

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Житкевич Аллы Сергеевны на тему: «Механизмы влияния обратной транскриптазы и протеазы ВИЧ-1 на туморогенный потенциал клеток эпителиального происхождения», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология

Актуальность темы диссертации

Диссертационное исследование А.С. Житкевич посвящено изучению важнейшей темы - анализу механизмов, лежащих в основе возникновения злокачественных новообразований у людей, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

Внедрение трехкомпонентной антиретровирусной терапии (АРТ) в середине 1990-х гг. значительно снизило частоту онкологических заболеваний у ВИЧ-позитивных лиц, при этом закономерно изменив структуру онкологической заболеваемости. До появления эффективной АРТ СПИД-ассоциированные виды рака, непосредственно связанные с иммунодефицитом, возникали у 30% и более пациентов и были одной из основных причин их смерти, а неСПИД-ассоциированные виды рака составляли менее 1% смертельных исходов у людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ). В настоящее время частота СПИД-ассоциированных видов рака среди ЛЖВ резко снизилась, а распространенность неСПИД-ассоциированных заболеваний непрерывно растет (до 12%), что сделало их основной причиной смерти в этой группе.

Механизмы онкогенеза, не связанного с нарушениями иммунитета и определяемого непосредственным онкогенным воздействием ВИЧ, а также роль отдельных белков вируса в формировании и развитии опухолей человека остаются недостаточно изученными, что ограничивает возможности предотвращения и лечения таких заболеваний, поэтому тема диссертации А.С. Житкевич является неоспоримо актуальной.

Научная новизна полученных результатов и выводов

Научная новизна полученных результатов проявляется в установлении нескольких ранее неизвестных фактов, в частности, впервые

продемонстрировано, что продукция обратной транскриптазы (RT) ВИЧ-1 в мышечных клетках 4T1lus2 приводит к усилению митохондриального дыхания и повышению уровня продукции АТФ в клетке, но не затрагивает процесс гликолиза. В клетках рака шейки матки человека Ca Ski, экспрессирующих RT ВИЧ-1, метаболический эффект был противоположным, при этом не снижалась опухолевая активность опухолевых клеток. Впервые было обнаружено, что ферментативная активность протеазы (PR) ВИЧ-1 изменяет миграционную активность клеток аденокарциномы *in vitro* и *in vivo* и тем самым потенциально способна усиливать метастатическую активность опухолевых клеток.

Практическая значимость работы

Полученные в ходе работы данные однозначно указывают на непосредственную связь между функционированием ферментов ВИЧ-1 - обратной транскриптазой (RT) и протеазой (PR) и опухолевым потенциалом вируса у пациентов, получающих АРТ. Это дает основания рекомендовать повысить внимание к обследованию таких пациентов для своевременного выявления ранних стадий онкологических заболеваний. Предложены также практические шаги для продолжения исследований, в частности, поиск ассоциации между уровнем циркулирующей в крови обратной транскриптазы ВИЧ-1 на фоне АРТ и частотой злокачественных новообразований. Рекомендована модификация протоколов лечения опухолей у ВИЧ-позитивных людей с учетом данных о влиянии антиоксидантов на миграционную активность клеток, индуцированную ферментативной активностью протеазы ВИЧ-1.

Разработанные производные клеточных линий могут быть использованы в качестве модели для оценки эффективности противовирусных препаратов.

Степень обоснованности и достоверности представленных положений и выводов

Все научные выводы и положения, выносимые на защиту, правомерны и основаны на результатах собственных исследований автора, обоснованность

которых не вызывает сомнений.

Результаты исследования представлены в убедительной форме, достоверность их самоочевидна и подтверждена уровнем публикаций. Выводы диссертационной работы полностью соответствуют ее содержанию.

Данные, полученные в работе, опубликованы в ведущих отечественных и международных научных изданиях по соответствующей диссертации тематике, неоднократно были доложены научному сообществу. Перечень публикаций включает 3 статьи по теме диссертации в рецензируемых научных журналах и изданиях, индексируемых в РИНЦ и международных базах Scopus и Web of Sciences. Автор принимала активное участие в работе научных конференций как в России, так и в странах ближнего и дальнего зарубежья, ею были сделаны научные сообщения в форме устных либо постерных докладов.

Использованные автором методы и полученные им результаты исследования однозначно позволяют утверждать, что работа полностью соответствует паспорту специальности 1.5.10. Вирусология и относится к отрасли биологические науки.

Содержание и структура диссертационной работы

В качестве основного объекта исследования выбраны два из трех основных ферментов ВИЧ-1, определяющих его способность к репликации - RT и PR, при этом целью работы стало исследование механизмов влияния этих биомолекул на туморогенный потенциал клеток эпителиального происхождения.

Пути достижения сформулированной цели определены пятью основными задачами исследования, которые включают оценку влияния RT ВИЧ-1 на метаболические процессы в клетках аденокарциномы мышей; анализ влияния вариантов RT ВИЧ-1 на экспрессию онкогенов *E6/E7* ВПЧ16 на модели клеток рака шейки матки человека; оценку последствий продукции и туморогенный потенциал RT ВИЧ-1 в субклонах линии Ca Ski; а также изучение окислительно-восстановительного статуса и миграционного потенциала в субклонах линии 4T1Luc2, экспрессирующих PR ВИЧ-1.

Выбор методов полностью оправдан целью и задачами исследования и включает в себя комплекс серологических и молекулярно-биологических методов, работу с культурами клеток, анализ метаболических показателей, включая интенсивность гликолиза и митохондриального дыхания, оценку опухолевой активности, статистические методы и пр.

Диссертационная работа оформлена в соответствии с традиционными требованиями к оформлению диссертаций и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы и библиографический список, включающий 461 ссылку на источники литературы, а также практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы и список сокращений и условных обозначений. Результаты работы иллюстрированы 24 рисунками и 3 таблицами.

Работа в целом написана по стандартной форме, научное содержание не вызывает вопросов и возражений. Текст в целом написан уверенно, со знанием дела, на общепринятом научном языке. Оформление диссертации и списка использованной литературы полностью соответствует требованиям к подобным работам.

Содержание диссертации, в свою очередь, полностью отвечает ее целям и задачам. Введение содержит все необходимые структурные разделы, включая актуальность, цели и задачи, новизну, методологию, положения, выносимые на защиту, степень разработанности темы исследования, достоверность, теоретическую и практическую значимость исследования, а также информацию о публикациях и выступлениях автора.

Обзор литературы (глава 1) содержит краткую характеристику структуры вируса, его генома и жизненного цикла в клетках-мишенях. Описаны структура и свойства основных ферментов – объектов исследования RT и PR. Затронуты вопросы состояния иммунной функции и отдельных иммунных клеток при ВИЧ-инфекции, а также кратко механизмы количественных и качественных изменений Т-хелперных (CD4+) и

цитотоксических Т-лимфоцитов. Приводится классификация злокачественных заболеваний у ВИЧ-инфицированных пациентов, а также результаты динамических изменений в соотношении СПИД-ассоциированных (саркома Капоши, неходжкинская лимфома и рак шейки матки) и неСПИД-ассоциированных (рак легких, рак печени, лимфома Ходжкина, анальный рак) опухолей до и после внедрения АРТ. Приводятся разные точки зрения, касающиеся возможных механизмов формирования опухолей. Цитированы данные эпидемиологических исследований злокачественных новообразований, проведенных среди ВИЧ-инфицированных пациентов в России. Подробно анализирована информация, касающаяся участия структурных и неструктурных белков ВИЧ-1 в патогенезе опухолевого роста, а также роли окислительного стресса клетки в патогенезе ВИЧ-инфекции. Описаны способы взаимодействия ВИЧ-1 с клетками разных органов и тканей. Важнейший раздел обзора литературы посвящен взаимодействию ВИЧ-1 с другими вирусными онкогенами, а также роли ВИЧ-1 в канцерогенезе, вызванном вирусом папилломы человека (ВПЧ).

В разделе «Материалы и методы» (глава 2) автор дает полную характеристику материалам, использованным в работе, включая клеточные линии, лабораторных животных, антитела, вектора, а также праймеры и реагенты; далее подробно описаны все методы, использованные в работе, включая все виды культуральных работ, ПЦР, Вестерн-блот, электрофорез, анализ интенсивностей гликолиза и митохондриального дыхания, оценку скорости миграции клеток и другие лабораторные методы, а также описание методов статистического анализа результатов.

В разделе «Результаты и обсуждение» (глава 3) автор переходит к описанию полученных им экспериментальных результатов. Этот раздел работы содержит полный набор и анализ данных, полученных в ходе исследований.

Подробно и последовательно изложен ход экспериментов, посвященных решению всех задач исследования. В частности, проведены результаты оценки

влияния продукции RT ВИЧ-1 на гликолиз и дыхательную активность митохондрий в клетках аденокарциномы мышей; продемонстрировано отсутствие заметных изменений в процессе гликолиза в сочетании с усилением дыхательной активности митохондрий, а также появлением признаков перестройки митохондриальной сети.

В экспериментах по исследованию влияния RT ВИЧ-1 на свойства клеток, содержащих интегрированный геном ВПЧ16, показано увеличение экспрессии онкогена *E6*, но не *E7* ВПЧ16 в линии клеток рака шейки матки человека Ca Ski. Помимо этого, экспрессия RT вызывала увеличение интенсивности гликолиза в аэробных условиях и снижение дыхательной активности митохондрий.

В разделе работ, посвященных анализу влияния экспрессии PR ВИЧ-1 на свойства клеток аденокарциномы мышей и метаболизм, были получены подтверждения отсутствия непосредственного воздействия вирусного фермента на окислительный стресс; наблюдаемые изменения можно было скорее отнести на счет эффекта лентивирусной трансдукции. Вместе с тем сдвиг в сторону мезенхимального фенотипа был связан с продукцией PR ВИЧ-1, так же как и повышение миграционной активности клеток.

В разделе «Обсуждение» (глава 4) рассматриваются основные результаты, полученные в работе, и обосновываются главные выводы. Демонстрировано влияние продукции RT ВИЧ-1 в клетках 4T1Luc2 на ключевые метаболические процессы клеток, создающее условия для их повышенной метастатической активности и опухолевого потенциала. Обсуждается роль структурной реорганизации митохондрий и возможность существования регуляторного RT-зависимого механизма. Показано, что стабильная длительная экспрессия RT ВИЧ-1 способна изменять свойства злокачественных клеток Ca Ski, увеличивая экспрессию онкогенов ВПЧ16. RT ВИЧ-1 изменяет метаболизм этих клеток за счет усиления гликолиза и ингибирования митохондриального дыхания, то есть противоположным по отношению к клеткам 4T1Luc2 образом, что подтверждает точку зрения о

гетерогенности метаболических изменений в опухолевых клетках и их механизмов. В экспериментах, направленных на выяснение роли PR ВИЧ-1 в изменении подвижности (скорости миграции) клеток 4T1uc2, убедительно показана связь между ферментативной активностью PR и миграционной активностью *in vitro* и *in vivo*.

В разделе «Заключение» автор кратко систематизирует результаты проведенной работы и указывает на то, что задачи диссертационной работы по исследованию механизмов, приводящих к усилению канцерогенного потенциала злокачественных клеток под действием белков ВИЧ-1, успешно решены, а поставленные цели достигнуты.

Значительные объемы исследования и разнообразие последовательно проведенных экспериментальных работ с использованием широкого круга лабораторных методов позволили получить исчерпывающую информацию из каждого из экспериментов и выбрать наиболее перспективные направления для будущих исследований. Исследование, проведенное автором работы, характеризуется как цельное, тщательно спланированное и завершенное. Личный вклад автора можно оценить как высокий.

К незначительным недостаткам диссертации можно отнести присутствие некоторого числа синтаксических ошибок, опечаток и стилистических недочетов, что несколько не снижает ценности работы.

Заключение

Диссертация А.С. Житкевич 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, является законченной научно-квалификационной работой и по актуальности, научной новизне, практической значимости результатов и объему проведенных исследований полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г.

