

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт теоретической и экспериментальной биофизики  
Российской академии наук  
(ИТЭБ РАН)

УТВЕРЖДАЮ

Врио. директора ИТЭБ РАН

доктор физико-математических наук



Чуев Г.Н.



«09» ноября 2022 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертационной работы Горбуновой Анны Сергеевны «Роль белков контроля качества митохондрий в прогрессировании аденокарциномы легкого», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

#### Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Горбуновой Анны Сергеевны посвящена исследованию роли белков контроля качества митохондрий в прогрессировании клеток аденокарциномы легкого (АКЛ). Особое внимание уделено роли белка BNIP3, одного из членов семейства Bcl-2, в процессе гибели клеток различных линий АКЛ.

Выяснение молекулярных механизмов развития АКЛ, одного из самых распространенных и агрессивных подтипов немелкоклеточного рака легких,

представляет собой важную медико-биологическую задачу, решение которой необходимо для разработки новых терапевтических подходов. В последние десятилетия достигнут значительный прогресс в понимании роли митохондрий в прогрессировании канцерогенеза. Показано, что процессы контроля качества митохондрий обуславливают сохранение здоровой популяции митохондрий, предотвращая накопление активных форм кислорода (АФК), которые, в свою очередь, способны стимулировать развитие опухолей. Обнаружены белки, участвующие в контроле качества митохондрий. Однако, роль большинства этих белков в развитии канцерогенеза до сих пор остается не до конца выясненной.

Автором были сформулированы следующие задачи данной диссертационной работы:

- 1) Оценить уровень белков контроля качества митохондрий в образцах пациентов с АКЛ;
- 2) Исследовать корреляции между клинико-патологическими признаками пациентов с АКЛ и уровнем белков контроля качества митохондрий;
- 3) Изучить влияние клинико-патологических признаков и уровня белков контроля качества митохондрий на выживаемость пациентов с АКЛ;
- 4) Выяснить роль BNIP3 в регуляции цисплатин-индуцированного апоптоза в различных линиях клеток АКЛ.

Обоснование темы и задач работы логично и не вызывает сомнений, а работа является актуальной и имеющей как фундаментальное, так и прикладное значение.

Автор комплексно подошла к решению главной проблемы настоящей работы, а именно изучению роли белков контроля качества митохондрий в прогрессировании АКЛ и процессе гибели этих опухолевых клеток, используя разнообразные современные биохимические, молекулярно-биологические подходы и хорошо зарекомендовавшие себя методы статистического анализа. Результаты диссертации Горбуновой А.С. по участию белков, регулирующих митофагию и процессы дробления и слияния митохондрий, могут служить решению актуальной практической задачи – усовершенствованию с помощью

молекулярных факторов прогностических алгоритмов выживаемости пациентов с АКЛ.

### **Объем и содержание работы**

Диссертационная работа изложена на 138 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 207 публикаций отечественных и иностранных авторов. Работа иллюстрирована 9 таблицами и 19 рисунками.

### **Связь с планами соответствующих отраслей науки**

Диссертационная работа Горбуновой Анны Сергеевны выполнялась в соответствии с основными направлениями программы научных исследований кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

### **Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов**

Впервые на основе клинических факторов прогноза (возраста пациента и стадии заболевания) и индексов риска в зависимости от уровней белков контроля качества митохондрий (димерной форма BNIP3, Drp1 и Sirtuin3) была разработана модель для прогнозирования выживаемости пациентов с АКЛ. Проанализировав образцы тканей 80 пациентов с АКЛ, автором убедительно продемонстрированы прямые корреляции уровней белков BNIP3 (димерная и мономерная формы), Drp1, PINK1, BNIP3L/NIX, Mfn2, Sirtuin3 и GPX4, и две обратные корреляции между PINK1 и Drp1, а также между PINK1 и GPX4. Установлено, что уровень белков контроля качества митохондрий может изменяться в зависимости от размера и локализации первичной опухоли, наличия/отсутствия метастаз в лимфатических узлах и стадии, оказывая влияние на прогрессирование АКЛ. Показано, что при индукции клеточной гибели цисплатином снижение уровня BNIP3 в клетках АКЛ сопровождается повышенным уровнем выхода цитохрома c из митохондрий в цитоплазму и активацией апоптозного каскада. В целом результаты исследования расширяют

представление о молекулярных и клеточных механизмах развития АКЛ и роли белков, участвующих в контроле качества митохондрий, в этом процессе.

### **Достоверность результатов и обоснованность выводов**

Научные положения, сформулированные автором в диссертации, основаны на изучении достаточного объема экспериментального материала, проведении статистического анализа полученных данных и публикации основных положений диссертации в научных журналах. Достоверность результатов подтверждается их воспроизводимостью в повторных экспериментах, наличием соответствующих контролей. Для решения поставленных задач были использованы современные биохимические и молекулярно-биологические подходы, а также классические методы статистического анализа. Научные положения и выводы аргументированы и базируются на согласованных данных теоретических и экспериментальных исследований, приведенных в рисунках и таблицах.

По материалам диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых международных научных журналах. Результаты работы представлены на четырех конференциях.

### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Результаты данного исследования существенно дополняют сведения о роли белков контроля качества митохондрий в развитии АКЛ и оценке риска смерти среди пациентов с АКЛ. Важнейшим результатом работы явилось создание номограммы прогнозирования выживаемости пациентов с АКЛ, показавшей прогностическую ценность совокупности исследованных факторов. Помимо этого, полученные результаты в перспективе могут быть полезны для разработки новых и усовершенствования существующих терапевтических подходов при лечении АКЛ.

Диссертация прошла широкое обсуждение. Материалы были представлены на 26-ой, 27-ой и 28-ой ежегодных Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», прошедших в 2019, 2020 и 2021 годах, соответственно, а также на IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (2019 г).

## **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

В диссертационной работе были получены новые данные, касающиеся оценки риска смерти среди пациентов с АКЛ и роли белков контроля качества митохондрий в развитии АКЛ.

Результаты диссертационной работы могут быть использованы в научных медицинских центрах, в частности, в Национальном медицинском исследовательском центре (НМИЦ) онкологии им. Н.Н. Блохина, для прогнозирования выживаемости пациентов с АКЛ, а также при разработке новых терапевтических подходов. Результаты диссертационной работы были внедрены в образовательные программы на факультете фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, войдя в курсы лекций «Токсикология в медицине» и «Программируемая гибель клеток».

### **Личный вклад автора**

Горбунова Анна Сергеевна принимала непосредственное участие в проведении экспериментов на всех этапах исследования. Автор самостоятельно проанализировала литературу по тематике проблемы, осуществила экспериментальную часть работы, статистическую обработку полученных данных, проанализировала и обобщила результаты исследований.

### **Печатные работы, опубликованные по материалам диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых научных журналах, из них: 2 статьи в журнале, входящем в перечень ВАК, 4 статьи в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, и 4 тезиса докладов научных конференций.

### **Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации и автореферата**

Диссертационная работа Горбуновой А.С. построена по традиционному плану и включает список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, приложения с дополнительными материалами, список литературы. Работа

изложена на 138 страницах, содержит 19 рисунков и 9 таблиц. Список цитируемой литературы включает 207 источников. Работа хорошо иллюстрирована, что помогает в ее восприятии.

**Во введении** автор обосновывает актуальность темы исследования, указывает цель и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, положения, выносимые на защиту, объясняет личное участие, степень достоверности работы, время и место апробации работы и внедрение результатов работы, приводит публикации по теме диссертации, конкурсную поддержку работы, объем и структуру диссертации.

**Обзор литературы** представлен на 50 страницах и разбит на подглавы. Стоит отметить, что обзор выстроен весьма логично, написан подробно с использованием значительного количества источников литературы и содержит необходимые сведения для понимания результатов диссертационной работы. В ходе прочтения обзора становятся понятны и обоснованы все поставленные задачи диссертационной работы. Первая подглава описывает эпидемиологию и этиологию аденокарциномы легкого, а также современные подходы к таргетной терапии АКЛ. Вторая подглава посвящена физиологической значимости контроля качества митохондрий. В третьей подглаве уделено внимание программируемой гибели клеток, ее основным формам и их взаимодействию. В четвертой подглаве автор приводит описание BNP3, структуры и регуляции гена и белка, а также данные о роли BNP3 в развитии рака легких.

**Глава «Материалы и методы»** содержит информацию о современных биохимических методах, а также методах молекулярной и клеточной биологии, применяемых в данной работе: плазмидных векторах и малых интерферирующих РНК, клеточных линиях и клинических образцах пациентов с АКЛ, методах анализа митохондрий и клеточной гибели. Отдельный подраздел посвящен статистической обработке полученных результатов.

**Глава «Результаты и обсуждение»** разделена на 2 большие части. В первой части приводятся данные о роли белков контроля качества митохондрий в прогрессировании АКЛ. Для сравнительного анализа уровней исследуемых белков в нормальных и опухолевых тканях А.С. Горбунова использует тщательно подобранные антитела и денситометрический анализ. Автор

показывает, что уровень белков контроля качества митохондрий может изменяться в зависимости от размера и локализации первичной опухоли, наличия/отсутствия метастаз в лимфатических узлах и стадии, оказывая влияние на прогрессирование АКЛ. Далее с помощью регрессионной модели Кокса, которая оценивает размер эффекта различных факторов, автором показано, что димерная форма BNIP3, Drp1 и Sirtuin3 коррелируют с прогнозом общей выживаемости. На основе обнаруженной предсказательной способности белков контроля качества митохондрий автор предприняла попытку разработать номограмму, объединяющую в себе индекс риска в зависимости от уровней димерной формы BNIP3, Drp1 и Sirtuin3 с клиническими факторами прогноза (возраст и стадия). В результате было продемонстрировано, что совместная оценка стадии, возраста и индекса риска в зависимости от уровней димерной формы BNIP3, Drp1 и Sirtuin3 влияет на прогноз общей выживаемости, что позволило разделить всех исследуемых пациентов с АКЛ на группы с высоким, средним и низким риском смерти после постановки диагноза.

Во второй части приведены результаты экспериментов по исследованию BNIP3 как мишени для модуляции программируемой гибели клеток. Продемонстрировано, что ингибирование экспрессии BNIP3 с использованием системы CRISPR/Cas9 или подавление синтеза белка BNIP3 с применением таргетной миРНК может приводить к повышению уровня апоптоза, индуцированного цисплатином. Последующий протеомный анализ с использованием масс-спектрометрического подхода показал, что клетки с пониженным содержанием BNIP3 характеризуются пониженной экспрессией белков, ответственных за метаболизм ксенобиотиков, и повышенным уровнем белков, связанных с регуляцией метаболизма нуклеозидов и РНК-интерференции. Далее Горбунова А.С. убедительно доказала, что клетки АКЛ, дефицитные по BNIP3, более чувствительны к цисплатин-индуцированной гибели по сравнению с клетками дикого типа.

**В заключении** автор суммирует полученные данные, а также высказывает предложения по дальнейшей работе в данной области. Научные выводы и положения, выносимые на защиту, сформулированные автором,

полностью соответствуют заявленным цели и задачам, убедительны и основаны на большом объеме фактического материала. Достоверность приведенных в работе данных не вызывает сомнений: эксперименты выполнены на высоком профессиональном уровне, статистический анализ данных проведен корректно. Результаты работы отражены в 6 статьях, опубликованных в журналах, индексируемых международными базами данных. Результаты также были представлены на 4-х конференциях. Автореферат и опубликованные работы соответствуют содержанию диссертации.

### **Замечания**

Несмотря на высокий уровень представленной диссертационной работы, к ней имеется ряд замечаний, связанных с оформлением работы. В тексте диссертации имеется ряд опечаток, стилистических ошибок и англицизмов. Однако следует отметить, что перечисленные замечания не снижают научную значимость данной работы и общую положительную оценку диссертации.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа А.С. Горбуновой «Роль белков контроля качества митохондрий в прогрессировании аденокарциномы легкого» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством кандидата биологических наук Копеиной Гелины Сергеевны, и содержит новое решение актуальной задачи биохимии – исследование молекулярных механизмов канцерогенеза. Таким образом, по своей актуальности, научной новизне, теоретической и научно-практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Горбуновой Анны Сергеевны полностью отвечает требованиям на соискание ученой степени кандидата наук согласно п.9 положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г. (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г., №650 от 29.05.2017г., №1024 от 28.08.2017г., № 1168 от 01.10.2018г., №426 от 20.03.2021 г.), а ее автор

заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

Отзыв о научно-практической значимости диссертационной работы Горбуновой Анны Сергеевны на тему «Роль белков контроля качества митохондрий в прогрессировании аденокарциномы легкого», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия, обсужден и утвержден на заседании Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук 7 ноября 2022 г., протокол № 5.

Заведующий лабораторией клеточной инженерии,  
доктор биологических наук, профессор  
специальность 03.01.04 – Биохимия



Белецкий Игорь Петрович

Адрес: 142290, Российская Федерация, г. Пущино, ул. Институтская, д.3,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук  
Министерства науки и высшего образования Российской федерации (ИТЭБ  
РАН)

Контактный телефон: +7(4967)739-447

Электронная почта: ipbeletsky@gmail.com

«09» ноября 2022 г.



Подпись: Белецкий И.П.  
Достоверяю-Зав. ОДОУ  
О.В. СЕНОВА

