

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. Глиомы являются наиболее распространенным типом опухолей центральной нервной системы. Из образований 2-3 степени злокачественности часто развиваются опухоли 4 степени, почти всегда летальные. Поскольку глиальные опухоли растут диффузно и удалить всю опухолевую массу невозможно, даже при полной резекции опухолей головного мозга очень высока вероятность рецидива. Химиотерапия с введением темозоломида, лучевая терапия и хирургическое вмешательство используются для уменьшения объема опухоли. Иссечение как можно большего объема опухоли без повреждения функционально важных участков мозга продлевает выживаемость и улучшает качество жизни. Уровень выживаемости среди пациентов с глиобластомой составляет около 50% в течение 1-го года, 25% – в течение 2-го года и от 10 до 15% - в течение 5-ти лет после стандартного многокомпонентного лечения. Эти неутешительные данные показывают критическую необходимость разработки новых, более эффективных методов лечения глиобластом. Поэтому поставленная в диссертационной работе цель, направленная на оценку терапевтического потенциала рекомбинантного онколитического вируса VVGMCSF-Lact в отношении глиомы человека и разработка подходов терапии глиальных опухолей с помощью VV-GMCSF-Lact, является актуальной научной проблемой современной молекулярной биологии.

Научная новизна диссертационной работы Васильевой Н.С. не вызывает сомнения. Так, автором впервые показана способность VV-GMCSF-Lact проникать через гематоэнцефалический барьер и селективно реплицируется в опухолевой ткани. Автором впервые доказано, что VVGMCSF-Lact обладает высокой

цитотоксической активностью *in vitro* и противоопухолевой эффективностью *in vivo* в отношении глиом человека и животных. Впервые предложен научно-обоснованный подход к совместному применению VV-GMCSF-Lact и темозоломида, который может быть реализован при дальнейших доклинических и клинических исследованиях.

Автором предложена оригинальная модель, описывающая механизмы, участвующие в формировании чувствительности клеток глиом человека к действию онколитического вируса VV-GMCSF-Lact, основанная на взаимодействии клеточных и вирусных белков, которая определяет киназу Akt1 и белок XIAP как потенциальные мишени таргетной терапии в комбинации с VV-GMCSF-Lact.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты диссертационной работы Васильевой Н.С. представляют интерес, как для фундаментальной, так и прикладной науки. Данные о высокой цитотоксической активности онколитического вируса VVGMCFSF-Lact в отношении клеток иммортализованных линий глиобластомы и полученных из образцов опухолей пациентов культур глиом важны для планирования дальнейших доклинических и клинических испытаний этого перспективного препарата. Результаты исследования эффективности различных схем комбинации VV-GMCSF-Lact и темозоломида доказывают перспективность этого подхода терапии глиом и могут быть использованы при проведении последующих клинических испытаний. Результаты диссертационной работы имеют также и практическое значение, так как полученная и охарактеризованная в ходе работы панель культур клеток глиом человека из образцов опухолей различной степени злокачественности может найти применение в исследованиях противоглиомных препаратов.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа Васильевой Н.С. изложена на 192 страницах, включает 45 рисунков, 9 таблиц и 3 приложения. Она включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, состоящий из 373 источников.

Во введении автор обосновано представляет актуальность выбранного направления исследования, на основании чего четко формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, практическую значимость полученных результатов, основные положения, выносимые на защиту.

Основной целью данной работы являлась оценка терапевтического потенциала рекомбинантного онколитического вируса VVGMCSF-Lact в отношении глиомы человека и разработка подходов терапии глиальных опухолей с помощью VV-GMCSF-Lact. Для достижения поставленной цели Натальей Сергеевной было поставлено 7 задач, которые были успешно решены в ходе выполнения исследования, полученные результаты нашли отражение в выводах.

Обзор литературы посвящен особенностям и классификациям глиобластом, а также методам и подходам к их терапии, и, в особенности, методам виротерапии как перспективному терапевтическому подходу. В части обзора, посвященной гетерогенности глиомы и идентификаторам молекулярных подтипов, подробно описываются молекулярные подтипы глиом и выявленные в настоящее время прогностические и предиктивные факторы, определяющие исход заболевания. В части обзора, посвященной терапии глиом рассмотрены как общепринятые методы, входящие в медицинский стандарт, так и экспериментальные методы, которые являются предметом внимания исследователей. Особое внимание уделено рассмотрению проблем использования онколитических вирусов для терапии глиом, рассмотрены типы применяемых вирусов, их преимущества и недостатки. В отдельной главе приведена информация об известных к настоящему времени данных о механизмах резистентности глиом к отдельным видам терапии: радиотерапии, химиотерапии, иммуно- и виротерапии.

Экспериментальная часть полностью адекватна поставленной цели и решаемым задачам. В работе использован широкий спектр современных молекулярно-биологических методов и методов клеточной биологии. Это, прежде всего, классические методы - получение клеточных линий из образцов пациентов, ОТ-ПЦР, Вестерн блот анализ, иммунопреципитация, флуоцитометрия. Большой блок методов связан с экспериментами на лабораторных животных - мышах и крысах, с ксенотрансплантированными и сингенными опухолями.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из семи частей, где последовательно приводятся эксперименты по получению и характеристика культур клеток глиом, полученных из образцов опухолей пациентов (часть 1), а также по оценке цитотоксической активности VV-GMCSF-Lact в отношении клеток иммортализованных линий и полученных культур глиом (часть 2). Оценка

противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact убедительно продемонстрирована в отношении ксенографтов глиом человека, трансплантированных мышам (часть 3) и сингенных глиом у крыс (часть 5). Распределение VV-GMCSF-Lact по органам и тканям при внутривенном введении лабораторным животным изученное в части 4 достоверно показывает, что VV-GMCSF-Lact способен проникать через ГЭБ и распределяется по всем органам и тканям, включая головной мозг. Отдельная часть (часть 6) посвящена анализу совместного действия VV-GMCSF-Lact и химиопрепаратов в отношении глиом человека. Согласно полученным данным, терапия глиобластомы вирусным препаратом VV-GMCSF-Lact как в режиме монотерапии, так и в комбинации с ТМЗ, значительно эффективнее, чем терапия только ТМЗ. применение сначала VV-GMCSF-Lact, а затем ТМЗ приводит к большей деструкции опухолевой ткани в отношении глиобластомы человека в модели ксенографтов. В заключительной части результатов (часть 7) рассматриваются возможные механизмы, обуславливающие чувствительность клеток глиом человека к действию VVGMCSF-Lact и предложена оригинальная модель такого механизма. Показано, что в клетках глиом, более устойчивых к действию VVGMCSF-Lact, снижен уровень белка p53 и повышен уровень киназы Akt1 и белка XIAP, которые могут являться потенциальными мишенями таргетной терапии в комбинации с VV-GMCSF-Lact.

В разделе «Заключение» на основании всех экспериментальных данных подводится итог исследования о том, что VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью *in vitro* и способен ингибировать рост опухолей на различных *in vivo* моделях и сформулированы предполагаемая схема терапии, а также предложены пути повышения эффективности действия онколитического вируса, которые могут быть проверены в последующих исследованиях.

В разделе «Выводы» сформулированы 5 выводов, которые являются обоснованными, подтверждаются изложенными в работе результатами и полностью соответствуют поставленным целям и задачам.

По результатам диссертации опубликовано 4 работы в рецензируемых научных журналах. Основные результаты работы были представлены на 5 конференциях.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и дает представление об основных полученных результатах.

Замечания. Возникшие при прочтении замечания носят дискуссионный или технических характер и не уменьшают значимость научного исследования:

1. Раздел 2.3.10 описывает биораспределение, однако при такой длительной инкубации это скорее селективная репликация, стоило померить через более короткое время, чтобы говорить о биораспределении.
2. Вопрос дискуссионного характера, будут ли отличия в эффективности действия при внутримышечном или подкожном введении вируса? Данные на Стр. 108 говорят о том, что внутриопухолевые инъекции нежелательны из-за усиления метастазирования. Какие другие способы введения можно рассматривать?
3. Какой предел обнаружения вируса в эксперименте на Рис. 18? Почему для построения калибровочных кривых выбрано разведение препарата вируса в буфере, а не добавление в гомогенат или кровь с последующим выделением как в опыте? Вопрос связан с довольно высоким уровнем вируса в крови через 7 дней после введения и отсутствием преимущественного накопления в печени.
4. Рис. 25 – указано количество погибших клеток, а измерено количество живых, изменение которого может быть не только из-за гибели, но и из-за остановки деления.
5. Некоторое (не критичное) количество технических ошибок: десятичные точки и запятые, Рис. 9 - ничего не видно и размер баров не одинаковый. Не для всех рисунков с Вестерн блотом приведены количественные данные.

Все указанные замечания не снижают значимости диссертационной работы и 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:

Главный научный сотрудник
лаборатории биохимии нуклеиновых
кислот, Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки Институт
химической биологии и
фундаментальной медицины Сибирского
отделения Российской академии наук
(ИХБФМ СО РАН)
доктор биологических наук (03.01.04 —
биохимия)

630090, Россия, г. Новосибирск, пр. акад.
Лаврентьева, 8, тел. +7(383)3635161
телефон: +7(383)3635161,
e-mail: elena_ch@niboch.nsc.ru



Черноловская Елена Леонидовна

Подпись д.б.н., Е.Л. Черноловской

Заверяю:

Ученый секретарь ФГБУН ИХБФМ СО
РАН, к.б.н.

телефон: +7(383)3635155

e-mail: secretary@niboc.nsc.ru



Логашенко Евгения Борисовна

Дата отзыва: «19» июня 2024 г.