

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»

Диссертационная работа Яны Юрьевны Чернорыж посвящена важной проблеме - изучению устойчивости и восстановлению чувствительности опухолевых клеток, инфицированных цитомегаловирусом человека (ЦМВ), к действию противоопухолевого антибиотика доксорубицина (ДОКС). По данным ВОЗ около 90% жителей Земли инфицированы вирусами герпеса разных типов, из которых большое распространение получил цитомегаловирус, обычно находящийся в латентном состоянии и редко вызывающий клинически выраженные заболевания, но при активации вирус может привести к поражению различных органов и стать причиной заболеваний с неблагоприятным исходом. Особенно вирус опасен для беременных женщин, новорожденных детей, а также для ВИЧ-инфицированных пациентов и людей с пониженным иммунитетом. В опубликованных работах сообщается об обнаружении белков и ДНК ЦМВ во многих опухолях человека, в частности, в клетках гематологической опухоли ТНР-1 человека, однако их роль в развитии опухолей и возникновении резистентности к лекарственным препаратам практически не изучена. Данная диссертационная работа существенно расширяет наши знания о роли ЦМВ в возникновении резистентности клеток к противоопухолевому антибиотику ДОКС и восстановлению чувствительности к ДОКС. В настоящее время одной из основных проблем вирусологии и онкологии является быстрое возникновение резистентности к применяемым препаратам, что делает необходимым смену препарата или увеличение его дозы, что приводит к более выраженной токсичности. Поэтому данная работа является важной и очень своевременной.

Диссертация Чернорыж Я. Ю. построена по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты исследования, их обсуждение, выводы и список литературы из 282 зарубежных источников и 26 отечественных наименований. Диссертация изложена на 172 страницах, материалы диссертации иллюстрированы 51 рисунком и 6 таблицами. Во введении автор освещает актуальность проблемы, цель и задачи исследования,

научную новизну и практическую значимость работы, а также основные положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор написан четко, хорошо иллюстрирован, с хорошим знанием литературы по данной тематике, что помогает читателю ориентироваться в проблеме. Обзор изложен на 40 страницах и содержит четыре раздела, описывающие структуру ЦМВ, роль ЦМВ при онкологических заболеваниях, роль антибиотика доксорубицина в терапии опухолей и возникновение резистентности к потивоопухолевым препаратам, а также участие различных клеточных путей в апоптозе и выживании клеток при неблагоприятных воздействиях. По результатам диссертационной работы опубликовано 12 статей, четыре из которых в журналах, рекомендованных ВАК; результаты работы доложены на российских и международных конференциях.

Экспериментальная часть диссертации состоит из нескольких разделов, описывающих использованные реактивы и методы исследования, характеристики ЦМВ инфекции и результаты по влиянию ДОКС на жизнеспособность клеток ТНР-1 в присутствии ингибиторов различных метаболических путей клеток, увеличивающих чувствительность клеток к ДОКС. В качестве характеристик ЦМВ инфицированных клеток ТНР-1 автор оценивает жизнеспособность клеток, определяет динамику содержания белков и ДНК ЦМВ в клетках, транскрипционную активность вирусных генов в зависимости от времени и наличие инфекционного вируса в клетках. Эта часть работы была необходима для дальнейшего изучения эффекта ДОКС на жизнеспособность инфицированных ЦМВ клеток в присутствии различных ингибиторов. После получения полной характеристики состояния инфицированных клеток, автор переходит к изучению влияния ДОКС на жизнеспособность клеток в отсутствии и в присутствии ингибиторов различных метаболических клеточных путей. Показано, что после заражения ЦМВ клетки приобретают резистентность к ДОКС уже через 4 часа после заражения и резистентность сохраняется до 14 суток. Сначала была оценена цитотоксичность ДОКС и исследуемых ингибиторов без ДОКС на неинфицированной и инфицированной культурах. При совместном действии ДОКС и некоторых ингибиторов на инфицированной культуре показано существенное увеличение гибели опухолевых клеток ТНР-1. При комбинации ДОКС и MDL72.527, ингибитора катаболизма полиаминов, количество нежизнеспособных клеток достигало 92,3%, в то время как без ДОКС количество нежизнеспособных клеток было 20-30%. Аналогичные результаты были получены при использовании комбинации ДОКС с

РАПА, контролирующим белковый синтез, Р13К-LY294002, ингибитором Р13-киназы, вызывающим накопление клеток в G фазе, и Торином2, играющим ключевую роль в развитии канцерогенеза. Во всех случаях гибель канцерогенных клеток составляла 80-90% по сравнению с 20-30% без добавления ДОКС. В тоже время комбинация ДОКС и DFMO, ингибитора орнитиндекарбоксилазы, не приводило к увеличению гибели клеток. Таким образом, снижение уровня полиаминов не влияет на жизнеспособность ЦМВ инфицированных клеток. Эти результаты чрезвычайно важны, так как, несмотря на широкое применение комбинации лекарственных препаратов для терапии как вирусных, так и онкологических заболеваний, такой подход для цитомегаловируса не применяли. Эти данные также позволяют снизить концентрации токсичного препарата в несколько раз. Далее Чернорыж Я. Ю. были изучены транскрипционные факторы p73 и E2F1 при инфекции в присутствии ДОКС. В обоих случаях показано, что как ДОКС, так и инфекция, повышают уровни обоих транскрипционных факторов, при этом меняется соотношение изоформ p73 и его укороченной формы, поэтому есть вероятность увеличения количества вируса в клетке. Последний раздел диссертации посвящен восстановлению чувствительности ЦМВ инфицированных клеток к действию ДОКС при применении комбинации препаратов. Этот раздел частично повторяет результаты раздела 4.3 с большей детализацией процесса по изучению влияния различных уже испытанных ингибиторов клеточных процессов на чувствительность клеток к ДОКС. Показано, что при увеличении концентрации ДОКС и соответствующих ингибиторов клеточных процессов происходит снижение жизнеспособности клеток. Автор говорит о снижении резистентности к ДОКС, что неправомерно, так как ни о какой резистентности используемых клеток нигде не упомянуто. В какой степени они были резистентны? Была ли преинкубация клеток с ДОКС для получения резистентности к ДОКС. Можно отметить ряд других неточностей в работе.

Раздел 3.2. Следует отметить некоторое несовпадение результатов, полученных при определении количества белка gB после инфекции ЦМВ. Через 4 часа и 1 сутки после инфекции иммуноблот показал полное отсутствие белка, в тоже время иммуноцитохимическим анализом через 1 сутки было выявлено наибольшее содержание белка с дальнейшим уменьшением его количества. Объяснения автора полученным результатам не очень убедительны.

Рис. 44. В подписи указано, что пробы были обработаны MDL721.527, но на рис. такого обозначения нет.

Рис.45. Объяснение рис.45 о соотношении изоформ белка p73 не очень понятно. «В контрольных клетках (без ДОКС и ЦМВ) соотношение полноразмерной и укороченной формы (TAp73/DNp73) было 0.86, а в инфицированных клетках (без ДОКС) уровень DNp73 был существенно повышен (рис. 44), но соотношение стало 0.73». Почему при существенном повышении полноразмерного белка отношение к укороченной форме стало меньше (0.73)? Повидимому здесь техническая ошибка. В инфицированных клетках ДОКС слегка повышает соотношение в пользу полноразмерного белка, а в неинфицированных количество полноразмерной формы в присутствие ДОКС увеличивается почти в 2 раза. Четкого объяснения этим данным и их значению в работе не приводится.

Эти замечания носят частный характер и не влияют на высокий уровень работы и восприятие диссертационной работы.

Выводы, сделанные автором, являются достоверными, хорошо аргументированы и основаны на представленных в работе экспериментальных данных. Все выводы соответствуют поставленным задачам. Данная диссертационная работа обладает научной новизной и является крайне значимой для понимания механизмов ЦМВ инфекции. Я. Ю. Чернорыж были установлены ключевые аспекты действия антиопухолевого антибиотика доксорубицина и его комбинации с новыми ингибиторами различных клеточных метаболических путей, которые усиливают действие доксорубицина. Продолжение этих исследований может привести к созданию новых подходов к терапии онкологических заболеваний.

Текст автореферата полно отражает содержание диссертации. Он включает поставленные в работе цели, все основные результаты, их научную новизну и значимость, заключение и выводы.

Таким образом, диссертация Чернорыж Яны Юрьевны является завершенной научно-квалификационной работой, посвященной исследованию комбинации антибиотика доксорубицина с ингибиторами клеточных метаболических путей на подавление цитомегаловирусной инфекции в опухолевых клетках. По своему содержанию, актуальности, новизне и научному уровню диссертационная работа соответствует требованиям пп. 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук (с изменениями, утвержденными постановлением Правительства Российской Федерации от 01.10.2018 г. №1168), предъявляемых к

диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор, Чернорыж Яна Юрьевна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «Вирусология» (03.02.02).

Официальный оппонент:

Куханова Марина Константиновна
главный научный сотрудник лаборатории биохимии вирусных инфекций
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук (ИМБ РАН)

М.К. Куханова

Доктор биологических наук
шифр специальности 03.01.03 - "Молекулярная биология"

Адрес: 119991, ул. Вавилова, д.32
Рабочий телефон +7(499)135-6065
Адрес электронной почты: kukhan86@hotmail.com

Подпись д.б.н Кухановой М.К.

УДОСТОВЕРЯЮ
Ученый секретарь ИМБ РАН
к.в.н.

А.А. Бочаров

12 апреля 2020 г.

