



Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России)

Ленинградская ул., дом 68, пос. Песочный, Санкт-Петербург, 197758; тел. (812) 439-9555, факс (812) 596-8947,
e-mail: oncl@rion.spb.ru; https://www.niioncologii.ru ОКПО 01897995; ОГРН 1027812406687; ИНН 7821006887; КПП 784301001

№ _____

«Утверждаю»

Директор ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Петрова» Минздрава России
Д.м.н., профессор



29 марта 2019

А.М. Беляев

ОТЗЫВ

ведущей организации

на диссертацию Кочетковой Елены Юрьевны «Роль аутофагии в ответе Ras-экспрессирующих опухолевых клеток на действие киназных ингибиторов», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Основные научные результаты и их актуальность для науки и практики

Основным научным результатом работы Кочетковой Е.Ю. является выявление и исследование нового способа отмены толерантности Ras-экспрессирующих клеток к киназному ингибитору Ras-пути. Активация процесса старения приводит к инаktivации процесса цитопротективной с-АМРК-зависимой аутофагии, вызванной повреждением митохондрий и падением уровня АТФ при подавлении MEK/ERK1,2 ингибитором Ras-пути. Впервые показано, что стареющие клетки благодаря компарментализации органелл не могут завершать процесс аутофагии, уничтожать поврежденные митохондрии и восстанавливать жизнеспособность опухолевых клеток. Следствием нарушения процесса аутофагии в стареющих клетках становится апоптотическая гибель Ras-экспрессирующих опухолевых клеток.

Полученные Е.Ю. Кочетковой данные могут быть использованы для разработки новой стратегии терапии Ras-экспрессирующих опухолей.

Общая оценка работы

Диссертация написана хорошим языком по стандартной схеме, изложена на 149 страницах машинописного текста. Список литературы включает 197 наименований. Большинство цитируемых материалов опубликовано в последние годы в ведущих научных журналах непосредственно относятся к теме диссертационной работы.

В первой главе «Введение» дается исчерпывающая характеристика сведений об устойчивости Ras-экспрессирующих опухолей к терапии различными цитостатиками и облучением. Подчеркивается, что степень эффективности терапии обусловлена тем, что при повреждении Ras-экспрессирующих опухолевых клеток активируется аутофагия, которая восстанавливает поврежденные клетки, приводя к возобновлению пролиферации. Не была выявлена высокая эффективность действия ингибиторов аутофагии на жизнеспособность опухолевых клеток, экспрессирующих мутантный белок семейства Ras (Ha-Ras и Ki-Ras). Применение ингибиторов белка Ras также не выявило эффективный способ его инактивации, однако поиск в этом направлении продолжается. Цели и задачи диссертационного исследования сформулированы четко и понятно. Они включают новый подход к уничтожению агрессивных Ras-опухолей, основанный на одновременном использовании активатора старения ингибитора гистоновых деацетилаз бутирата натрия и ингибитора нижележащих мишеней Ras-пути PD0325901, подавляющего фосфорилирование ERK1,2-киназ, которые, в свою очередь, контролируют транскрипционные факторы, ответственные за нерегулируемую пролиферацию этих клеток.

В главе «Обзор литературы» на 32 страницах приведен обзор литературы по теме диссертации. Значительное внимание уделено механизмам

злокачественной трансформации клеток и роли аутофагии в ней. Отдельные разделы посвящены малой ГТФазе Ras, клеточному старению и аутофагии, а также роли аутофагии в ответе опухолевых клеток на терапию. Обзор литературы дает представление о связи процессов аутофагии с процессами трансформации и старения клеток. Весьма интересны приведенные в обзоре последние данные о роли старых клеток в организме. В настоящее время изучение клеточного старения привлекает к себе особое внимание, так как установлено, что оно вовлечено во многие фундаментальные физиологические и патологические процессы в организме, включая супрессию опухоли, эмбриональное развитие и обновление тканей. Стареющие клетки способствуют обновлению тканей после повреждения, поставляя микроокружению интерлейкины (в частности, IL6), что приводит к активации факторов репрограммирования (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc). Поскольку киназа mTOR является ключевым регулятором и процесса клеточного старения, и процесса аутофагии одновременно, она привлекает к себе внимание как перспективная мишень в исследованиях ответа опухолевых клеток на повреждающие агенты. В работе Е.Ю. Кочетковой рассматривается предположение, что высокая конститутивная активность mTOR в составе комплекса mTORC1, характерная для старых клеток, не позволяет развиваться канонической аутофагии в ответ на действие киназного ингибитора Ras-пути. Эта гипотеза является ключевой в диссертационной работе Кочетковой Е.Ю., которая направлена на исследование закономерностей аутофагического ответа при ингибировании MEK/ERK-пути в исходных и стареющих Ras-экспрессирующих опухолевых клетках. Принципиально важным является вопрос о связи процессов аутофагии и старения, поскольку имеющиеся данные по этому вопросу противоречивы. В обзоре литературы этому вопросу посвящен относительно небольшой раздел. Было бы целесообразно, чтобы автор рассмотрел этот вопрос более подробно.

В главе «Материалы и методы» на 9 страницах описаны материалы и методики, использованные в работе, которые, безусловно, адекватны поставленным задачам и описаны достаточно подробно.

В главе «Результаты» представлены данные, полученные диссертантом. Глава изложена на 48 страницах, содержит 36 рисунков. Е.Ю. Кочетковой был получен неожиданный результат: подавление фосфорилирования ERK1,2 киназ приводило к повреждению митохондрий, что свидетельствует о том, что ERK1,2-киназы играют важную роль в поддержании целостности митохондрий. Повреждение митохондрий приводит к активации АМПК-регулируемой аутофагии, которая восстанавливает жизнеспособность и пролиферативную активность исходных клеток. Однако, при этом не удаляются поврежденные митохондрии в старых клетках, вследствие чего клетки погибают. В диссертационной работе Е.Ю. Кочетковой предпринята первая попытка связать про-апоптотическое действие комбинации индуктора старения и киназного ингибитора MEK/ERK-пути с особенностями организации стареющих клеток. В процессе индуцированного старения клетки приобретают гипертрофный, гиперсекреторный фенотип. Они характеризуются строго определенной организацией цитоплазмы, при которой лизосомы локализируются вокруг ядра, тогда как аутофагосомы распределяются ближе к периферии цитоплазмы. Такое пространственное разобщение аутофагосом и лизосом обеспечивает определенный уровень аутофагии, необходимый для поддержания гипертрофии и SASP-фенотипа стареющих клеток. Е.Ю. Кочеткова впервые установила, что именно эта особенность организации цитоплазмы старых клеток является причиной их высокой чувствительности к действию ингибитора MEK/ERK ветви Ras-киназного пути. Данный вывод об уникальности организации стареющих клеток был получен на основании экспериментальных данных высокого качества. Впечатляют результаты иммунофлуоресцентного анализа и трансмиссионной электронной микроскопии: представлены четкие, высоко

качественные и «говорящие» картины, которые убедительно иллюстрируют основные выводы работы.

Глава «Обсуждение» посвящена обсуждению полученных результатов и изложена на 8 страницах. В этой главе всесторонне обсуждается роль лизосом в поддержании активности комплекса mTORC1 и в ответе клеток на киназный ингибитор, роль митохондрий в поддержании энергетического баланса Ras-трансформированных клеток, а также роль релокализации онкогенного Ras с плазматической мембраны в аутофагические вакуоли в цитозоле. Глава могла бы быть более информативной и полной и включать обсуждение ряда вопросов, которые не получили достаточного рассмотрения. Например, в главе отсутствует анализ причин того, почему подавление mTORC1 с помощью pp242 не привело к активации полноценной mTOR-зависимой аутофагии. Также, недостаточно обсужден вопрос, почему при подавлении mTORC1 киназным ингибитором pp242 не происходит полной отмены процесса старения.

В шестой главе «Заключение и выводы» приводится общее заключение и четыре вывода, которые соответствуют поставленным задачам. Выводы сформулированы достаточно четко и основаны на собственных экспериментальных данных.

Автореферат написан хорошим языком, хорошо проиллюстрирован и полностью отражает содержание диссертации.

Научно-практическая значимость

Исследование Е.Ю. Кочетковой вносит существенный вклад в понимание роли аутофагии в поддержании устойчивости Ras-экспрессирующих опухолей к действию киназных ингибиторов MEK/ERK-пути. Ею впервые установлено, что индукция старения делает Ras-трансформированные клетки

чувствительными к MEK/ERK-ингибитору. Диссертантом показано, что гибель стареющих клеток в ответ на действие киназного ингибитора MEK/ERK-пути обусловлена пространственным разобщением аутофагосом и лизосом в цитоплазме старых клеток, а также релокализацией онкогенного Ras с плазматической мембраны в цитоплазму. Полученные Е.Ю. Кочетковой данные могут быть использованы для разработки новой стратегии терапии Ras-экспрессирующих опухолей.

Общие замечания

В тексте диссертации имеется ряд грамматических ошибок и опечаток, упущенных автором при финальной правке работы.

Рисунок 16 обозначен как рисунок 15, что приводит к путанице.

Есть некоторые претензии к качеству Вестерн-блотов, в частности, на рис. 12 на стр. 77 можно было дать более качественный Вестерн-блот phospho-Ulk1 Ser555.

Автором не указано, какие маркеры старения при действии NaBut выявляются в человеческих Ki-Ras-экспрессирующих опухолевых клетках легкого A549.

Наиболее часто в экспериментах по отмене старения используется ингибитор mTORC1 рапамицин, тогда как в работе Е.Ю. Кочетковой для ингибирования mTORC1 использован киназный пан-ингибитор pp242. Дополнительные эксперименты с рапамицином дали бы более полное представление о роли mTORC1 в аутофагическом ответе Ras-экспрессирующих клеток.

В главе Обсуждение хотелось бы увидеть мнение автора о том, за счет каких механизмов произошла изоляция онкогенного Ras в цитоплазме.

Тем не менее, высказанные замечания и пожелания не умаляют общего высокого научного качества выполненной Е.Ю. Кочетковой диссертационной работы.

Заключение

Диссертация Елены Юрьевны Кочетковой «Роль аутофагии в ответе Ras-экспрессирующих опухолевых клеток на действие киназных ингибиторов», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, отличается выраженной научной новизной. Выводы полностью обоснованы полученными данными. Результаты опубликованы в 6 статьях в рецензируемых научных журналах и 4 тезисах, представлены на научных конференциях, в том числе международных. Представленная работа по научной новизне, актуальности, теоретической и практической значимости и другим параметрам полностью соответствует пп. 9 – 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ, а ее автор, Елена Юрьевна Кочеткова, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология. Отзыв заслушан и утвержден на совместном заседании Отдела канцерогенеза и онкогеронтологии и проблемной комиссии «Биология опухолевого роста» НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, протокол № 108 от 22.03.2019.

Отзыв составил

член-корр. РАН, д.м.н., профессор,
заведующий научным отделом
канцерогенеза и онкогеронтологии
Национального медицинского
исследовательского центра онкологии
им Н.Н. Петрова Минздрава России

Анисимов Владимир Николаевич

Подпись  заверяю
Ученый секретарь  Г.С. Киреева