

О Т З Ы В

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).

Актуальность

С началом 21-го века в белковой биохимии особое место заняла протеомика, стратегия которой предусматривает проведение на основе системного подхода комплексных исследований белков как продуктов генной экспрессии. О высокой значимости и большом интересе к подобным исследованиям достаточно убедительно свидетельствуют многие тысячи публикаций, появляющихся ежегодно в периодической печати. Например, только за один 2017 г. вышло более 9 тысяч работ с ключевым словом «proteomic», которые были зарегистрированы в базе данных PubMedNCBI. Естественно, что значительное место среди протеомных исследований (более 20% от всех протеомных публикаций) занимают работы, направленные на изучение белков в злокачественных опухолях. Одним из актуальных направлений в протеомике является изучение белков, вовлеченных в обеспечение высокой жизнеспособности злокачественных клеток, с определением перспектив использования подобных белков в качестве диагностически значимых биомаркеров и/или молекулярных мишней для химиотерапевтических воздействий. Именно этой проблеме посвящена диссертация Н.В. Пашинцевой, тему которой очевидно можно признать актуальной и важной.

Теоретическая и практическая ценность полученных результатов.

Для изучения молекулярных основ жизнеспособности культивируемых опухолевых клеток человека Н.В. Пашинцева использовала известный биохимический подход, связанный с выявлением белков, которые могут быть вовлечены в обеспечение способности к устойчивой клеточной пролиферации и других ключевых функций. Основными объектами исследований в рассматриваемой диссертации стали три линии саркомных клеток, три линии клеток рака почки и ряд других. Для решения поставленных задач диссидент применила несколько эффективных протеомных технологий, среди которых было несколько модификаций двумерного электрофореза по О'Фарреллу и методы масс-спектрометрического анализа белковых фракций. Благодаря этому ей удалось параллельно получить характеристики протеомных профилей (из нескольких десятков мажорных белков) в изучавшихся линиях злокачественных клеток и сравнить их с протеомными профилями некоторых нормальных клеток. В результате было показано,

что отдельные белки, вовлеченные в поддержание клеточной жизнеспособности (изоформы полноразмерного сплайсинг-фактора, богатого пролином и глутамином [SFPQ], а также белки DJ-1 и hnRNP A1), характеризуются повышенным содержанием в злокачественных клетках по сравнению с нормальными. Как следствие, Н.В. Пашинцева выдвинула важное, теоретически значимое положение об особых ролях этих белков в метаболизме злокачественных клеток.

Обобщение собранных результатов протеомных исследований, проведенных для ряда линий злокачественных клеток (и, в частности, формированием диссертантом особого информационного модуля «Белки клеток рабдомиосаркомы RD»), стали основой для создания отечественной базы данных «Протеомика злокачественных клеток» (БД «ПЗК»), которая поддерживается на русском и английском языках. БД «ПЗК» открыта для Интернет-пользователей (<http://ef2.inbi.ras.ru>) и, таким образом, материалы, собранные в БД «ПЗК», могут быть использованы любыми исследователями, изучающими особенности протеомных профилей злокачественных клеток человека с целью поиска потенциальных белковых биомаркеров, а также возможных молекулярных мишенией для химиотерапевтических воздействий. Очевидно, что данный раздел диссертационной работы Н.В. Пашинцевой обладает существенной научно-практической ценностью.

Представленные в заключительном разделе диссертации результаты апробации биотест-системы, сформированной на основе культивируемой клеточной линии рабдомиосаркомы RD, свидетельствуют о том, что эта биотест-система может найти применение в экспериментах по изучению влияния некоторых биологически активных веществ на клеточную пролиферацию.

Перечисленные результаты и ряд других материалов, имеющихся в диссертации Н.В. Пашинцевой, свидетельствуют о том, что представленная работа обладает высокой научно-практической ценностью и содержит решения научной задачи, имеющей значение для развития белковой биохимии злокачественных клеток.

Научная новизна положений, выводов и рекомендаций исследования.

Выбрав для своих исследований в качестве одного из основных биообъектов сравнительно малоизученные клетки линии RD, диссидент получила ряд новых результатов при масс-спектрометрической идентификации 61 белковой фракции, среди которых оказалось несколько белков, ассоциируемых со злокачественной трансформацией клеток. Важно отметить, что среди этих мажорных белков в клетках линии RD протеомными технологиями был впервые идентифицированы изоформы белка SFPQ, который известен как регулятор не только сплайсинга, но и других ключевых процессов, проходящих при генной экспрессии в злокачественных клетках. При этом как оказалось

одна из изоформ белка SFPQ, обнаруженная в клеточной линии RD, представляет собой новый продукт постсинтетической модификации, обусловленной фосфорилированием по остатку треонина в 168 положении. Кроме того, Н.В. Пашинцева впервые показала, что среди мажорных белков в клетках RD присутствуют три укороченных варианта SFPQ (с молекулярными массами 55, 55 и 46 кДа).

Особо хотелось бы отметить новизну описанной в диссертации отечественной БД «ПЗК», что подтверждается ее включением в Государственный реестр баз данных (регистрационный номер 2017620475).

Также представляется целесообразным указать и на новые результаты, полученные автором при изучении биологической активности трех синтетических производных флавоноидов в экспериментах с использованием оригинальной клеточной биотест-системы.

Все выше отмеченные и характеризующиеся новизной данные стали основой для соответствующих выводов и рекомендаций, которые имеются в диссертации Н.В. Пашинцевой.

Достоверность и степень обоснованности выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Анализ представленной рукописи диссертационной работы Н.В. Пашинцевой позволяет сделать заключение о достоверности и обоснованности выводов, сформулированных автором. Эта рукопись оформлена вполне традиционно, в ней имеются введение, обзор литературы (глава 1), необходимая информация об использованных материалах и методах (глава 2), описание полученных результатов (глава 3), заключение и список цитированной литературы, насчитывающий 329 ссылок на различные источники, более 100 из которых были опубликованы за последние пять лет.

Во введении Н.В. Пашинцева обосновала выбор цели своей работы и исследовательские задачи, которые она решала для достижения этой цели. В обзоре литературы представлен анализ современных биохимических и биотехнологических подходов, используемых для изучения различных белков, участвующих в регуляции жизнеспособности опухолевых клеток человека. При этом естественно особое внимание было сосредоточено на протеомных технологиях и их применении в отношении злокачественных клеток человека. Таким образом, сведения, собранные в обзоре литературы, непосредственно связаны с диссертационной темой и позволяют объективно оценивать проведенные диссертантом исследования, а также делать обоснованные выводы.

Знакомство с главой 2, в которой описаны использованные в работе материалы и методы дает основание считать, что автор располагала значительным количеством линий злокачественных клеток, которые стали объектами протеомных исследований, и овладела значительным и разнообразным методическим арсеналом, полностью соответствовавшим решавшимся задачам. Соответственно, достоверность результатов (глава 3), полученных на вполне репрезентативном биоматериале, и сделанных из них шести выводов сомнений не вызывает.

Важно отметить, что результаты и выводы, имеющиеся в рассматриваемой диссертации, нашли достаточно полное отражение в четырнадцати публикациях автора, среди которых три статьи в зарубежных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Кроме того, эти результаты и выводы изложены в разосланном автореферате, а также неоднократно представлялись для обсуждения на международных и отечественных конференциях.

В целом, к результатам и выводам диссертации Н.В. Пашинцевой существенных замечаний нет, однако при рассмотрении данной работы возникают некоторые вопросы и частные замечания.

Дискуссионные положения работы, замечания и рекомендации в адрес соискателя.

В плане дискуссии хотелось бы обратить внимание автора на то, что ею изучались белки в достаточно большом количестве линий злокачественных клеток (три линии саркомных клеток, три линии клеток adenокарцином и др.). Однако в сравнительный протеомный анализ были включены только два вида нормальных клеток человека и практически совсем не изучались клетки доброкачественных опухолей. Естественно, невозможно рассчитывать на то, что в кандидатской диссертации реально (или даже целесообразно) охватить исследованиями существенно большее число клеточных линий разной природы, но было бы интересно узнать мнение диссертанта, во-первых, о том насколько вероятно сохранение выявленных закономерностей в протеомных профилях других нормальных клеток, касающихся белков SFPQ, DJ-1 и hnRNP A1. Во-вторых, в молекулярной онкологии для решения многих биомедицинских задач особое значение приобретет сравнение клеток злокачественных и доброкачественных опухолей, соответственно, представляется важным обсудить перспективы развития выполненных исследований в указанном направлении.

В качестве замечаний можно отметить следующее. В разделе 1.2 обзора литературы («Ключевые сигнальные пути и белки, участвующие в обеспечении клеточной жизнеспособности») Н.В. Пашинцева достаточно хорошо описала несколько основных

сигнальных путей, выявленных в опухолевых клетках, но практически оставила без внимания те четыре белка, которые активно изучались в данной работе. Литературные сведения, касающиеся изучения участия этих белков в регуляции жизнеспособности клеток человека, почему-то приведены далее, только в разделе 1.5, что представляется нелогичным. Кроме того, из материалов обзора литературы трудно понять, почему именно эти четыре белка были выбраны автором для своей работы.

В рукописи диссертации Н.В. Пашинцевой имеется значительный и в целом добротный иллюстративный материал (30 рисунков и 10 таблиц). Однако некоторые иллюстрации выглядят громоздкими и/или трудно читаемыми. Особенно это касается рисунков, иллюстрирующих результаты масс-спектрометрического анализа отдельных белковых фракций (например, Рис. 12 и 15). Учитывая то, что подобные материалы обобщены в БД «ПЗК», можно рекомендовать автору активнее использовать ссылки на указанный биоинформационный ресурс.

Отмеченные дискуссионные положения, замечания и рекомендации не затрагивают основного содержания рассматриваемой диссертационной работы и никак не влияют на ее общую положительную оценку.

Заключение о соответствии диссертации требованиям Положения о присуждении ученых степеней

По теоретической и практической значимости результатов проведенного исследования, актуальности выбранной темы, научной новизне авторского подхода, достоверности и обоснованности научных результатов, диссертационная работа Пашинцевой Натальи Валентиновны, отвечает требованиям к кандидатским диссертациям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.04 – Биохимия и 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

Главный специалист лаборатории метаболомного и
протеомного анализа Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Федеральный
исследовательский центр питания, биотехнологии
и безопасности пищи», доктор биологических наук
по специальности 03.01.04 – Биохимия,
профессор А.В. Васильев



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи». 109240, г. Москва, Устьинский проезд, дом 2/14.
Тел.: +7 (495) 698-54-07
Электронный адрес официального оппонента:mednutrition@mail.ru

Подпись д.б.н., проф. А.В. Васильева заверяю.

Ученый секретарь ФГБУН «ФЦП «питания»
биотехнологии и безопасности пищи»
доктор биологических наук

Н.М.Шилина



«28» февраля 2018 г.