

ОТЗЫВ
ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу

ВАСИЛЬЕВОЙ НАТАЛЬИ СЕРГЕЕВНЫ
«РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ТЕРАПИИ ГЛИОМ С ПОМОЩЬЮ
ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА VV-GMCSF-Lact»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.3 – «молекулярная биология»

Актуальность темы исследования. Глиома представляет собой злокачественное новообразование головного мозга, являясь одной из наиболее агрессивных и трудноизлечимых видов рака человека. Традиционные методы лечения глиом, такие как хирургическое вмешательство, химиотерапия и лучевая терапия достигли незначительного улучшения прогноза у пациентов с этим заболеванием. В последнее время развиваются и современные подходы, такие как иммунотерапии и таргетная терапия, которые находятся в стадии клинических испытаний. Однако единой схемы терапии глиом пока не разработано, поэтому необходимы дополнительные исследования для оценки новых терапевтических подходов к их лечению. В диссертационной работе для этой цели предлагается использовать рекомбинантный вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact, терапевтический потенциал которого пока оставался неисследованным. В связи с вышесказанным актуальность такого исследования ее вызывает сомнения.

Научная новизна. Многие результаты, полученные в работе Васильевой Н.С., являются новыми и оригинальными. Так, автором впервые показано, что VV-GMCSF-Lact способен проникать через гематоэнцефалический барьер. Установлено, что данная конструкция обладает высокой цитотоксической активностью *in vitro* и противоопухолевой эффективностью *in vivo* в отношении глиом человека и животных. Впервые выполнены эксперименты по оценке комбинированного действия VV-GMCSF-Lact и химиотерапевтических агентов, используемых при терапии злокачественных опухолей головного мозга. В работе также впервые показана перспективность использования VV-GMCSF-Lact вместе с

темозоломидом для лечения глиом. Также впервые показано, что в клетках глиом, устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact, снижается уровень онкосупрессорного белка p53 и повышается уровень белков-ингибиторов апоптоза Akt1 и белка XIAP.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты диссертационной работы Васильевой Н.С. важны, как для фундаментальной, так и прикладной наук. Эксперименты, проведенные *in vitro* и *in vivo*, открывают новые возможности для исследования фундаментальных механизмов канцерогенеза нейроглиальных клеток, а также развития резистентности к терапии трансформированных клеток. Практическая значимость полученных результатов также не вызывает сомнения. Доказательства прохождения рекомбинантного вируса VV-GMCSF-Lact через гематоэнцефалический барьер и его анти-пролиферативное действие делают данный вирус перспективным препаратом для терапии глиом человека.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа Васильевой Н.С. изложена на 192 страницах машинописного текста, содержит 45 рисунков и 9 таблиц. Она включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, состоящую из глав материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список цитируемой литературы с 373 источниками, и приложение.

Во «Введении» автор анализирует современное состояние проблемы терапии глиом, подчёркивая актуальность исследований по поиску новых подходов к лечению данного агрессивного заболевания. На основании этого она четко формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, практическую значимость полученных результатов, основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы посвящен исследуемой проблеме, а именно молекулярно-генетическим особенностям глиобластом и виротерапии как перспективному терапевтическому подходу. Здесь рассмотрены и проанализированы такие важные аспекты исследуемой проблемы, как гетерогенность глиомы и идентификаторы молекулярных подтипов, терапия глиом, включая такие подходы, как: хирургическая резекция, радиотерапия, химиотерапия, иммунотерапия. Делается особый акцент на онколитические вирусы в терапии глиом, приводятся современные данные о клинических испытаниях онколитических вирусов в качестве средств терапии глиом. Отдельной главой представлены данные о механизмах резистентности глиом к проводимой терапии, справедливо отмечается,

что вопрос о механизмах формирования клетками глиом резистентности к онколитическим вирусам остается на сегодняшний день недостаточно изученным. В целом, в обзоре, представлены необходимые и самые современные данные по исследуемой проблеме. В заключении автор справедливо отмечает перспективность виротерапии опухолей как эффективной стратегии лечения глиом.

Материалы и методы исследования адекватны поставленной цели и решаемым задачам. В работе использованы методы культивирования иммортализованных и первичных клеточных культур глиомы, современные молекулярно-биологические и морфометрические методы, а также методы клеточной биологии. Для обработки результатов использовались адекватные методы статистического анализа.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из семи подглав, где последовательно приводятся результаты проведенных экспериментов. На первом этапе были получены и охарактеризованы культуры клеток глиом из образцов опухолей пациентов. Автором было получено 5 первичных культур, которые имели типичную для глиом веретенообразную и звездчатую морфологию. Из этих культур, а также ранее полученных в лаборатории, 5 культур были способны формировать нейросферы. Важно отметить, что все используемые в работе клеточные культуры глиом были охарактеризованы по экспрессии поверхностных маркеров стволовых опухолевых клеток. Наряду с данными маркерами был также оценен уровень экспрессии с-Мус и SOX-2 в клетках исследованных культур. Далее, с использованием данных клеточных культур была оценена противоопухолевая и антиметастатическая эффективность препарата VV-GMCSF-Lact. В итоге был получен ряд интересных результатов. Показано, что чувствительность клеток к вирусу не зависела от степени злокачественности первичной опухоли. Результаты показали, что онколитический вирус VV-GMCSF-Lact распределяется по всем органам и тканям, включая мозг, и, что важно, селективно реплицируется в опухолевой ткани. Введение это препарата мышам с ксенографом пересаженной глиомы человека сопровождалось торможением роста опухолей и искусственного метастаза. Исследуемый онколитический вирус обладал большей противоопухолевой эффективностью, чем цитотоксический для глиом препарат темозоломид, а применение комбинации VV-GMCSF-Lact и

темозоломида является перспективным подходом в терапии глиом. Эти результаты позволили автору заключить, что онколитический вирус VV-GMCSF-Lact может быть перспективным противоопухолевым препаратом для лечения глиом человека. Важным результатом проведенного исследования является вывод о способности VV-GMCSF-Lact проникать через ГЭБ и реплицироваться в опухолевых клетках, а также его противоопухолевом действии на ортотопически трансплантированную глиому С6 крыс. На заключительном этапе были исследованы возможные механизмы, обуславливающие чувствительность клеток глиом человека к действию VV-GMCSF-Lact. Оказалось, что в клетках глиом, устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact, снижается уровень белка p53 и повышается уровень белков-ингибиторов апоптоза Akt1 и белка XIAP, которые могут являться потенциальными мишенями таргетной терапии в комбинации с VV-GMCSF-Lact. Автором был предложен возможный механизм, определяющий чувствительность клеток глиом человека к действию онколитического вируса VV-GMCSF-Lact, в основе которого лежат ключевые белки апоптоза и некроптоза, а также вирусных белков.

В разделе «Заключение» на основании всех экспериментальных данных подводится итог исследования о том, рекомбинантный онколитический вирус VV-GMCSF-Lact является перспективным препаратом для дальнейших доклинических и клинических испытаний в качестве средства терапии глиом.

В разделе «Выводы» приведены пять утверждений, которые являются обоснованными и полностью соответствуют поставленным целям и задачам.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на 5-ти всероссийских и международных конференциях. По результатам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Аннотация полностью соответствует содержанию диссертации и дает представление об основных разделах работы и полученных результатах.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе Васильевой Н.С. у меня нет. При ее прочтении у меня появились небольшие замечания и вопросы для научной дискуссии:

1. Из описания культур (с. 55) не ясно, как были получены иммортализованные культуры клеток глиобластомы образцов опухолей культуры клеток глиом человека MG1, MG2, MG4, AS1 и AS2.
2. Почему ранее полученные культуры охарактеризованы по микрофотографиям, а полученные автором культуры глиом человека окрашены гематоксилином и эозином, что лучше позволяет оценить морфологию клеток?
3. Почему клеточные культуры охарактеризованы по маркерам стволовых опухолевых клеток, таких как CD133, CD44, CD15 и CD171?
4. Соотносилась ли экспрессия EGFR и др. маркеров в клетках с клинико-патологическими параметрами пациента, чья опухоль была источником получения культуры?
5. Иногда в тексте можно встретить опечатки и неудачные выражения. Например, на с. 54 Вирусный концентрат, С. 72. Клиническая характеристика культур клеток глиом.

Все указанные замечания не снижают значимости диссертационной работы и моей высокой оценки выполненного исследования.

Заключение. Работа Васильевой Н.С. соответствует требованиям, установленным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Таким образом, соискатель Васильева Наталья Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 — «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»
доктор биологических наук, профессор



Гуляева Людмила Федоровна

Дата: «16» июня 2024 г.

Контактные данные:

тел.: +7(913)9161272, e-mail: lfgulyaeva@gmail.com; l.guliaeva@g.nsu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.01.03 – Молекулярная биология и 03.01.04 – Биохимия.

Адрес места работы: 630060, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12, тел. 8(383)334-88-40.

Подпись д.б.н., профессора Л.Ф. Гуляевой

Заверяю:

Ученый секретарь

д.б.н.



Пальчикова Наталья Александровна

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Адрес: 630117, Россия, Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Тимакова 2, Тел. 8383 333-65-37, E-mail: director@frcftm.ru, <http://www.frcftm.ru>.

Дата: «17» июня 2024 г.