

О Т З Ы В

официального оппонента доктора биологических наук Бгатовой Наталии Петровны на диссертационную работу Зонова Евгения Владимировича «Механизмы онколитического действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего вируса осповакцины», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки)

Актуальность исследования определяется ростом онкологической заболеваемости во всем мире. В последнее десятилетие были достигнуты большие успехи в лечении данной патологии, тем не менее, уровень пятилетней выживаемости при многих типах опухолей является низким. Крайне важной остается разработка новых стратегий подавления опухолевого роста и метастазирования.

Для воздействия на опухолевый рост используются различные подходы, которые могут быть связаны с поиском лекарственных средств, направленных на первичную опухоль и элиминацию раковых клеток, либо блокирующих пути метастазирования опухолевых клеток - ангио или лимфангиогенез, либо направленные на поддержание и активацию собственных защитных систем организма. Непосредственное воздействие на опухолевую клетку может быть направлено на блокирование клеточного цикла, либо индукцию различных форм клеточной гибели, в частности, апоптоза или аутофагической гибели.

Интерес автора диссертации связан с индукцией апоптоза раковой клетки путем использования онколитических вирусов, исходя из представления о том, что индукция апоптоза - естественного пути гибели клеток, является наиболее предпочтительным механизмом уничтожения опухоли. Вследствие этого, поиск проапоптотических белков и встройка соответствующих трансгенов в геном онколитических вирусов – одно из направлений создания эффективных средств противоопухолевой терапии. Основываясь на данных о том, что белок апоптин, неструктурный белок вируса анемии цыплят, способен избирательно индуцировать апоптоз опухолевых клеток, целью своего исследования Зонов Е.В. поставил изучить механизмы противоопухолевого действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма VVdGF_{ApoS24/2} BOB на ксенографты карциномы A431 человека и мышиную карциному Эрлиха.

Научная новизна. Автором впервые в сравнительном аспекте исследовано влияние штаммов VVdGF-2_{ApoS24/2} и Л-ИВП BOB на ксенографты карциномы человека A431 у мышей nude и сингенную опухоль мышей карциному Эрлиха. Выявлен большой противоопухолевый эффект

штамма VVdGF-2 ApoS24/2 по сравнению с исходным штаммом Л-ИВП ВОВ, несмотря на его менее интенсивную репликацию.

Автором впервые даны детальные морфологические характеристики репликации штамма VVdGFApoS24/2 в клетках карциномы A431 привитой иммунодефицитным мышам и в клетках сингенной асцитной карциномы Эрлиха у иммунокомпетентных мышей. Впервые показано, что наличие в составе генома штамма VVdGFApoS24/2 ВОВ гена проапоптотического белка апоптина и его экспрессия не способствует индукции процесса апоптоза клеток карциномы человека и асцитной карциномы мышей *in vivo*. Однако автором выявлен не описанный ранее тип гибели опухолевых клеток при воздействии штамма VVdGF-ApoS24/2, характеризующийся формированием крупных скоплений волокнистого материала на месте клеток, отсутствие экссудата и значимых количеств клеточного детрита.

Автором впервые на модели сингенной опухоли (карцинома Эрлиха), привитой мышам выявлено блокирование клеточного цикла опухолевых клеток в S-фазе и последующее снижение числа митозов опухолевых клеток и объема опухолей при интратуморальном введении штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ.

Значение результатов работы для науки и практики. Полученные данные имеют важное фундаментальное и прикладное значение. Результаты работы, отражающие морфологические характеристики репликации штамма VVdGFApoS24/2 и его влияние на структуру клеток карциномы A431 привитой иммунодефицитным мышам и клеток сингенной асцитной карциномы Эрлиха у иммунокомпетентных мышей расширяют представления о противоопухолевых эффектах апоптин-продуцирующих рекомбинантных штаммов. Данное исследование имеет научно-практическую значимость и в связи с тем, что до настоящего времени вопрос о безвредности различных онколитических вирусов для здоровых тканей до конца не изучен.

Использование в работе иммунодефицитных мышей позволяет применять полученные данные для разработки противоопухолевых препаратов для больных с явлениями иммунодефицита. Результаты используются при создании новых рекомбинантных онколитических вирусов в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, РФ).

Структура работы. Диссертация изложена на 109 страницах, содержит 2 таблицы и 18 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследования», главы с результатами собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы из 149 источника.

Во «Введении» автор убедительно обосновывает актуальность проблемы, формулирует цель и задачи исследования, новизну, практическую значимость работы, положения, выносимые на защиту. В первой главе автором представлен грамотный современный обзор литературы, свидетельствующий о хорошем знании диссертантом изучаемой проблемы. В литературном обзоре автор приводит данные об опухолевых заболеваниях и методах их лечения, новейшие методы лечения опухолевых заболеваний, дает характеристику онколитическим вирусам, поксвирусам, описывает свойства апоптина – онкоселективного индуктора апоптоза. Цитируются источники преимущественно последних лет.

Автором четко и логично изложены методы и результаты собственных исследований, которые хорошо проиллюстрированы и обладают высокой степенью новизны.

В качестве объектов исследования использованы клеточные линии эпидермоидной карциномы A431 человека, клетки мышины карциномы Эрлиха, Штамм Л-ИБП BOB и апоптин-продуцирующий штамм VVdGF-ApoS24/2, а также мыши линии nude и мыши линии C57Bl.

В работе использованы методы светооптического, иммуногистохимического, ультраструктурного исследования и статистики.

В первой части результатов исследования изучены изменения клеток карциномы A431 человека, привитой мышам nude, вызванные репродукцией штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB. Показано, что однократные интратуморальные инъекции штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИБП BOB приводят к значительному снижению объема опухолевых узлов по сравнению с мышами контрольной группы. Введение мышам штамма VVdGF-ApoS24/2 способствовало более выраженному снижению объема опухолевых узлов, чем введение штамма Л-ИБП BOB. При этом на поздних сроках эксперимента после введения штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB опухолевые узлы карциномы A431 производили впечатление, по мнению автора, «высушенных», а после введения BOB при разрезе часто оказывались заполненными большим количеством жидкости.

В цитоплазме клеток карциномы A431, зараженных штаммами VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИБП BOB, наблюдали частицы зрелого BOB, которые формировали скопления и вирусные «фабрики». Показано, что оба штамма вируса BOB, и VVdGF-ApoS24/2, и Л-ИБП, размножались исключительно в опухолевых клетках.

Автором убедительно продемонстрировано, что через 8 суток после введения штаммов VVdGF-ApoS24/2 или Л-ИБП BOB опухолевые клетки были разрушены, что подтвердило иммуногистохимическое выявление белка Ki-67,

которое не выявило специфического связывания анти-Ki-67 антител на парафиновых срезах опухолевых узлов карциномы A431.

Автором показана экспрессия белка апоптоина, но не выявлен апоптоз опухолевых клеток при введении штамма VVdGF-ApoS24/2. В то же время обнаружено влияние апоптоина на организацию микрофиламентов клеток карциномы A431, зараженных штаммом VVdGF-ApoS24/2 BOB. Репликация штамма VVdGF-ApoS24/2 в клетках карциномы A431 приводила к накоплению большого количества филаментов, включая актиновые, в цитоплазме клеток *in vivo* и *in vitro*.

Во второй части результатов следования представлены механизмы противоопухолевого действия штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB на сингенную карциному Эрлиха, привитую мышам.

Показано, что однократное интратуморальное введение штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП BOB мышам линии C57Bl с привитой подкожно карциномой Эрлиха приводило к значительному уменьшению средних размеров опухолевых узлов карциномы по сравнению с мышами контрольной группы, однако, заметных различий объема опухолевых узлов у мышей, получавших штаммы VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП BOB не наблюдалось. Автором последовательно проведены исследования реакции клеток иммунной системы мышей C57Bl с солидной карциномой Эрлиха на интратуморальное введение BOB; изменений митотической активности опухолевых клеток; даны морфологические характеристики асцитной карциномы Эрлиха; оценен уровень репликации штаммов BOB в клетках асцитной карциномы Эрлиха; исследовано влияние репликации BOB на клеточный цикл клеток асцитной карциномы Эрлиха. Были получены статистически значимые различия количества клеток, экспрессирующих белки Ki-67 и PCNA под действием рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB и исходного штамма Л-ИВП BOB, что, по мнению автора, указывает на способность белка апоптоина оказывать влияние на клеточный цикл асцитной карциномы Эрлиха у мышей линии C57Bl.

Степень обоснованности и достоверности основных выводов диссертации. В своей работе Зонов Е.В. использовал современную приборную базу, современные подходы к характеристике использованных штаммов онколитических вирусов, опухолевых узлов и клеток. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Обоснованность научных положений, заключений, выводов основывается на согласованности данных эксперимента и научных выводов. Исследование проведено на достаточном

объеме исходных данных, и использованием достаточного количества современных литературных источников.

В качестве замечания, на мой взгляд, следует отметить отсутствие в тексте работы обсуждения участия определенных сигнальных путей, которые могли быть задействованы при попадании белков вирусов, в частности апоптина, в опухолевую клетку, что обусловило развитие наблюдаемых структурных изменений. В процессе рассмотрения работы возникли вопросы: «Считается, что онколитические вирусы живут и размножаются только в опухолевых клетках. Вирус находит опухолевую клетку, уничтожает ее и распространяется на соседние клетки опухоли, обеспечивая цепную реакцию. Однако почему невозможно их переселение в нормальные клетки и запуск программы злокачественной трансформации для создания наиболее благоприятных условий своего существования. Почему опухолевая клетка так привлекательна для этой группы вирусов? Кроме того, известно, что в геноме вируса могут возникать мутации, вирусы способны рекомбинировать друг с другом, обмениваясь участками своего генома, благодаря чему могут приобрести опасные для нормальной клетки гены. Насколько это свойственно онколитическим вирусам?

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет. Работа интересна высоким методическим уровнем, современным подходом к решению проблемы, хорошим знанием литературы, знанием структуры вирусов и морфологии опухолевых клеток, логикой постановки задач исследования, хорошим стилем написания работы, иллюстрациями отличного качества, убедительно подтверждающими выводы диссертации.

По материалам диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК России для публикации материалов диссертационных исследований. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Закключение. Таким образом, по актуальности, научной новизне, методическому уровню, теоретической и практической значимости диссертационная работа Зонова Евгения Владимировича является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная задача – изучены механизмы противоопухолевого действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма VVdGFAPoS24/2 BOB на ксенографты карциномы A431 человека и мышиную карциному Эрлиха, имеющая существенное значение для клеточной биологии, цитологии, гистологии.

Диссертационная работа Зонова Евгения Владимировича «Механизмы онколитического действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего вируса

осповакцины», соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» (постановление Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 №842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент:

заведующая лабораторией ультраструктурных исследований

Научно-исследовательского института клинической и

экспериментальной лимфологии – филиала

Федерального государственного бюджетного

научного учреждения «Федеральный

исследовательский центр Институт цитологии

и генетики Сибирского отделения Российской

академии наук»

доктор биологических наук, профессор

(03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология,

по действующему перечню специальностей –

03.03.04- клеточная биология, цитология, гистология)

телефон (383)333-47-43 e-mail: n_bgatova@ngs.ru

Наталия Петровна Бгатова

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

630060, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2.

тел. (383) 333-64-09; e-mail: lymphology@niikel.

Согласна на включение в аттестационное дело и дальнейшую обработку моих персональных данных.

09.10.2017



Бгатовой НП
Подпись заверяю
/ Начальник ОК *СФ* / *Степанов ОН* /

