



Директор ИМКБ СО РАН
Доктор биологических наук

С.А. Демаков

2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Зонова Евгения Владимировича «Механизмы онколитического действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма вируса осповакцины», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности «03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология»

Актуальность диссертационного исследования связана с важностью поиска новых средств терапии онкозаболеваний. Необходимы противораковые инструменты, обладающие одновременно высокой эффективностью, относительной доступностью, отсутствием серьезных побочных эффектов и избирательностью в отношении опухолевых и метастазирующих клеток. В связи с ограничением потенциала развития классических методов онкотерапии, все большее внимание уделяется альтернативным подходам, в число которых входит применение онколитических вирусов.

В настоящее время активно ведутся разработки рекомбинантных штаммов онколитических вирусов с улучшенными характеристиками. Генетическая модификация вирусов направлена на усиление их тропизма, противоопухолевых свойств, а также способности стимулировать иммунный ответ организма. Диссертационная работа Евгения Владимировича Зонова посвящена исследованию противоопухолевой активности модифицированного вируса осповакцины (BOB) VVdGF-ApoS24/2,

обладающего сниженными патогенными свойствами и обеспечивающего экспрессию гена, кодирующего белок апоптин. Уникальная особенность апоптина заключается в избирательной индукции апоптоза в опухолевых клетках. Целью работы Е.В.Зонова было изучение характеристик апоптин-продуцирующего штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB и механизмов его воздействия на опухолевые клетки.

Основные результаты работы, их достоверность и новизна

Комплексное исследование рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма вируса VVdGF-ApoS24/2 проводилось впервые, что позволило автору получить оригинальные данные о механизмах противоопухолевой активности. В частности, был обнаружен ранее неизвестный эффект, связанный с локализацией апоптина в цитоплазме клеток солидной карциномы A431 при заражении штаммом VVdGF-ApoS24/2 и выраженный в виде формирования крупных скоплений актиновых и промежуточных филаментов.

С помощью электронной микроскопии автором проведено изучение морфологических характеристик репродукции штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB в клетках ксенографтов карциномы A431 человека и трансплантатов карциномы Эрлиха мышей. На этих же моделях проведена оценка онколитического эффекта VVdGF-ApoS24/2 в сравнении с исходным штаммом Л-ИВП и установлены морфологические эквиваленты его составляющих.

В результате проведенных исследований автор показал, что рекомбинантный апоптин-продуцирующий штамм вируса VVdGF-ApoS24/2 BOB демонстрирует выраженный противоопухолевый эффект даже при однократном введении в привитые мышам ксенографты человеческой и мышинной карцином. Автор показал, что экспрессия гена апоптина в клетках, инфицированных вирусом VVdGF-ApoS24/2, хотя и не приводит к индукции апоптоза, может способствовать нарушению жизнедеятельности клеток, в

том числе, за счет остановки клеточного цикла в S-фазе с последующим уменьшением числа клеток в состоянии митоза.

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием экспериментальных моделей рака *in vivo* и применением современной научно-методической базы, включающей электронную микроскопию. Автором был выполнен значительный объем исследовательской работы с постановкой независимых экспериментов и надлежащих контролей. Данные обработаны с помощью адекватных методов математической статистики.

Научно-практическая значимость

Полученные в результате проведения работы данные позволяют дополнить существующие представления о механизмах противоопухолевого действия онколитических вирусов на основе ВОВ. В работе показана принципиальная возможность достижения терапевтического эффекта онколитического вируса без вовлечения эффекторных клеток иммунной системы, что может иметь значение для использования противоопухолевых препаратов у больных с симптомами иммунодефицита. Представленные в работе новые данные об эффектах интеграции гена апоптоина в геном рекомбинантного штамма ВОВ могут быть полезны при разработке новых противоопухолевых препаратов на основе онколитических вирусов.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Е.В.Зонова изложена на 109 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 18 рисунками и 2 таблицами, список цитированной литературы содержит 149 ссылок.

Во введении обоснован выбор темы, поставлены цели и задачи исследования, описаны научная новизна и научно-практическая значимость работы. В обзоре литературы приводится краткая историческая справка о

методах лечения онкологических заболеваний, рассматриваются современные тенденции и подходы в области разработки противоопухолевых средств терапии. Основной акцент сделан на область исследований, посвященных поиску и характеристике вирусов, обладающих онколитическими свойствами. Описаны подходы по улучшению онколитических свойств вирусов, созданию штаммов с направленным противоопухолевым действием, приводятся способы борьбы с побочными эффектами противоопухолевой виротерапии. Приведен перечень наиболее значимых работ в данной области исследования.

В разделе «Материалы и методы» описаны использованные автором методы микроскопии и иммуногистохимии, а также приведено описание экспериментальных моделей. Раздел свидетельствует о высоком уровне методической квалификации автора.

Глава «Результаты и обсуждение» включает описание экспериментов по оценке *in vitro* и *in vivo* противоопухолевой активности штамма Л-ИВП ВОВ и созданного на его основе апоптин-продуцирующей модификации VVdGF-ApoS24/2. В разделе «Заключение» автор обобщает полученные результаты и характеризует их фундаментальную и прикладную значимость. После этого следуют выводы, которые логично сформулированы и обоснованы данными экспериментальных исследований.

Результаты работы представлены в 7 публикациях, в том числе в 4-х статьях в научных журналах, рекомендованных списком ВАК РФ. Материалы диссертации были представлены на российских конференциях с международным участием. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

В целом, диссертация Е.В.Зонова представляет собой оригинальное исследование, имеющее очевидную научную и практическую значимость. Вместе с тем, помимо многочисленных достоинств работы, следует отметить ряд упущений в ее оформлении.

- Отсутствует информация о количестве животных в группах. Приведено лишь общее число мышей, использовавшихся в экспериментах. Частично данная информация приводится в одной из публикаций автора, но хотелось бы увидеть ее в тексте диссертационной работы;
- Автор не обсуждает в работе возможность влияния отсутствия экспрессии гена VGF на вирулентность и противоопухолевую активность VVdGF-ApoS24/2.
- Апоптотическая активность VVdGF-ApoS24/2 оценивается только с помощью одного морфологического метода. Возможно, использование дополнительных методов анализа, например флуоресцентной микроскопии с помощью красителей Annexin V-PE и 7-AAD позволило бы получить более полное представление о механизме и динамике действия апоптина в составе рекомбинантного штамма BOB;
- На стр. 68 автор пишет, что процесс гибели клеток ксенографтов карциномы A431 после введения в опухоль штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB нельзя отнести ни к некрозу, ни к апоптозу, поскольку на срезах опухолей не было обнаружено характерных морфологических признаков этих процессов. Это утверждение не вполне соответствует данным, приведённым ранее по тексту на с. 49 и на рис. 2.

Заключение

Диссертация Зонова Е.В. «Механизмы онколитического действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма вируса осповакцины» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология» является законченным научным исследованием, в котором решена важная задача по исследованию механизмов противоопухолевого действия апоптин-продуцирующего штамма вируса осповакцины.

Диссертационная работа отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждения ученых

степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор Зонов Е.В. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология».

Отзыв обсужден и утвержден на объединенном семинаре лаборатории иммуногенетики и отдела разнообразия и эволюции геномов ИМКБ СО РАН, протокол № 1 от 11 сентября 2017 г.

Заведующий лабораторией

иммуногенетики ИМКБ СО РАН, д.б.н.

А.В.Таранин

«20» сентября 2017

Таранин Александр Владимирович, д.б.н. по специальности 03.02.07 – генетика, Федеральное государственное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской Академии наук, 630090, г. Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева 8/2, taranin@mcb.nsc.ru, (383)363-90-72

Подпись д.б.н. А.В.Таранина

ЗАВЕРЯЮ:

Ученый секретарь

ИМКБ СО РАН



Л.Г. Ахмерова