

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Бычкова Максима Леонидовича «Влияние протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC на развитие опухолевых клеток», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика (биол. науки).

Злокачественные новообразования являются одной из ведущих причин смерти населения как в России, так и в мире, поэтому поиск новых стратегий онкотерапии является актуальной задачей. Одной из наиболее выраженных особенностей метаболизма опухолей является интенсивный метаболизм в опухолевой массе, что приводит к снижению pH микроокружения опухоли. Клетки опухоли успешно адаптируются к низкому pH окружающей среды за счет активации сенсоров pH, таких как протон-чувствительные катионные каналы семейства дегенерин/эпителиальных натриевых каналов (DEG/ENaC). Работа Бычкова М.Л. посвящена исследованию некоторых из этих каналов, а именно ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC. Опираясь на литературные данные об увеличении экспрессии ASIC1a в клетках глиом по сравнению с нормальными астроцитами и формированию опухолеспецифичного гетеротримерного Na⁺ канала, состоящего из субъединиц ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC, в клетках глиом, но не в нормальных астроцитах, Бычков М.Л. исследовал в своей работе механизмы, запускаемые в опухолевых клетках при активации и ингибировании канала ASIC1a.

Диссертация Бычкова М.Л. состоит из введения (с описанием целей и задач исследования), обзора литературы, описания материалов и методов, экспериментальной части с результатами и их обсуждением, заключения и выводов, списка использованной литературы. Диссертация изложена на 117 листах, содержит 38 рисунков и 8 таблиц, 201 ссылку в списке литературы.

В обзоре литературы описаны внутриклеточные пути, запускаемые в опухолевых клетках при закислении среды и оценивается роль сенсоров pH в адаптации клеток к закислению внешней среды. Изложены данные о структуре и механизме работы изучаемых ионных каналов (ASIC1 и ENaC), а также представлены данные о механизмах работы ингибиторов ASIC1a, в том числе и мамбалгина-2, активность которого и исследуется в диссертации.

Материалы и методы описаны достаточно подробно для воспроизведения результатов, использованные методики соответствуют современному уровню развития науки. Эксперименты спланированы на достаточно высоком уровне.

Описание и обсуждение результатов разделено на 3 главы, посвященные механизмам адаптации опухолевых клеток к закислению внешней среды, механизмам, запускаемым при ингибировании каналов, содержащих ASIC1a мамбалгином-2, и исследованию взаимодействия мамбалгина-2 с гетерокомплексом из ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC.

В рамках работы показано, что адаптация опухолевых, но не нормальных клеток к закислению окружающей среды осуществляется за счет гиперэкспрессии и активации протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC, которые содержат субъединицу ASIC1a, а также активации митогенных и про-миграционных сигнальных путей. Мамбалгин-2 – аллостерический ингибитор каналов, содержащих ASIC1a, тормозит рост и миграцию опухолевых клеток, снижая активность про-миграционного транскрипционного фактора SNAIL и экспрессию митогенных факторов CD44 и Frizzled 4, – регуляторов Wnt/ β -катенин-сигнального каскада. Это приводит к падению фосфорилирования циклина D1 и циклин-зависимых киназ CDK4 и CDK6, что запускает в опухолевых клетках арест клеточного цикла и апоптоз. Также, в работе показано, что формирование гетеротримерного протон-чувствительного канала из субъединиц ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC происходит не только в клетках глиом, но и клетках аденокарциномы легкого и меланомы. По полученным данным, мамбалгин-2 ингибирует вызванный закислением ток через гетеротримерный канал значительно эффективнее, чем ток через гомотримерный канал ASIC1a. Для подтверждения данной гипотезы использовано молекулярное моделирование.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что ингибирование работы протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC мамбалгином-2 может стать перспективной стратегией терапии опухолей.

Представленные в диссертации Бычкова М.Л. результаты получены с помощью современных и обоснованно использованных методов, проведен качественный статистический анализ полученных данных. Выводы диссертации подтверждаются полученными в ходе работы результатами. Результаты диссертационной работы отражены в 4 публикациях в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК, в 3 из них Бычков М.Л. является первым автором. Автореферат отражает основное содержание текста диссертации.

Диссертационная работа Бычкова М.Л. выполнена на высоком уровне и заслуживает положительной оценки, однако следует отметить наличие определенных недостатков, несколько не умаляющих работу в целом:


1. Общим замечанием к работе является частая недостаточность детализации полученных результатов. Автор часто пропускает то, как были получены результаты, и чтобы вникнуть детально в работу приходится постоянно делать анализ того, что получено на рисунках и соответствующих глав в разделе «материалы и методы».
2. Для исследования апоптоза в клетках применялся подход с использованием панкаспазного ингибитора z-VAD-FMk с дальнейшим анализом клеточной пролиферации. Почему для этой цели не был применён анализ активности каспаз, который является широко распространенным методом и довольно информативным.
3. Как контролировалась эффективность нокдауна исследуемых генов? Какова была их эффективность?
4. Как был получен флуоресцентно-меченный мамбалгин-2? Кроме того, не совсем понятно, почему меченный мамбалгин-2 локализуется не только на поверхности, но и внутри клеток, происходит ли эндоцитоз белка?
5. В работе также присутствуют опечатки и неточности, так например в тексте неверно указан «рис. 33Д,Е», «интенСовного» вместо «интенСИвного» в подписи к рис 2 (стр. 13), «кааналов» вместо «каналов» (стр. 71), используется научный сленг, например «пентасахаридный кор» (стр. 57).
6. Также используется термин «экспрессия» («Экспрессия субъединиц ASIC/ENaC в ооцитах *Xenopus laevis*», заголовок, стр. 51), хотя правильнее говорить «экспрессия гена», а для белка можно применять выражение «получение белка» (в смысле продукции рекомбинантного белка), либо «уровень экспрессии белка» для оценки содержания белка в образце.

Отмеченные недостатки не являются принципиальными.

Диссертационная работа Бычкова Максима Леонидовича на тему «Влияние протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC на развитие опухолевых клеток» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.2 – Биофизика (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Таким образом, соискатель Бычков Максим Леонидович заслуживает

присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. –
Биофизика (биол. науки).

Заведующий лабораторией функциональной геномики
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-
генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», кандидат биологический
наук


Скоблов Михаил Юрьевич

03 апреля 2023 года

Подпись кандидата биологических наук Скоблова Михаила Юрьевича заверяю.

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», кандидат
медицинских наук




Воронина Екатерина Сергеевна