

ОТЗЫВ

**на диссертационную работу Чернорыж Яны Юрьевны «Устойчивость и восстановление чувствительности опухолевых клеток, инфицированных цитомегаловирусом человека, к действию противоопухолевого антибиотика доксорубицина», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.02 – «вирусология», официального оппонента доктора медицинских наук, заведующей лабораторией гибридных клеточных культур федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»
Нагиевой Фираи Галиевны**

Цитомегаловирус человека (ЦМВ) широко распространен в человеческой популяции, антитела к ЦМВ обнаруживаются у 40-80% населения в разных регионах мира. Особенностью ЦМВ инфекции (ЦМВИ) является переход литической инфекции в латентную форму, которая позволяет вирусу пожизненно присутствовать в организме и реактивироваться под действием многочисленных внутренних и внешних факторов. В течение последних лет опубликованы данные об обнаружении генов и белков ЦМВ в значительном количестве опухолей человека разного происхождения. Роль ЦМВ как агента, вызывающего рак человека, не выяснена, однако ряд биологических свойств ЦМВ отвечают критериям онкогенного и/или онкомодулирующего вируса: нарушение регуляции клеточного цикла, ингибирование апоптоза, усиление миграции и инвазии зараженных клеток и уклонение от иммунитета. Одной из важнейших проблем медицины является устойчивость опухолевых клеток к современным противоопухолевым средствам. В то же время вопрос о влиянии ЦМВ на чувствительность опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам изучен недостаточно. Остаются невыясненными также клеточные и вирусные факторы, влияющие на установление резистентности.

Диссертационная работа Я.Ю. Чернорыж посвящена изучению роли ЦМВ в опухолевых клетках моноцитарной лейкемии ТНР-1. Тема диссертационной работы весьма актуальна, так как она направлена на выяснение вопроса о том, может ли ЦМВ-инфекция изменять чувствительность опухолевых клеток ТНР-1 к противоопухолевому антибиотику доксорубицину (ДОКС). Важной целью работы было также определить, какое влияние оказывают транскрипционные факторы и молекулярные пути в клетках ТНР-1 на установление резистентности и восстановление чувствительности к действию ДОКС.

Полученные автором данные показывают, что при активной ЦМВИ при первичном заражении гемопозитические опухолевые клетки ТНР-1 приобретают устойчивость к противоопухолевому препарату ДОКС. Впервые установлено, что латентно инфицированные ЦМВ клетки лейкемии также устойчивы к действию ДОКС. Важное значение имеют результаты работы, показавшие, что подавление катаболизма полиаминов и ферментов пути mTOR восстанавливают чувствительность к ДОКС клеток моноцитарной лейкемии ТНР-1, инфицированных ЦМВ.

Диссертационное исследование выполнено на современном экспериментальном уровне, полученные результаты достоверны, о чем свидетельствует использование многочисленных экспериментальных методов анализа и статистическая обработка данных. Выводы диссертации сформулированы в соответствии с полученными результатами, обоснованы и соответствуют поставленным при проведении исследования задачам. Результаты диссертационной работы Чернорыж Я.Ю. представлены в статьях, опубликованных в ведущих иностранных и отечественных журналах. Материалы диссертации представлены на международных и всероссийских научных конференциях, в том числе в качестве устных докладов.

Диссертационная работа построена по классической схеме и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение, выводы, список использованных сокращений и список использованной литературы. Работа изложена на 172 страницах машинописного текста, содержит 6 таблиц и 51 рисунок. Список литературы включает 308 источников.

В главе «Введение» автором сформулированы актуальность работы, цель и задачи проводимого исследования, научная новизна и значимость полученных результатов.

Обзор литературы состоит из 5 разделов. В первом разделе автор описывает структуру вириона ЦМВ, вирусный геном и формы инфекции. Во втором разделе рассматриваются результаты опубликованных работ об обнаружении ЦМВ при онкологических заболеваниях. Третий раздел посвящен характеристике антибиотика ДОКС и резистентности опухолевых клеток к химиотерапии. В четвертом разделе описаны клеточные пути, участвующие в ответе на вирусную инфекцию и обеспечивающие выживание клеток при неблагоприятных воздействиях. Пятый раздел посвящен влиянию ЦМВ на клеточный цикл и программированную гибель клеток – апоптоз.

В главе «Материалы и методы» подробно приведены используемые в работе экспериментальные методы и методы статистического анализа. Автор использовала комплекс современных методов количественного анализа, включающих методы вирусологии, молекулярной биологии, клеточной биологии, иммунологии и иммунохимии. Используемые подходы и методики соответствуют поставленным задачам.

Глава «Результаты» включает 6 разделов, посвященных разным задачам работы. В первом разделе автор дает характеристику ЦМВИ в клетках ТНР-1. Показано, что в клетках лейкемии человека ТНР-1 ЦМВИ имеет абортный характер. После развития активной формы в течение 1 сут

после заражения, транскрипция вирусных генов и синтез вирусных белков к 7 сут постепенно снижается и к 14 сут после заражения инфекция переходит в неактивное состояние, которое характеризуется экспрессией латентных генов. При этом продукция вируса отсутствовала на всех стадиях инфекции.

Во втором разделе работы проводится экспериментальная оценка цитотоксического действия ДОКС на неинфицированные и ЦМВ-инфицированные клетки ТНР-1 в динамике ЦМВИ – на 1, 7 и 14 сут после инфицирования. Показано, что заражение ЦМВ вызывает устойчивость к цитотоксическому действию ДОКС. Интересно, что такое действие вирус оказывает как при активной, так и при латентной форме инфекции. Для изучения влияния молекулярных путей на устойчивость клеток к ДОКС автор применила ингибиторный анализ. Были использованы: ингибитор катаболизма полиаминов - MDL72.527; ингибитор PI3K - LY294002 и mTOR - рапамицин и Торин2. Установлено, что подавление ключевых ферментов клеточных путей восстанавливают чувствительность к ДОКС клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ. Это указывает на участие метаболических процессов в опухолевых клетках в установлении резистентности к антибиотику.

Важные результаты получены автором при изучении действия ДОКС на ДНК и апоптоз клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ. Продemonстрировано, что в ЦМВ инфицированных клетках по сравнению с неинфицированными предотвращались разрывы ДНК при действии ДОКС и в 4 раза снижалась экспрессия маркеров апоптоза – каспаз. Большой интерес представляют данные о белке p73 из семейства опухолевых супрессоров p53. Оказалось, что под действием ДОКС происходит смещение изоформ p73 в сторону антиапоптозной изоформы DNp73. Преодоление резистентности при использовании ингибитора катаболизма полиаминов MDL72.527 оказывает противоположное действие - увеличение содержания проапоптозной изоформы p73 - TAp73.

В последнем разделе рассматривается комбинированное применение ДОКС и ингибиторов метаболизма клеток (цикла биогенных полиаминов и пути mTOR), которое позволило в 2-4 раза снизить действующие концентрации соединений при сохранении эффективности восстановления чувствительности клеток ТНР-1 к ДОКС.

Детальный анализ диссертации не выявил недостатков, касающихся существа работы. В качестве замечаний можно отметить, что следовало бы более подробно описать клеточные линии, использованные в работе, выделив их различную природу (нормальные фибробласты – опухолевые клетки ТНР-1) и чувствительность к ЦМВ. Кроме того, было бы интересно сравнить чувствительность к ДОКС в клетках, зараженных ЦМВ при длительном пассировании *in vitro*. Замечания не снижают значимости и положительной оценки полученных результатов.

Автореферат и опубликованные работы отражают основное содержание диссертации.

Диссертационная работа Я.Ю. Чернорыж является завершенным самостоятельным многоплановым исследованием. Следует отметить высокую актуальность темы, строгую логику построения работы, высокий методический уровень и обоснованность сделанных выводов. В целом, работа полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 года (с изменением Постановления Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а Чернорыж Яна Юрьевна заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата медицинских наук по специальности «вирусология».

Отзыв составила:

заведующая лабораторией

гибридных клеточных культур

ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова»

Доктор медицинских наук

«10» апреля 2020 года

Нагиева Фирая Галиевна

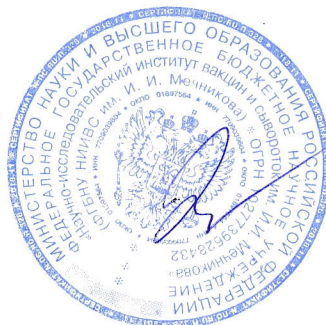
Подпись д.м.н., Ф. Г. Нагиевой удостоверяю

Ученый секретарь ФГБНУ

«НИИВС им. И.И. Мечникова»

Кандидат медицинских наук

«10» апреля 2020 года



С. Н. Жирова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова»)

Адрес: 105064, г. Москва, ул. М. Казенный пер., 5 А

Тел./факс (495) 917-49-00; (495) 917-54-60

E-mail: mech.inst@mail.ru

<http://www.instmech.ru>