

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Лушниковой Елены Леонидовны на диссертацию 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 темы. Диссертационное исследование Е.В.Зонова посвящено экспериментальному изучению эффективности виротерапии злокачественных новообразований при использовании рекомбинантного штамма вируса осповакцины. Актуальность работы определяется необходимостью разработки новых подходов к терапии онкозаболеваний, обеспечивающих полное излечение с минимальными побочными эффектами, на основе повышения селективности (таргетности) воздействий.

Одним из перспективных направлений в разработке новых методов онкотерапии является создание рекомбинантных штаммов вирусов, проявляющих онколитические свойства. В качестве таких вирусов рассматриваются представители разных семейств, разрабатываются разные способы их генной модификации, которые, по мнению исследователей, могут ослаблять их патогенные свойства и усиливать онколитические.

Степень достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертации. Работа основана на результатах сравнительного исследования механизмов противоопухолевого эффекта онколитических вирусов – рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма VVdGF-ApoS24/2 вируса осповакцины и исходного штамма Л-ИБП. Для решения поставленных задач были использованы две основные модели опухолевого роста: подкожное введение клеток эпидермоидной карциномы человека A431 самкам мышей линии nude (всего 108 особей) и введение клеток мышинной карциномы Эрлиха мышам линии C57B1 (подкожное и интраперитонеальное) (всего 96 особей). В качестве контроля использовали мышей с опухолевым процессом, которым интратуморально вводили физиологический раствор. Важно отметить, что рекомбинантный штамм VVdGF-ApoS24/2 вируса осповакцины был получен в ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» и является разработкой отечественных ученых.

Все исследования были проведены с помощью комплекса современных методов (светооптическое, электронно-микроскопическое, иммуногистохимическое и флуоресцентно-микроскопическое исследование, морфометрический анализ с количественной оценкой клеточных популяций и вирусных частиц, биотитрование), позволяющих получить полное представление о процессах роста опухолевых узлов, репликации вирусов, деструкции ксенографтов карциномы A431 человека и трансплантатов сингенной карциномы Эрлиха у мышей после однократного интратуморального введения обоих штаммов вируса осповакцины.

Количественные данные обработаны с использованием программного обеспечения STATISTICA 8.0.360.0. Статистическую значимость различий в вирусологических исследованиях определяли с помощью критерия Манна-Уитни-Вилкоксона, а при подсчете клеток достоверность различий средних величин определяли на основании t-критерия Стьюдента. Все это позволяет считать полученные результаты достоверными, а сделанные выводы обоснованными.

Научная новизна работы несомненна. В работе впервые изучены механизмы противоопухолевого действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма VVdGF-ApoS24/2 вируса осповакцины на ксенографты карциномы человека A431 у мышей nude и сингенную опухоль мышей (карциному Эрлиха). Впервые описаны структурные изменения опухолевых узлов карциномы A431 и карциномы Эрлиха при виротерапии с использованием штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП. Выявлены выраженные различия в структурной реорганизации опухолевых узлов карциномы A431 после интратуморального введения каждого из штаммов осповакцины. Установлено, что при интратуморальном введении исходного штамма Л-ИВП происходит своеобразная папулезно-кистозная трансформация опухолевых узлов с образованием внутриопухолевых полостей и накоплением в них жидкости, что является одним из характерных проявлений инфекций, вызываемых вирусами оспы. При виротерапии рекомбинантным штаммом регрессия опухолевого узла карциномы A431 происходит без подобных структурных преобразований, что, несомненно, можно расценивать как наиболее благоприятный гистологический вариант вирус-индуцированного патоморфоза.

Впервые представлены морфологические характеристики репликации штамма VVdGF-ApoS24/2 в клетках карциномы A431, привитой иммунодефицитным мышам, и в клетках сингенной асцитной карциномы Эрлиха у иммунокомпетентных мышей. Показана видоспецифичность как исходного, так и рекомбинантного штаммов вируса осповакцины при их взаимодействии с опухолевыми клетками, полученными от разных видов (человека и мыши), что проявлялось в их разной репликативной активности и, как следствие, в онколитическом эффекте.

Важным результатом исследования является установление более выраженного противоопухолевого эффекта штамма VVdGf-ApoS24/2 по сравнению с исходным штаммом Л-ИБП вируса осповакцины, несмотря на его менее интенсивную репликацию. Впервые показано, что проапоптотический белок апоптин, экспрессирующийся в составе генома штамма VVdGF-ApoS24/2 вируса осповакцины, не индуцирует процесс апоптоза клеток карциномы человека и асцитной карциномы мышей *in vivo*.

Впервые представлены ультраструктурные характеристики деструкции и гибели опухолевых клеток карциномы A431 после применения штамма VVdGF-ApoS24/2, а именно: формирование крупных скоплений хаотично расположенных волокон на месте клеток, отсутствие лизата и клеточного детрита.

Впервые показано, что противоопухолевое действие онколитических вирусов осповакцины в отношении карциномы Эрлиха, привитой мышам, не связано с вирусной деструкцией опухолевых клеток, действием эффекторных клеток иммунной системы, а также с разрушением кровеносных сосудов внутри опухоли. Введение исходного и рекомбинантного штаммов вируса осповакцины приводило к накоплению опухолевых клеток в S-фазе клеточного цикла, уменьшению числа митозов и объема опухолей. Более выраженные изменения всех этих количественных показателей установлены для рекомбинантного штамма VVdGf-ApoS24/2.

Теоретическая и практическая значимость результатов диссертационного исследования. Результаты данной работы дополняют существующие представления о механизмах противоопухолевого эффекта онколитических вирусов, в частности, апоптин-продуцирующих рекомбинантных

штаммов. Показано, что использование видоспецифичных и тканеспецифичных вирусов для генных модификаций обеспечивает наиболее выраженный клинический эффект при лечении неоплазий. Получены новые данные о морфогенезе опухолевого процесса у экспериментальных животных на фоне применения как исходного, так рекомбинантного штаммов вируса осповакцины.

Показана принципиальная возможность получения выраженного терапевтического эффекта онколитических вирусов без вовлечения эффекторных клеток иммунной системы, что важно для разработки противоопухолевых препаратов для больных с явлениями иммунодефицита. Представленные в работе новые данные об эффектах встройки трансгена апоптоина могут быть полезны при разработке новых противоопухолевых препаратов на основе онколитических вирусов. Все результаты работы имеют научно-практическое значение и используются при создании новых рекомбинантных онколитических вирусов в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, РФ).

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа Е.В.Зонова имеет традиционную структуру, изложена на 109 страницах компьютерного текста. Состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материала и методов исследования, главы с результатами собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 149 работ. Содержание диссертации характеризуется последовательным изложением, текст работы проиллюстрирован 18 рисунками, количественные данные представлены в 2 таблицах.

Во введении автор убедительно обосновывает актуальность избранной темы, формулирует цель и задачи исследования, знакомит с научной новизной и степенью разработанности проблемы, теоретической и практической значимостью полученных результатов.

Обзор литературы в достаточной мере отражает как историю развития и эффективность применения разных методов противоопухолевой терапии, так и современное состояние проблемы создания и тестирования новых штаммов онколитических вирусов. В разделе «Собственные исследования» подробно описаны материал и методы исследования, соответствующие современным требованиям и адекватно подобранные для решения поставленных цели и

задач. В целом представленная диссертация выполнена на хорошем научно-методическом уровне, является завершенным исследованием, в котором автором успешно решены поставленные задачи. Диссертационное исследование соответствует шифру специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

По результатам диссертации опубликовано 7 работ, из них 4 статьи в рецензируемых научных журналах из Перечня ВАК Минобрнауки РФ, рекомендованных для публикации результатов диссертационных исследований. Результаты диссертационной работы апробированы на научных семинарах и международных конференциях.

Выводы диссертации соответствуют ее цели, задачам и основным положениям. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. В то же время следует отметить:

1) при характеристике изменений ряда параметров (количество клеток в состоянии некроза и апоптоза, длина окружности брюха мышей с асцитной формой карциномы Эрлиха, количество клеток CD11b и CD3 и др.) не приведены полученные количественные данные (в виде таблиц, графиков или в тексте);

2) отсутствуют данные о гибели животных в ходе экспериментов, что имеет важное значение для комплексной оценки агрессивности опухолевого процесса и эффективности использованной терапии;

3) излишнее использование при описании результатов заковыченных выражений вместо принятых научных терминов;

4) в тексте недостаточно полно представлены данные, характеризующие положения о накоплении опухолевых клеток в S-фазе клеточного цикла.

Сделанные замечания не затрагивают результаты, на основании которых сделаны выводы диссертации.

Заключение. Кандидатская диссертация Зонова Евгения Владимировича на тему «Механизмы онколитического действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего вируса осповакцины», выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора Рябчиковой Елены Ивановны, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содер-

жится решение задачи, имеющей существенное значение для биологии (клеточной биологии, цитологии, гистологии) – изучены некоторые механизмы противоопухолевого действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма VVdGf-ApoS24/2 вируса осповакцины на ксенографты карциномы А431 человека и мышиную карциному Эрлиха.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте изложения материалов в рецензируемых печатных научных изданиях диссертационная работа соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автору Зонову Евгению Владимировичу следует присудить ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент:

Лушникова Елена Леонидовна,

профессор, доктор биологических наук, специальность:

03.00.11 – гистология, эмбриология и цитология

(по действующему перечню специальностей – **03.03.04** – клеточная биология, цитология, гистология);

Заведующая лабораторией цитологии

и клеточной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Институт молекулярной патологии и патоморфологии»

Адрес: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Телефон: 8(383) 334-80-03

E-mail: pathol@inbox.ru

Сайт института: <http://pathomorphology.ru>

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

Подпись Лушниковой Е.Л. заверяю:

Ученый секретарь ИМПМ

д.б.н., проф. О.П.Молодых

10 октября 2017

