

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ  
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА  
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ  
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело №\_\_\_\_\_

Решение диссертационного совета от 5 апреля 2018 г. № 8 о присуждении  
Пашинцевой Наталье Валентиновне, гражданство Российской Федерации, ученой  
степени кандидата биологических наук

Диссертация «Протеомное изучение отдельных белков, участвующих в регуляции  
жизнеспособности культивируемых опухолевых клеток человека» по специальностям  
03.01.04 Биохимия и 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята  
к защите 2 февраля 2018 г. (протокол № 2) диссертационным советом Д 002.247.01 на  
базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский  
центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071,  
Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет утвержден Рособрнадзором  
Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г. с учетом  
изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от  
13.02.2013 г. № 74/нк и от 10.02.2014 г. №55/нк и с учетом переименования Совета от  
30.09.2015 г. № 1166/нк.

**Соискатель**

Пашинцева Наталья Валентиновна (1991 года рождения) в июне 2013 г. с  
отличием окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего профессионального образования «Московская государственная  
академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина» по  
специальности «Биохимия», и в октябре 2013 г. поступила в очную аспирантуру

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук.

Диссертационную работу соискатель Пашинцева Н.В. выполняла в лаборатории биомедицинских исследований Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

**Научные руководители:**

Шишкин Сергей Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биомедицинских исследований Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»;

Лисицкая Ксения Валерьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биомедицинских исследований Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

**Официальные оппоненты:**

Васильев Андрей Валериевич, доктор биологических наук, профессор, главный специалист лаборатории метаболомного и протеомного анализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»;

Рыбалкина Екатерина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики опухолевых клеток Научно-исследовательского института канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что доктор биологических наук, профессор Васильев Андрей Валериевич является одним из ведущих отечественных специалистов в биохимических исследованиях белков, в частности с применением протеомных технологий;

тем, что кандидат биологических наук, Рыбалкина Екатерина Юрьевна известна как крупный специалист в области культивирования клеток злокачественных опухолей человека и использования их в качестве моделей для создания различных биотест-систем.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Пашинцевой Н.В.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) в своем положительном отзыве, подписанным заведующим лабораторией медицинской биотехнологии ИБМХ Соколовым Н.Н. и утвержденном директором ИБМХ академиком Лисицой А.В., указала, что диссертационная работа Пашинцевой Н.В является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. 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).

Выбор ведущей организации был обусловлен с тем, что ИБМХ является признанным отечественным центром протеомных исследований, в котором лаборатория медицинской биотехнологии активно проводит изучение роли различных белков (в частности, теломераз) в обеспечении жизнеспособности злокачественных клеток, а также располагает значительным опытом решения различных биотехнологических задач. Таким образом, сотрудники ИБМХ и, в частности, указанной лаборатории являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы Н.В. Пашинцевой

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

**Публикации.**

Основные результаты диссертационной работы Пашинцевой Н.В. изложены в 5 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о

присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. Пашинцева Н.В., Лисицкая К.В., Ковалев Л.И., Еремина Л.С., Шишkin С.С. Протеомное изучение белков в культивируемых клетках рабдомиосаркомы (RD) и некоторых других клетках. // Современные проблемы науки и образования. 2015. Т. 5. <http://www.science-education.ru/pdf/2015/5/587.pdf>.
2. Pashintseva N.V., Shishkin S.S., Lisitskaya K.V., Kovalev L.I., Kovaleva M.A., Eryomina L.S., Kamenikhina I.A., Novikova L.A., Sadykhov E.G. Study of Splicing Factor, Proline- and Glutamine-rich by Proteomic Techniques in Human Malignant and Nonmalignant Cell Lines. // Protein & Peptide Letters. 2016. V. 23 N 11. P. 958-966.
3. Shishkin S.S., Eremina L.S., Pashintseva N.V., Kovalev L.I., Kovaleva M.A. Cofilin-1 and Other ADF/Cofilin Superfamily Members in Human Malignant Cells. // Int. J. Mol. Sci. 2016. Dec 22;18(1). pii: E10. doi: 10.3390/ijms18010010.
4. Пашинцева Н.В., Еремина Л.С., Лисицкая К.В., Иванов А.В., Ковалев Л.И., Ковалева М.А., Шишkin С.С. Идентификация представителей белкового семейства hNRNP и других белков, обеспечивающих спlicing, в культивируемых клетках человека. // Российский биотерапевтический журнал. 2017. Т. 16. № 2. С. 82-90.
5. Eremina L., Pashintseva N., Kovalev L., Kovaleva M., Shishkin S. Proteomics of mammalian mitochondria in health and malignancy: From protein identification to function. // Anal. Biochem. 2017. pii: S0003-2697(17)30143-4. PMID:28385360.

Кроме того, результаты докторской работы Пашинцевой Н.В. нашли отражение в еще одной журнальной статье - Шишkin С.С., Ковалев Л.И., Пашинцева Н.В., Еремина Л.С., Иванов А.В., Садыхов Э.Г. Протеомные базы данных в России. Биотехнологические аспекты. // Актуальная биотехнология. 2016. Т. 3 № 18. С. 42-47. (Индексируется в РИНЦ).

Результаты работы также были представлены на 6 международных и 2 российских конференциях (и опубликованы в материалах этих конференций) в частности:

- на Международной научно-практической конференции «Проблемы медицины в современных условиях» (Казань, 2014);
- на IV международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014);
- на 5-ом Съезде биохимиков России (Сочи, 2016);
- на 3-ей Международной научной конференции «Постгеномные технологии в медицине: от теории к практике» (Воронеж 2017).

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

**На диссертацию поступили следующие отзывы:**

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора Васильева А.В. (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

- 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 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.

Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук Рыбалкиной Е.Ю. (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

- 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 тексте диссертации используются 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».
- Представленные интересные данные о специфичных изменениях протеомного профиля в злокачественных клетках под действием некоторых флавоноидов, позволяющие предполагать наличие определенных белковых мишней, служат основанием для желания продолжить изучение механизма такой биологической активности.

Отзыв ведущей организации – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

- 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 кратко, отразить перспективность указанного направления исследований.

- 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.
- В работе присутствуют отдельные оформительские недостатки. 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 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., 2016б], а на стр. 35 [Wang, Gao, 2016а]. Такой способ цитирования создает некоторые трудности для читателя, которые можно было 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).

#### **На автореферат поступили положительные отзывы от:**

Чернова Николая Николаевича, доктора биологических наук, профессора, профессора кафедры биохимии Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов», замечаний нет;

Якуниной Марины Николаевны, доктора ветеринарных наук, старшего научного сотрудника лаборатории комбинированной терапии опухолей Научно-исследовательского института Экспериментальной диагностики и терапии опухолей

Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, замечаний нет;

Поповой Татьяны Николаевны, доктора биологических наук, профессора, заведующей кафедры медицинской биохимии и микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет», замечаний нет;

Лопиной Ольги Дмитриевны, доктора биологических наук, профессора, ведущего научного сотрудника, руководителя группы кафедры биохимии Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»,

В отзыве имеются следующие вопросы:

Автор проводил изоэлектрофокусирование белков клеток в диапазоне значений pH 4,5-10,3. Таким образом, белки с изоэлектрическими точками в диапазоне от 3,0 до 4,5 остались вне зоны исследования. Хотелось бы знать, почему диссертант не исследовал белки в этой области pH. Кроме того, на рис. 6, где представлено дозо-зависимое действие препаратов, минимальная концентрация всех трех препаратов обеспечивает небольшой активирующий эффект. Хотелось бы уточнить, является ли этот эффект достоверным.

Варфоломеева Сергея Дмитриевича, член-корр. РАН, доктора химических наук, профессора, руководителя отдела биокатализа и физической химии биопроцессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

В отзыве имеются следующие пожелания:

При продолжении исследований включить клинические материалы (операционные образцы и/или биоптаты злокачественных опухолей) и расширить спектр анализируемых нормальных клеток.

#### **В дискуссии приняли участие:**

Доктор химических наук, профессор Ярополов А.И., доктор химических наук, профессор Синицын А.П., доктор биологических наук, профессор Левицкий Д.И.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты**:

- В культивируемой клеточной линии рабдомиосаркомы RD проведена масс-спектрометрическая идентификация 61 белковой фракции, среди которых оказались белки, участвующие в регуляции жизнеспособности культивируемых опухолевых клеток человека (DJ-1, кофилин 1, гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 (hnRNP A1), сплайсинг фактор, богатый пролином и глутамином (SFPQ) и др.).
- Злокачественные клетки человека характеризуются повышенным по сравнению с нормальными клетками содержанием полноразмерного белка SFPQ, а также белков DJ-1 и hnRNP A1.
- Результаты проведенного протеомного изучения обобщены в виде информационного модуля «Белки клеток рабдомиосаркомы RD», который включен в базу данных «Протеомика злокачественных клеток» (<http://ef2.inbi.ras.ru>).
- На основе культивируемых клеток линии рабдомиосаркомы человека (RD) сформирована и апробирована биотест-система, пригодная для определения влияния различных биологически активных веществ на клеточную пролиферацию.
- Показано, что биологически активные вещества, синтезированные на основе флавоноидов (олигомерный катехин, олигомерный дигидрокверцетин и препарат, полученный ферментативной дериватизацией дигидрокверцетина с параамиnobензойной кислотой), проявляют сходную доза-зависимую активность.

**Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:**

Проведенный протеомный анализ ряда культивируемых клеток человека показал, что изоформы полноразмерного белка SFPQ, а также белки DJ-1 и hnRNP A1 характеризуются повышенным содержанием в злокачественных клетках по сравнению с нормальными и могут играть важные роли в метаболизме злокачественных клеток. Кроме того, при сравнительном протеомном анализе изученных клеточных линий различных сарком было выявлено наличие белка SFPQ в опухолевых клетках и отсутствие этого белка в нормальных мезенхимальных клетках.

Проведено изучение биологической активности трех синтетических флавоноидов: олигомерного (+) катехина (олигоКХ), олигомерного дигидрокверцетина (олигоДГК) и продукта ферментативной реакции гетеросочетания ДГК с параамиnobензойной кислотой (ДГК-АБК). Полученные результаты свидетельствуют, что олигоКХ, олигоДГК и ДГК-АБК сходным образом влияют на клеточную пролиферацию, снижая количество жизнеспособных клеток, причем препарат ДГК-АБК оказывал более выраженный цитотоксический эффект на клетки рабдомиосаркомы человека (RD).

### **Практическая значимость работы заключается в том, что:**

Сформирован новый информационный модуль («Белки клеток рабдомиосаркомы RD»), который введен в отечественную базу данных «Протеомика злокачественных клеток» (БД «ПЗК», включенную в Государственный реестр баз данных, регистрационный номер 2017620475). БД «ПЗК» открыта для Интернет-пользователей (<http://ef2.inbi.ras.ru>). Таким образом, собранные в этом модуле, а также другие материалы БД «ПЗК» могут быть использованы любыми исследователями, изучающими особенности протеомных профилей злокачественных клеток человека с целью поиска потенциальных белковых биомаркеров, а также возможных молекулярных мишений для химиотерапевтических воздействий.

Сформирована и апробирована биотест-система на основе культивируемой клеточной линии рабдомиосаркомы RD, которая может быть использована для определения влияния различных биологически активных веществ на клеточную пролиферацию злокачественных клеток мезенхимального происхождения.

### **Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:**

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

### **Личный вклад соискателя состоит:**

- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке публикаций по выполненной работе.

### **Заключение**

Диссертация Пашинцевой Н.В. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого набора современных методов, взаимосвязанностью выводов и результатов, а также публикациями в рецензируемых журналах (5 статей). Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком

методическом уровне и содержит решение научной задачи, имеющей важное значение для развития биохимии белков и биотехнологии клеточных культур.

На заседании 5 апреля 2018 года диссертационный совет принял решение присудить Пашинцевой Наталье Валентиновне ученую степень кандидата биологических наук по специальностям 03.01.04 Биохимия и 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 11 докторов биологических наук, 7 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета Д 002.247.01, и трех докторов наук, входящих в специализированный диссертационный совет Д 002.247.02 по специальности 03.01.06. Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и временно включенных в состав совета Д 002.247.01.

«За» присуждение ученой степени – 22,

«Против» – нет,

Недействительных бюллетеней – нет.

Заместитель председателя диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

доктор биологических наук, профессор



М.С. Крицкий

Ученый секретарь диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

кандидат биологических наук

  
А.Ф. Орловский

« 5 » апреля 2018 г.

