

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
**«Федеральный научный центр исследований
и разработки иммунобиологических препаратов
им. М.П. Чумакова РАН»**
(ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»)

поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, город Москва, 108819
Тел. (495) 841-90-02, Факс (495) 841-93-21, 549-67-60. E-mail: sue_polio@chumakovs.ru, www.chumakovs.ru
ОКПО 01895045, ОГРН 1167746624847, ИНН/КПП 7751023847/775101001

09.04.2020г. № 498/к

На № _____ от _____



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор ФГБНУ
«ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»

А.А. Ишмухаметов

«9» апреля 2020 год.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

Чернорыж Яны Юрьевны

**"Устойчивость и восстановление чувствительности опухолевых клеток,
инфицированных цитомегаловирусом человека, к действию
противоопухолевого антибиотика доксорубина", представленной к защите
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности
03.02.02 – вирусология.**

Работа Я.Ю. Чернорыж выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» (ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи) Минздрава России. Диссертация представлена в форме машинописного труда объёмом 172 страниц и автореферата объёмом 25 страниц. По теме диссертации опубликовано 12 работ: 6 статей, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК, а также 6 тезисов докладов в сборниках материалов российских и международных конференций в период 2017-2019 гг. В диссертации в девяти главах представлена совокупность результатов исследований, проведенных лично автором.

Актуальность проблемы

Цитомегаловирус (ЦМВ) играет важную роль в инфекционной патологии человека. Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) относится к группе наиболее часто встречаемых вирусных инфекций. ЦМВИ поражает и детей, и взрослых. Так, по данным ВОЗ, каждый пятый ребёнок является носителем ЦМВ, а в пятилетнем возрасте ЦМВ выявляется у 40-60% детей. Антитела к ЦМВ выявляются в разных регионах мира у 40-95% населения. ЦМВИ – хроническая вирусная инфекция, характеризующаяся многообразием клинических проявлений. Инфекционный процесс при ЦМВИ может протекать, как в скрытой (латентной) форме, так и в генерализованной. Помимо опасности для человека самой ЦМВИ, имеется другая высоко актуальная проблема: одним из наиболее часто обнаруживаемых вирусов в клетках опухолей различного происхождения является ЦМВ. При этом присутствие в клетках вируса напрямую влияет на повышение их резистентности к действию противоопухолевых антибиотиков, в т.ч. доксорубина (ДОКС). Это, в свою очередь, значительно затрудняет противоопухолевую терапию.

Диссертация Я.Ю. Чернорыж посвящена исследованию высоко актуальной проблеме: изучению особенностей ЦМВ инфекции в опухолевых клетках ТНР-1, а также устойчивости и восстановлению их чувствительности к действию ДОКС на фоне ЦМВИ.

Значение диссертационной работы

Из названия диссертации, её структуры и содержания следует, что главным в проведенном исследовании является изучение средств и методов восстановления чувствительности опухолевых клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ, к действию эффективного и широко используемого в антиопухолевой терапии антибиотика ДОКС. Автором экспериментально доказано, что клетки ТНР-1 устойчивы к действию ДОКС вследствие латентной ЦМВИ. Молекулярные механизмы устойчивости к ДОКС инфицированных опухолевых клеток напрямую связаны с увеличением содержания в клетках транскрипционного фактора E2F1, укороченной проонкогенной формы белка DNp73. Несомненное значение диссертационной работы Я.Ю. Чернорыж заключается в том, что в ней чётко экспериментально показан молекулярный механизм восстановления чувствительности клеток моноцитарной лейкемии ТНР-1, заражённых ЦМВ, к

ДОКС: подавление катаболизма полиаминов и ферментов молекулярного пути P13K/AKT/mTOR. Использование в работе ингибиторов катаболизма полиаминов MDL72.528 и ингибиторов mTOR – РАПА и Торина² позволило автору показать, что данные соединения значительно способствуют преодолению резистентности клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ, к действию противоопухолевого антибиотика ДОКС.

1. Полученные результаты соответствуют поставленным целям и задачам.

Проведенная диссертантом работа и её результаты важны не только для понимания молекулярных внутриклеточных механизмов повышенной резистентности опухолевых клеток, инфицированных ЦМВ, к противоопухолевому антибиотику ДОКС, но и для оптимизации противоопухолевой терапии с помощью ингибиторов, как самой вирусной инфекции, так и вирус индуцированной активации полиаминов и других клеточных сигнальных путей.

2. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

3. Содержание опубликованных работ соответствует содержанию диссертации.

4. Материал изложен чётко, стилем, принятым для научных публикаций в журналах.

5. Тема диссертации соответствует научной специальности 03.02.02-вирусология.

Степень достоверности и обоснованности представленных данных.

Обоснованность представленных в диссертационной работе данных обусловлена применением автором различных методических подходов для проверки полученных результатов. Проанализированный объем научного исследования как в качественном, так и в количественном отношении адекватен поставленным в диссертации задачам. Методы исследования, оборудование и расходные материалы детально описаны. Рисунки и таблицы диссертации и автореферата в полной мере отражают количественные характеристики выборок и статистическую обработку данных, что соответствует современным принципам статистики. Представленные в работе результаты получены на достаточной выборке и проанализированы с использованием корректных методов статистической оценки данных. Автором проведен сравнительный анализ

собственных данных с результатами мировой литературы. Выводы четко соответствуют поставленным задачам и отражают их решение. Интерпретация полученных данных представляется интересной и обоснованной.

Все это позволяет отметить, что проведенное исследование является оригинальным, завершенным в рамках поставленной цели и задач научно-квалификационным трудом.

Анализ достоверности выводов

Все 8 выводов диссертации достоверны и обоснованы результатами проведенных исследований. Особое значение для практического здравоохранения имеет вывод 8, в котором автором обоснованно утверждается, что комбинированное применение ДОКС и ингибиторов метаболизма клеток (цикла биогенных полиаминов и пути mTOR) позволило в 2-4 раза снизить действующие концентрации соединений при сохранении эффективности восстановления чувствительности клеток ТНР-1 к ДОКС.

Замечания и вопросы по диссертации Я.Ю. Чернорыж

По рассматриваемой диссертации имеются вопросы дискуссионного характера или связанные с неполной информацией.

1. В Главе 2 «Материалы и методы» автором указано, что работа проводилась с использованием 2-х линий клеток – ТНР-1 и ФЛЭЧ (фибробласты лёгкого эмбриона человека). В подразделе «Клетки» следовало бы уточнить, что все основные опыты проводились на линии ТНР-1, а линия ФЛЭЧ использовалась лишь для пассированное вируса.

2. Автором установлено, что обработка клеток ТНР-1 ДОКС приводит развитию каспазо зависимого апоптоза. При этом количество клеток, содержащих иницирующие и эффекторные каспазы может достигать 42-58%, что значительно превышает количество таких клеток в интактном контроле (3%). В клетках, инфицированных ЦМВ и необработанных ДОКС, количество апоптозных клеток составляет 5%. Инфицирование клеток ЦМВ с добавлением ДОКС приводит к увеличению количества апоптозных клеток, содержащих каспазы, до уровня 12-15%. Автор приходит к обоснованному заключению, что при заражении ЦМВ клетки более устойчивы к цитотоксическому действию ДОКС по сравнению с

неинфицированными клетками. С другой стороны, в работе показано, что ДОКС обладает способностью стимулировать апоптоз в клетках ТНР-1. Однако автором не указано, получены ли эти данные впервые и следует ли рассматривать ДОКС как возможный положительный контроль или препарат сравнения при изучении проапоптозной активности вирусов или химических соединений?

3. Как можно объяснить тот факт, что активация (количество) транскрипционного фактора E2F1 (стимулирующего апоптоз через активацию p73) максимально выражена в клетках, инфицированных ЦМВ и обработанных ДОКС, а не в клетках при добавлении только ДОКС, где, как было показано автором, содержится максимальное количество маркёров апоптоза – инициирующих и эффекторных каспаз (см. пункт 2).

Заключение

Диссертационная работа Яны Юрьевны Чернорыж на тему: «Устойчивость и восстановление чувствительности опухолевых клеток, инфицированных цитомегаловирусом человека, к действию противоопухолевого антибиотика доксорубина», выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора А. А. Куц и представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.02 - вирусология, является законченным научно-квалификационным исследованием, содержащим решение актуальной научной задачи – изучению и поиску средств и методов восстановления чувствительности опухолевых клеток, инфицированных цитомегаловирусом, к действию эффективного и широко используемого в антиопухолевой терапии антибиотика доксорубина. Результаты работы значительно углубляют знания о молекулярных внутриклеточных механизмах устойчивости опухолевых клеток, заражённых цитомегаловирусом, к воздействию противоопухолевого антибиотика доксорубина. Данные, полученные Я.Ю. Чернорыж, позволят внедрить в практику здравоохранения методы и средства восстановления чувствительности опухолевых клеток к доксорубину, а также значительно снизить его цитотоксическое действие и тем самым существенно повысить эффект противоопухолевой терапии.

Диссертация Я.Ю. Чернорыж полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного

Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г., № 842 (в редакции Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016г. № 335, от 02.08.2016г. №748), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Яна Юрьевна Чернорыж, заслуживает присуждения ей степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.02 - вирусология.

Отзыв обсужден на межлабораторном заседании отдела природно-очаговых вирусных инфекций Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Протокол №3 от «16» марта 2020 года).

Отзыв составил:

Ведущий научный сотрудник лаборатории клещевого энцефалита и других вирусных энцефалитов

доктор биологических наук

e-mail: ozherelkov@yandex.ru

«9» апреля 2020 года



С.В. Ожерелков

Подпись С.В. Ожерелкова удостоверяю

Ученый секретарь

ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»

к.б.н.

«9» апреля 2020 года

А.В. Белякова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»)

Адрес: поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, город Москва, 108819

Тел./факс (495) 841-90-02; (495) 549-67-60; (495) 841-93-21

E-mail: sue_polio@chumakovs.ru

<http://www.chumakovs.ru>