

Отзыв официального оппонента на диссертационную работу

Кочетковой Елены Юрьевной

«Роль аутофагии в ответе Ras-экспрессирующих опухолевых клеток на действие киназных ингибиторов»

Представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
(специальность 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология»)

Актуальность и новизна работы:

Диссертационная работа Е.Ю. Кочетковой посвящена разработке стратегии элиминации Ras-трансформированных клеток. Значимой проблемой опухолевой терапии является способность опухолей приобретать толерантность к действию противоопухолевых агентов. Одними из наиболее устойчивых к терапии являются HRas-экспрессирующие опухоли. Эта устойчивость связана с активацией в клетках при действии противоопухолевых препаратов и киназных ингибиторов цитопротективных процессов, в частности, аутофагии. Таким образом, актуальным является поиск путей, направленных на подавление цитопротективных процессов в злокачественных клетках при действии противоопухолевых препаратов. Принципиально новым результатом исследования Е.Ю. Кочетковой является то, что индукция клеточного старения делает Ras-экспрессирующие опухолевые клетки грызунов и человека чувствительными к киназному ингибитору MEK/ERK-пути, который вызывает в них массовую гибель. Полученные Е.Ю. Кочетковой данные позволяют предложить новую стратегию элиминации Ras-экспрессирующих опухолевых клеток.

Научно-практическая значимость работы:

Диссертационная работа Е.Ю. Кочетковой носит, с одной стороны, фундаментальный характер, так как полученные данные проливают свет на различия в протекании аутофагии в контрольных и индуцированных к старению клетках, тогда как с другой стороны, данное исследование имеет потенциальное практическое значение для разработки терапии борьбы с Ras-экспрессирующими опухолями. Особая значимость работы связана с тем, что, согласно последним данным, аутофагия способствует поддержанию жизнеспособности и толерантности к терапии опухолей самых разных типов. В связи с этим, разработка новых стратегических подходов, направленных на

подавлении аутофагии, активирующейся в ответ на действие киназных ингибиторов, является высоко актуальной.

Структура и содержание работы:

Диссертация Е.Ю. Кочетковой изложена на 149 страницах, построена по стандартному плану и включает в себя главы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заклучение и выводы», «Список литературы», состоящий из 197 пунктов (из которых 196 на английском языке), и «Благодарности». Диссертация проиллюстрирована 36 рисунками. В качестве общего комментария хочется отметить логичность изложения результатов, а также высокое качество иллюстративного материала.

«Введение» включает в себя традиционные подглавы «Цели и задачи», «Научная новизна», «Теоретическое и практическое значение работы», «Апробации», «Личный вклад автора», «Финансовая поддержка», «Список опубликованных работ». Цель работы и задачи сформулированы достаточно четко и понятно.

Глава «Обзор литературы» содержит подробное изложение имеющихся научных данных по теме диссертации. Обзор литературы охватывает достаточно широкий спектр тем и демонстрирует хорошую осведомленность автора в исследуемой ею тематике. Автор подробно рассматривает двоякую роль аутофагии в туморогенезе, тумор-супрессорные и тумор-промотирующие аспекты клеточного старения, а также роль mTOR-сигналинга в метаболизме злокачественных клеток. Кроме того, автор уделяет внимание современному состоянию противоопухолевой терапии, привлекая литературные данные об использовании ингибиторов аутофагии и ингибиторов mTOR-киназы в противоопухолевой терапии. Отдельное внимание автор уделит роли митохондрий в энергетическом метаболизме Ras-экспрессирующих опухолевых клеток.

В целом, «Обзор литературы» написан хорошим языком и дает достаточное представление обо всех аспектах, исследуемой автором проблемы. Однако имеется ряд замечаний. Хотелось бы, чтобы автор более подробно раскрыл проблему взаимоотношения процессов аутофагии и клеточного старения. Кроме того, в обзоре недостает главы, посвященной сравнению процессов старения в нормальных и опухолевых клетках. Также

для упрощения восприятия материала при чтении этой части диссертации хотелось бы видеть большее количество схем и иллюстраций.

В Главе «Материалы и методы» приводится детальное описание использованных в работе экспериментальных подходов: культивирование клеток, морфологический анализ, иммунофлуоресценция, конфокальная микроскопия, электронная микроскопия, Вестерн-блоттинг, проточная цитометрия, а также подробный анализ маркеров клеточного старения. В целом, в работе использован широкий спектр современных клеточных и молекулярных методов, позволяющих выполнить поставленные в исследовании задачи. Используемые методы описаны достаточно подробно.

Глава «Результаты» содержит подробное описание выполненных экспериментов. Ключевыми результатами диссертационной работы Е.Ю. Кочетковой представляются следующие:

1. Ингибирование MEK/ERK-пути приводит к повреждению митохондрий и активации апоптотической гибели части популяции. Однако клетки становятся толерантными к действию ингибитора MEK/ERK-пути, за счет восстановления пула функциональных митохондрий и жизнеспособности клеток. Это происходит благодаря активации AMPK-регулируемой цитопротективной аутофагии;
2. Стареющие клетки не могут завершать процесс цитопротективной аутофагии в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути и претерпевают гибель. Причина связана с пространственным разобщением финальных участников канонической аутофагии - аутофагосом и лизосом, а также с перемещением онкогенного Ras в цитоплазму. Этот результат представляется принципиально новым в ряду многочисленных современных данных, посвященных способам элиминации злокачественных клеток;
3. При ингибировании MEK/ERK-пути как контрольные, так и стареющие клетки сохраняют активность mTOR-киназы в составе комплекса mTORC1. Автор высказал предположение, что высокая активность mTORC1 не позволяет завершиться цитопротективной аутофагии. Однако ингибирование активности mTORC1 не восстанавливает аутофагию и жизнеспособность клеток при действии PD0325901.

Хочется отметить, что способность злокачественных клеток активировать аутофагию в ответ на действие противоопухолевых препаратов является фактором, осложняющим терапию в случае многих видов рака, не только сарком и карцином, но и для гемопоэтических видов рака, в частности, хронической миелоидной лейкемии. Хроническая миелоидная лейкемия

связана с образованием Bcr-Abl онкопротеина с тирозин-киназной активностью, в число мишеней которого входят, в том числе, сигнальные каскады Ras-ERK и JNK. Согласно клиническим исследованиям, применяемые для терапии ХМЛ тирозин-киназные ингибиторы Bcr-Abl (иматиниб, дазатиниб) не дают стопроцентной эффективности вследствие развития лекарственной резистентности, в основе которой лежит, в том числе, и активация в клетках процесса цитопротективной аутофагии. Поэтому разработка эффективной стратегий противоопухолевой терапии, основанной на ингибировании процесса аутофагии, является обоснованной частью развития химиотерапии. В этом плане диссертационная работа Е.Ю. Кочетковой заслуживает внимания в связи с тем, что предлагает новую стратегию, альтернативную стратегии использования комбинации тирозин-киназных ингибиторов и ингибиторов аутофагии (хлороквин, гидроксихлороквин) одновременно.

В качестве замечаний к этой главе можно отметить следующее:

Согласно Рис 15 (глава 4.2), апоптотическая гибель клеток ERas при действии NaBut+PD0325901 характеризуется более выраженным повышением активности каспазы 8 (апоптоз, опосредованный через рецепторы смерти), чем каспазы 9 (апоптоз, развивающийся вследствие повреждения митохондрий); автор отмечает это, однако не высказывает своих объяснений на эту тему.

Согласно приведенным на Рис. 35 данным, гибель, которую претерпевают клетки аденокарциномы человека A549 при совместном действии индуктора старения и MEK/ERK-ингибитора, является не апоптотической. Однако автор ни в Результатах, ни в Обсуждении никак не анализирует этот результат и не делает каких-либо предположений по этому поводу.

Автор проанализировал активность стресс-киназы p38, обосновав этот эксперимент. Однако также вызывает интерес вопрос, меняется ли активность стресс-киназ JNK1,2 при ингибировании MEK/ERK-пути в клетках.

В главе «Обсуждение» автор анализирует полученные данные. Нужно отметить, что автор, во-первых, сравнивает полученные им данные с последними результатами других авторов. Приведенные в Обсуждении сравнения с результатами других исследований дают основание считать, что автор достаточно активно следит за новыми работами, публикуемыми по темам аутофагии, клеточного старения, mTOR-сигналинга и другим научным темам, затронутым в данной диссертации. Во-вторых, в ходе

анализа полученных данных автором делается ряд логичных выводов и предположений, дающих богатую почву для дальнейшего развития исследований по тематике данной диссертации. В качестве пожеланий к этой главе хотелось бы, чтобы автор более подробно обсудил механизмы, поддерживающие активность комплекса mTORC1 в условиях полного отсутствия активности ERK1,2-киназ, которые, как известно из литературных данных, активируют комплекс mTORC1.

В главе «Заключение и выводы» приведены выводы, сделанные на основе полученных экспериментальных данных, предваряющиеся общим заключением. Выводы логически вытекают из полученных данных и соответствуют целям и задачам, поставленным во Введении. Диссертация написана хорошим, понятным языком, несмотря на некоторое количество опечаток, не содержит стилистических погрешностей и сленга, практически не содержит англицизмов (за исключением термина «аутофагический флюкс» на стр. 72, желательно подобрать для этого термина более удачный аналог на русском языке).

Тем не менее, хочется отметить, что все высказанные замечания являются в большей степени дискуссионными и не уменьшают высокой научной значимости данной работы.

Автореферат написан понятным языком и полностью отражает содержание диссертации.

По теме диссертации автором было опубликовано 6 статей в рецензируемых научных журналах и 4 тезисов докладов. Результаты исследований докладывались на 7 конференциях, в том числе международных.

Заключение

Считаю, что диссертационная работа Е.Ю. Кочетковой «Роль аутофагии в ответе Ras-экспрессирующих опухолевых клеток на действие киназных ингибиторов» под руководством Пospelовой Т.В. является целостным и завершенным научно-квалификационным исследованием. Результаты в полной мере обоснованы. Диссертация дополнена иллюстрациями высокого качества. Полученный Е.Ю. Кочетковой результат дает совершенно новую идею стратегии борьбы с Ras-трансформированными опухолями. Сделанные замечания никак не влияют на высокую научную значимость выполненного диссертационного исследования.

Считаю, что диссертационная работа Е.Ю. Кочетковой соответствует всем требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней»

