

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ФГАНУ
«Федеральный научный центр
исследований и разработки
иммунобиологических препаратов»
(Институт полиомиелита)
академик РАН, профессор, д.м.н.



А.А. Ишмухаметов

«4» октября 2024 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного автономного научного учреждения
«Федеральный научный центр исследований и разработки
иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»
(Институт полиомиелита).

Диссертация Житкевич Аллы Сергеевны на тему: «Механизмы влияния обратной транскриптазы и протеазы ВИЧ-1 на опухолевый потенциал клеток эпителиального происхождения», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология, выполнена в лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

В период подготовки диссертации соискатель Житкевич А.С. в 2019 году начала свою трудовую деятельность с должности лаборанта-исследователя лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», в 2020 году переведена на должность младшего научного сотрудника, а с 2024 года по настоящее время занимает должность научного сотрудника лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

В 2018 году Житкевич А.С. с отличием окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых», получив степень бакалавра по специальности 06.03.01 – «Биология».

В 2020 году с отличием окончила Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства

здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), получив степень магистра по специальности 19.04.01 – «Биотехнология».

В 2024 году Житкевич А.С. окончила очную академическую аспирантуру ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по направлению подготовки 06.06.01 «Биологические науки», по специальности 03.02.02. Вирусология (справка о сдаче кандидатских экзаменов №48 от 02.10.2024 г., справка об обучении №49 от 02.10.2024 г.).

Научный руководитель – Гордейчук Илья Владимирович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Оценка выполненной соискателем работы:

Диссертация Житкевич Аллы Сергеевны является завершенным научным исследованием, выполненным на высоком современном научном уровне. В диссертации содержится решение научной задачи, заключающейся в исследовании механизмов влияния белков ВИЧ-1 на туморогенный потенциал клеток эпителиального происхождения.

Актуальность работы.

В настоящее время инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), продолжает представлять собой глобальную проблему общественного здравоохранения. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), на 2023 год число ВИЧ-инфицированных лиц составило примерно 39,9 млн человек, при этом выявлено 1,3 млн новых случаев заражения ВИЧ-1 и 630 тыс. смертей. По итогам 2021 года в Российской Федерации (РФ) насчитывалось 1,137 млн ВИЧ-инфицированных, что составляет 1,5% взрослого населения. Кроме того, по данным Европейского центра по профилактике и контролю заболеваний (ЕЦПКЗ) и ВОЗ, в РФ на конец 2021 года наблюдался самый высокий уровень впервые выявленных случаев ВИЧ-инфекции в европейском регионе – 40,2 на 100 000 населения. Несмотря на то, что доля ВИЧ-инфицированных, получающих антиретровирусную терапию (АРТ), в РФ выросла, во всех федеральных округах РФ сохраняется тенденция роста распространения ВИЧ-1, что может быть связано с увеличением продолжительности жизни ВИЧ-инфицированных.

С начала глобальной эпидемии ВИЧ-1 среди ВИЧ-инфицированных лиц наблюдается повышенный уровень заболеваемости злокачественными новообразованиями, в частности эпителиального происхождения. В эпоху АРТ резко снизилась частота возникновения злокачественных новообразований, ассоциированных с иммуносупрессией, но она все еще остается повышенной относительно общей популяции. Кроме того, у ВИЧ-инфицированных лиц наблюдается значительный рост числа ежегодно диагностируемых случаев злокачественных новообразований, связанных с ко-инфекцией другими вирусами, в

частности вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР). Фактически, ни одно исследование не выявило положительного эффекта высокоактивной АРТ в снижении прогрессирования цервикальной интраэпителиальной неоплазии высокой степени или анальной интраэпителиальной неоплазии у лиц с ко-инфекцией ВПЧ/ВИЧ-1. К тому же успешная АРТ приводит к «старению» ВИЧ-инфицированного населения, а значит увеличивается бремя онкологических заболеваний, связанных с накоплением соматических мутаций, ослаблением иммунной системы, изменениями в тканевой среде и длительным воздействием канцерогенов.

Накопленные данные показывают, что отдельные вирусные белки могут напрямую способствовать канцерогенезу, в том числе в эпителиальных клетках. Белки ВИЧ-1 можно обнаружить в сыворотке/плазме крови пациентов даже если уровни РНК ВИЧ-1 находятся ниже предела детекции (не выявляются). Обратная транскриптаза и протеаза ВИЧ-1 являются наименее изученными вирусными белками в отношении влияния на онкогенные характеристики клеток эпителиального происхождения. Таким образом, важным вопросом как фундаментальной, так и прикладной науки является исследование механизмов влияния обратной транскриптазы и протеазы ВИЧ-1 на туморогенный потенциал клеток эпителиального происхождения.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации.

Автором проведен сбор и анализ научной информации, изучена степень разработанности темы, определены цель и задачи исследования. Результаты, представленные в исследовании, получены непосредственно автором или при его участии. Автор лично проанализировал полученные результаты, произвел статистическую обработку данных, сформулировал положения и выводы диссертации. Лично или с участием автора подготовлены публикации по результатам исследования и тезисные сообщения для конференций. В целом, личный вклад в выполнение диссертационного исследования составляет – 90%.

Степень достоверности и апробация результатов.

Материалы исследования были представлены и обсуждены в докладах на 6 международных конференциях: VII Петербургский международный онкофорум «Белые ночи» (Санкт-Петербург, Россия, 2021); международная конференция «Rīga Stradiņš University Research Week 2021» (Рига, Латвия, 2021); 2-я международная конференция «Cancer metastasis» (онлайн формат, 2021); международная конференция «Chronic viral infection and cancer, openings for vaccines 2021» (онлайн формат, 2021); международная конференция «2022 ISV Annual Congress» (онлайн формат, 2022); III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, Россия, 2022).

Научная новизна.

В работе впервые продемонстрировано, что продукция обратной транскриптазы ВИЧ-1 в клетках 4T1uc2 приводила к усилению митохондриального дыхания и повышению уровня продукции АТФ в клетке, при этом не влияя на процесс гликолиза и уровни субстратов, поступающих в цикл Кребса. Усиление митохондриального дыхания было связано с перестройкой митохондриальной сети, что выразилось в увеличении

доли клеток с нитевидным фенотипом митохондрий, при индуцированном обратной транскриптазой снижении митохондриальной массы. В работе впервые были получены производные ВПЧ16-положительной клеточной линии плоскоклеточного рака шейки матки человека Ca Ski, экспрессирующие обратную транскриптазу ВИЧ-1 штамма FSU_A и зеленый флуоресцентный белок (GFP) в качестве контроля. В работе впервые продемонстрировано, что экспрессия обратной транскриптазы ВИЧ-1 увеличивает уровень мРНК изоформы *E6*I* ВПЧ16, склоняет клетки к гибридно-эпителиально-мезенхимальному фенотипу, усиливает гликолиз и подавляет митохондриальное дыхание. Показано, что лентивирусная трансдукция и дальнейшая экспрессия клетками линии Ca Ski неонкогенного белка GFP, снижает их туморогенность, однако высокий уровень экспрессии обратной транскриптазы ВИЧ-1 предотвращает достоверное снижение туморогенной активности опухолевых клеток. Впервые показано, что протеаза ВИЧ-1 изменяет миграционную активность клеток аденокарциномы *in vitro* и *in vivo*, что связано не с индукцией окислительного стресса, а с ее ферментативной активностью.

Практическая значимость.

В настоящей работе показано, что механизмом индуцируемого обратной транскриптазой ВИЧ-1 увеличения продукции активных форм кислорода, приводящих к усилению туморогенного и метастатического потенциала клеток аденокарциномы молочной железы *in vitro* и *in vivo*, является усиление митохондриального дыхания, связанное с перестройкой митохондриальной сети. Эти данные важны для понимания патогенеза инфекции ВИЧ-1, включая стимуляцию процесса образования и распространения ассоциированных с ВИЧ-1 злокачественных новообразований, а также указывают на необходимость скрининга злокачественных новообразований среди ВИЧ-инфицированных лиц, включая получающих АРТ. Рекомендовано проведение дальнейших исследований влияния уровня циркулирующей в крови обратной транскриптазы на частоту выявления злокачественных новообразований у пациентов, получающих эффективную АРТ, с целью определения оптимальной частоты мониторинга опухолей.

Полученные в работе данные подчеркивают сложные взаимодействия, возникающие в клетке при ко-инфекции ВИЧ-1 и ВПЧ16. Экспрессия обратной транскриптазы ВИЧ-1 в клетках, содержащих интегрированный геном ВПЧ16, приводит к изменению фенотипических особенностей этих клеток, влияя на их клоногенную активность и канцерогенный потенциал, предположительно за счет повышения уровня мРНК изоформы *E6*I* ВПЧ16 и/или усиленного гликолиза. Это позволяет предположить, что обратная транскриптаза ВИЧ-1 – многофункциональный белок, влияющий на индуцированный ВПЧ16 канцерогенез за счет модуляции экспрессии онкогена *E6*. Способность обратной транскриптазы ВИЧ-1 влиять на метаболизм опухолевых клеток может играть важную роль в патогенезе инфекции, тем самым объясняя феномен ВИЧ-1-ассоциированного канцерогенеза, не связанного с иммунной супрессией. Полученные в работе данные о механизмах канцерогенеза при ко-инфекции

ВИЧ-1/ВПЧ16 могут быть использованы при модификации протоколов лечения. Полученные производные линии клеток Ca Ski могут быть использованы в качестве модели для оценки эффективности противовирусных препаратов и комбинированных протоколов лечения при ко-инфекции.

Полученные в работе данные раскрывают механизм, по которому ферментативная активность протеазы ВИЧ-1 влияет на миграционную активность клеток аденокарциномы *in vitro* и *in vivo*. Это влияние может усиливать метастатическую активность опухолевых клеток, усугубляя клиническое течение и ухудшая исход злокачественных новообразований у людей, живущих с ВИЧ-1. Рекомендовано проведение испытаний по оценке частоты метастазирования опухолей у пациентов с ВИЧ-1, получающих АРТ, включающую и не включающую ингибиторы протеазы ВИЧ-1.

Научная специальность, которой соответствует диссертация.

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.10. Вирусология (биологические науки) и направлениям исследования: пункту 4 - Молекулярная биология вирусов, структурно-функциональная биология вирусных белков. Структура и экспрессия вирусных геномов. Эволюция вирусов и их разнообразие. Генетика и геномика вирусов. Популяционная генетика; пункту 6 - проблемы патогенности вирусов, цитопатологии инфицированных вирусом клеток и тканей, изучение патогенеза вирусных инфекций, путей проникновения вируса в организм и распространения вирусов в организме.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем.

Научная деятельность Житкевич А.С. отражена в 13 научных работах, основные результаты диссертационного исследования полностью опубликованы в 3 (трех) рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК), соответствующих требованиям категорирования журналов, в которых должны быть опубликованы научные результаты диссертационного исследования, индексируемые в международных библиографических базах данных – Web of Science, Scopus, PubMed.

Научные результаты диссертации отражены в следующих научных статьях:

1. Закирова Н.Ф. Экспрессия обратной транскриптазы ВИЧ-1 вызывает усиление дыхательной активности митохондрий в клетках аденокарциномы мышей / Н.Ф. Закирова, А.С. Кондрашова, М.В. Голиков [и др.] // Молекулярная биология. – 2022. – Т. 56. – № 5. – С. 795-807. DOI: 10.31857/S0026898422050160. (Scopus, Springer, Pub Med, RSCI, ВАК, K2).

2. **Zhitkevich, A.** HIV-1 Reverse Transcriptase Expression in HPV16-Infected Epidermoid Carcinoma Cells Alters E6 Expression and Cellular Metabolism, and Induces a Hybrid Epithelial/Mesenchymal Cell Phenotype / **A. Zhitkevich**, E. Bayurova, D. Avdoshina [et al.] // Viruses. – 2024. – Vol. 16. – № 2. – P. 193. DOI: 10.3390/v16020193.

Correction: Viruses. – 2024. – Vol. 16. – P. 589. DOI: 10.3390/v16040589. (Web of Science, Scopus, Pub Med, Q2).

3. Isaguliant, M. Enzymatic activity of HIV-1 protease defines migration of tumor cells *in vitro* and enhances their metastatic activity *in vivo* / M. Isaguliant, A. Zhitkevich, S. Petkov [et al.] // Biochimie. – 2024. – DOI:10.1016/j.biochi.2024.08.009 [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908424001950] (Web of Science, Scopus, Pub Med, Q1).

Диссертация проверена в системе «Антиплагиат.Эксперт». Доля уникального авторского текста диссертационной работы составляет 90,84%. Автором рукописи диссертации правомерно использованы ранее опубликованные тексты с указанием необходимых ссылок на источники информации и соблюдением авторских прав правообладателей.

Общее заключение.

Диссертационное исследование Житкевич Аллы Сергеевны на тему: «Механизмы влияния обратной транскриптазы и протеазы ВИЧ-1 на туморогенный потенциал клеток эпителиального происхождения» является законченной научно-квалификационной работой. В диссертационной работе описаны три механизма приводящих к усилению канцерогенного потенциала злокачественных клеток под действием белков ВИЧ-1. Обратная транскриптаза ВИЧ-1 способна адаптировать клетки аденокарциномы к среде с высоким содержанием активных форм кислорода путем смещения их метаболизма в сторону митохондриального дыхания, что может увеличивать подвижность клеток и объясняет их повышенную туморогенность и метастатический потенциал. В ВПЧ16+ клетках обратная транскриптаза ВИЧ-1 способна влиять на онкогенез, индуцированный ВПЧ16, за счет модуляции экспрессии онкобелка Е6, а именно повышения уровня мРНК изоформы *Е6*1* и/или переходу к более гликолитическому метаболизму, что является отличительной чертой злокачественных клеток. Полученные в работе данные раскрывают механизм, согласно которому ферментативная активность протеазы ВИЧ-1 определяет миграционную активность клеток аденокарциномы *in vitro* и *in vivo*.

Диссертация обладает внутренним единством, содержит новые научные данные и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов. Достоверность результатов подтверждена корреляцией полученных практическими методами данных с теоретическими заключениями.

Диссертация Житкевич Аллы Сергеевны на тему: «Механизмы влияния обратной транскриптазы и протеазы ВИЧ-1 на туморогенный потенциал клеток эпителиального происхождения», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология, соответствует требованиям, установленным в пп. 9-14, Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №№842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в ред. Постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г.; №650 от 29.05.2017 г.; №1024 от 28.08.2017 г.; №1168 от 01.01.2018 г.; №426 от 20.03.2021 г.; №101 от 26.01.2023 г.; с изменениями в действующей ред. №62 от

25.01.2024 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, ученой степени кандидата наук и может быть рекомендована к защите.

Заключение организации, где выполнялось диссертационное исследование Житкевич Аллы Сергеевны на тему: «Механизмы влияния обратной транскриптазы и протеазы ВИЧ-1 на туморогенный потенциал клеток эпителиального происхождения», принято на заседании научной экспертной комиссии ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Присутствовало на заседании 19 членов комиссии (имеющих ученую степень доктора наук – 10 членов, кандидата наук – 9 членов) из 24 списочного состава научной экспертной комиссии.

Результаты голосования:

«За» – 19 членов комиссии;

«Против» – нет;

«Воздержалось» – нет;

Протокол заседания № 7 от 3 октября 2024 г.

Председатель научной экспертной комиссии
руководитель научного направления учреждения,
ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»
(Институт полиомиелита), доктор медицинских наук,
профессор, Заслуженный деятель науки РФ

Евгений Александрович Ткаченко

Секретарь научной экспертной комиссии
Ученый секретарь ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»
(Институт полиомиелита),
кандидат биологических наук

Алла Владимировна Белякова

Подписи: проф., д.м.н. Ткаченко Е.А., к.б.н. Беляковой А.В. удостоверяю.

Начальник отдела кадров
ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»
(Институт полиомиелита)



А.И. Симакова

«7» октябрь 2024 г.