об использованных в работе материалах и методах исследований. Основная часть этой главы содержит описание различных протеомных методов, включающих модификации двумерного электрофореза по О'Фарреллу и масс-спектрометрического анализа белков. Здесь также содержаться сведения о применявшимся методах культивирования клеток и других биотехнологических методах, с помощью которых автор изучала клеточную жизнеспособность и анализировала биологические эффекты синтетических флавоноидов. В целом можно сделать вывод о том, что диссидент владеет значительным набором биохимических и биотехнологических методов, которые полностью соответствовали решавшимся задачам.

Изложение полученных результатов и их обсуждение дано диссидентом в главе 3, которая состоит из трех разделов. Первый из них содержит данные, проведенного протеомного анализа мажорных белков в клетках линии RD и выявление отдельных белков, ассоциированных со злокачественной трансформацией. Во втором разделе суммированы результаты сравнительного изучения в различных клеточных линиях четырех специально отобранных белков (DJ-1, кофилина 1, SFPQ и hnRNP-A1), которые по современным представлениям участвуют в регуляции жизнеспособности клеток. В этом разделе приведено также принципиально важное обобщение – описание новой многоуровневой базы данных «Протеомика злокачественных клеток», которая в 2017 году была включена в

Государственный реестр баз данных (регистрационный номер 2017620475). В третьем разделе представлены биотехнологические результаты, связанные с формированием биотест-системы на основе линии RD и изучением с ее помощью влияния олигомерного катехина и двух производных дигидрокверцетина на клеточную пролиферацию. В частности, здесь автор показала, что после воздействий БАВ в клетках RD происходят изменения протеомного профиля. Более того, протеомный анализ позволил выявить достаточно специфичное исчезновение полноразмерного SFPQ, вызванное олигомерным катехином. Таким образом, эти данные можно рассматривать как весьма удачное проявление симбиоза биотехнологических и бioхимических методов.

В целом, результаты работы, выполненной Н.В. Пашинцевой, отвечают цели, поставленной в диссертации, и сделанные выводы непосредственно вытекают из полученных данных, что позволяет считать их хорошо обоснованными. Диссертационные материалы нашли достаточно полное отражение в автореферате.

Существенных замечаний к рассмотренной диссертационной работе нет, однако имеются отдельные вопросы, редакционные замечания и пожелания.

Так, один из значимых разделов диссертации Н.В. Пашинцевой связан с изучением биологических эффектов трех производных флавоноидов, которые были синтезированы коллегами докторанта из лаборатории химической энзимологии ФИЦ Биотехнологии РАН, что указано в главе 2. Однако ни в главе 2, ни далее в разделах, главы «Результаты и их обсуждение» не приводится никаких структурных характеристик этих препаратов. По-видимому, подобные данные имеются в цитированных публикациях сотрудников лаборатории химической энзимологии ФИЦ Биотехнологии РАН. Соответственно, хотелось бы, чтобы при обсуждении диссертации Н.В. Пашинцева, хотя бы кратко сообщила о структурных свойствах синтезированных флавоноидов и ответила на вопрос, почему данные соединения были выбраны для исследований.

В качестве отдельных редакционных замечаний можно отметить то, что автор в ряде случаев в тексте диссертации использует нечасто употребляемые в биологии термины без соответствующих пояснений. Например, при описании принципа измерения количества клеток с помощью прибора xCELLigence RTCA DP Analyzer докторант отмечает, что при этом происходит «измерение электрического импеданса, величина которого зависит от количества клеток в каждой лунке планшета». Практически вскоре в тексте отмечается, что «в отсутствии клеток электродный импеданс зависит только от ионного окружения на поверхности раздела электрод/раствор и в растворе».

Наконец, представленные интересные данные о специфичных изменениях протеомного профиля в злокачественных клетках под действием некоторых флавоноидов,

позволяющие предполагать наличие определенных белковых мишеней, служат основанием для пожелания продолжить изучение механизма такой биологической активности.

Отмеченные выше недостатки, поставленные вопросы и сделанные пожелания никак не затрагивают основного содержания данной диссертации и не влияют на ее общую высокую оценку.

В общем заключении представляется необходимыми отметить следующее. Рассмотренная диссертационная работа Пащинцевой Натальи Валентиновны «Протеомное изучение отдельных белков, участвующих в регуляции жизнеспособности культивируемых опухолевых клеток человека» является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная задача изучения белков, участвующих в регуляции жизнеспособности клеток рабдомиосарком, с применением современных методов исследования. По своему содержанию она полностью соответствует требованиям, изложенным в п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного действующим Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года (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). Соответственно, ее автор Пащинцева Н.В. заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.04 – Биохимия и 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник лаборатории генетики  
опухолевых клеток НИИ канцерогенеза  
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,  
кандидат биологических наук по специальности  
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Е.Ю. Рыбалкина

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России  
115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24  
Тел.: +7 (499) 324-17-69, электронный адрес: [kate\\_rybalkina@mail.ru](mailto:kate_rybalkina@mail.ru)

Подпись к.б.н. Е.Ю. Рыбалкиной заверяю

Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России  
Кандидат медицинских наук



И.Ю. Кубасова

«07 » марта 2018 г.