

ОТЗЫВ

официального оппонента заместителя руководителя производственного направления ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», доктора медицинских наук, профессора Игнатъева Георгия Михайловича по диссертации Юрченко Ксении Сергеевны на тему: «Изучение противоопухолевого потенциала диких штаммов вируса болезни Ньюкасла на опухолевых клетках человека и на модели экспериментального онкогенеза *in vivo*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Актуальность темы диссертации

Несмотря на интенсивное развитие методов молекулярной и клеточной биологии и способов ранней диагностики и комплексной терапии злокачественных новообразований, регистрируется рост выявляемости и смертности населения от онкологических болезней. На сегодняшний день основными методами онкотерапии по-прежнему остаются традиционное хирургическое удаление опухоли, применение химиотерапевтических препаратов и лучевая терапия, которые далеко не всегда достигают высокоэффективных результатов, имеют зачастую локальное воздействие, а в случаях с развитием метастазов остаются малоэффективными. В последние годы развивается таргетный подход терапии опухолей, среди которых виротерапия - лечение злокачественных новообразований с использованием для селективного лизиса опухолевых клеток либо генетически-модифицированные инфекционные агенты, либо вирусов, проявляющие природные онколитические свойства – является «модным». В пользу целесообразности применения виротерапии для лечения злокачественных новообразований говорит селективная и эффективная репликация вирусов преимущественно в неопластических клетках с минимальной токсичностью для нормальных здоровых тканей, уничтожение трансформированных клеток и распространение вирусного потомства на соседние опухолевые клетки. Кроме того помимо непосредственного лизиса раковых клеток онколитические вирусы способны вызывать активацию иммунного ответа организма посредством стимулирования выработки цитокинов. Среди широкого разнообразия онколитических вирусов возможным кандидатом в поиске эффективного агента для виротерапии является вирус болезни

Ньюкасла (семейство Paramyxoviridae, род Avulavirus). Вирус болезни Ньюкасла (ВБН) не патогенен для человека и, являясь вирусом птиц и вызывая у них высоко контагиозное заболевание, обуславливает отсутствие иммунитета у человека к этому вирусу. Данные о строении ВБН, механизмах проникновения в клетку и репликации вируса хорошо описаны в научной литературе, как и результаты взаимодействия литических и нелитических штаммов ВБН в доклинических испытаниях на разных культурах опухолевых и нормальных клеток млекопитающих. Имеется информация о способности ВБН избирательно лизировать трансформированные клетки при экспериментальном онкогенезе на модели *in vivo*. Показано, что различные штаммы ВБН могут отличаться по своим биологическим эффектам, причем это зависит не только от особенностей вирусного штамма, но и от культуры опухолевых клеток, на которую осуществляется воздействие. Опубликованные результаты дают возможность предположить, что одним из способов повышения онколитических свойств является отказ от излишней аттенуации и использование природных штаммов ВБН. Некоторые аттенуированные селекцией штаммы ВБН прошли клинические исследования в США, Канаде, Китае и странах Европы. Проведенные исследования продемонстрировали безопасность исследуемых штаммов для человека и способность подавлять развитие опухолей и продлевать жизнь опухолевых больных. Однако противоопухолевый эффект исследуемых препаратов на основе ВБН в клинических испытаниях оказывается значительно ниже ожидаемого результата, что возможно связано с использованием в качестве онколитических агентов преимущественно аттенуированных селекцией и рекомбинантных штаммов ВБН. В Российской Федерации разработки противоопухолевых виротерапевтических препаратов не являются программным исследованием. Таким образом, опираясь на имеющиеся результаты литературных данных об использовании ВБН в качестве противоопухолевого агента, тенденции роста числа разработок в области виротерапии в мире, проведение поиска онколитических изолятов ВБН и исследования противоопухолевого потенциала на опухолевых клетках в системе *in vitro* и *in vivo* актуально для РФ.

В связи с этим актуальность работы Юрченко Ксении Сергеевны по изучению противоопухолевого потенциала диких штаммов вируса болезни Ньюкасла не вызывает сомнений.

Новизна исследования, полученных результатов и выводов, и их достоверность

Автором впервые проведено развернутое исследование по оценке цитотоксических свойств коллекции диких штаммов вируса болезни Ньюкасла, выделенных из природных резервуаров, в отношении опухолевых клеточных линий человека (HCT116+/, HeLa, A549 и MCF7). Получены данные о наличии онколитических свойств у природных не аттенуированных и не адаптированных штаммов вируса болезни Ньюкасла, выделенных от диких мигрирующих птиц на территории Российской Федерации. В результате проведенной работы выбран природный голубиный штамм ВБН NDV/Altai/pigeon/770/2011, обладающий выраженным онколитическим потенциалом в отношении опухолевых клеток человека. Описано влияние серии интратуморальных инъекций природного мезогенного штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 на опухолевую прогрессию карциномы Кребс-2 на иммунокомпетентных мышах. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* доказана безопасность штамма для нормальных здоровых клеток, исследована динамика изменения прогрессии опухолевого процесса после курса виротерапии природным штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011, что наряду с динамикой изменений продукции сосудистых факторов позволило сделать вывод о наличии антинеоангиогенных свойств вируса.

Достоверность результатов проведенной научной работы заключается в использовании современных методов исследования, статистической обработкой полученных результатов экспериментов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Юрченко Ксении Сергеевны выполнена на высоком методическом уровне с применением вирусологических, серологических, молекулярно-биологических, гистологических (световая и флюоресцентная микроскопия, иммуногистохимическое выявление маркеров, морфометрический анализ) методов. Исследования проведены на сертифицированном оборудовании.

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, основываются на большом объеме экспериментального материала, являются достоверными и логически вытекают из результатов проведенных

исследований.

Значимость для науки и практики результатов диссертации, возможные конкретные пути их использования

Полученные автором в ходе работы данные о наличии онколитического потенциала у изолятов вируса болезни Ньюкасла, выделенных от диких мигрирующих птиц на территории Российской Федерации, могут быть использованы для дальнейших исследований и разработок виролепептических препаратов, направленных на лечение с онкологическими заболеваниями, что отражено в патенте №2562115 «Штамм вируса болезни Ньюкасла для изучения онколитических свойств и механизмов онколизиса для создания прототипного противоопухолевого препарата». Исследования показали наличие способности у дикого природного штамма вируса болезни Ньюкасла не только лизировать опухолевые клетки, но и участвовать в торможении опухолевой прогрессии посредством ингибирования кровоснабжения опухоли. Полученные в работе данные могут быть использованы при подготовке лекционных и практических занятий курсов вирусологии.

Оценка содержания диссертации

Диссертация построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 17 отечественных и 273 зарубежных источника. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 40 рисунками.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, определены научная новизна и практическая значимость, методология исследования, выделены основные положения, выносимые на защиту, представлены сведения по апробации результатов, указан личный вклад автора.

В первой главе (обзор литературы) представлен анализ литературных данных касающихся темы работы, а именно – частоты встречаемости опухолей, их локализации, подходов к лечению злокачественных новообразований, таргетной терапии онкологических заболеваний, использования вирусов для «лечения» новообразований. Отдельно проводится анализ литературы посвя-

щенной ВБН – структуры вируса, механизмов репликации, история использования ВБН в вирусной терапии рака, механизмам противоопухолевого действия ВБН. Глава содержит анализ имеющейся литературы об использовании онколитических вирусов в качестве антиангигенных терапевтических агентов.

Вторая глава традиционно посвящена описанию объектов, материалов и методов исследования, использованных в работе. Описанные соискателем методы свидетельствуют о его разноплановой подготовке. Все методы, с использованием которых соискателем были получены экспериментальные результаты, отражены в данной главе. Статистическая обработка проводилась с использованием t-критерия Стьюдента.

В третьей главе представлены результаты собственных исследований, которые включают в себя характеристики штаммов ВБН, использованные в работ, онколитическую активность штаммов ВБН на опухолевых клетках человека (*in vitro*), а именно – A549, MCF7, HeLa, HCT116. Автором показано, что онколитическая активность проявляется у использованных штаммов по-разному. Нет штамма, который обладает высокой онколитической активностью в отношении всех использованных линий клеток. В то же время, используя выбранные линии клеток как скрининговую модель, Ксения Сергеевна выбрала 7 из 44 природных штаммов ВБН с высоким онколитическим потенциалом. В дальнейшем был проведен филогенетический анализ 4 из 7 штаммов по гену белка F. Показано, что все штаммы относятся к разным генотипам. Перед началом исследований *in vivo* автором на модели *in vitro* был выбран штамм, обладающий наибольшей онколитической активностью в отношении клеток карциномы Кребс-2. Именно этот штамм - NDV/Altai/pigeon/770/2011 – был использован в опытах *in vivo*. Результаты исследований *in vivo* свидетельствуют о влиянии интратуморального введения штамма на развитие и разрешение карциномы Кребс-2 у экспериментальных животных. Результаты визуального наблюдения, измерения объема бедра, МРТ, гистологического исследования тканей свидетельствуют об онколитической активности штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 в отношении карциномы Кребс-2. Также введение указанного выше штамма способствует ингибированию ангиогенеза в опухолевой ткани, что подтверждается снижением численности сосудов, уменьшении плотности клеток с гемопоезическим маркером CD34 и блокаде рецепторов фактора роста эндотелия сосудов VEGFR.

Общие выводы диссертационной работы полностью отражают полученные результаты исследования и соответствуют поставленной цели и задачам.

По теме Результаты диссертации опубликованы в 24 печатных работах, в том числе 7 в статьях (из них 4 - в изданиях перечня ВАК РФ) и 14 в виде тезисов. Получено три патента. Представление результатов работы проводилась на российских и международных конференциях.

Работа построена логично, читается и воспринимается легко, нет сленга, выводы полностью соответствуют проведенным исследованиям. Результаты исследований статистически достоверны и убедительны. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

При рассмотрении диссертационной работы возникли следующие **вопросы, предложения и замечания:**

1. В работе имеются обидные опечатки, не удачные словосочетания (например – «инактивированные белки F и HN» стр.38, «инфицирование организма вирусом у людей и животных, как правило, очень схоже» - стр.39).
2. Литературный обзор можно было ограничить в объеме, не представлять анализ литературы, напрямую не связанной с темой работы. В то же время, ссылаясь на регуляторные правила США (FDA) по клиническим исследованиям, следовало указать и национальные правила. В этом разделе работы обсуждение результатов клинических исследований следовало давать более сдержано.
3. Не очень удачно обсуждение роли овальбумина в вакцинах, для производства которых первично трипсинизированные фибробласты эмбрионов кур не используются (стр.79).
4. Если вопрос овальбумина как аллергена в препаратах был автором затронут в отношении вакцинных препаратов (в которых он достаточно жестко контролируется) следовало указать содержание овальбумина в препаратах, полученным автором, особенно на стадии пассажа на РКЭ. В связи с этим следовало дать больше характеристик самих РКЭ – источник получения, наличие контаминации (или ее отсутствие), как контролируется контаминация РКЭ поставщиком, или при входном контроле РКЭ – свободны ли РКЭ, использованные автором для работы, от ВБН, вируса лейкоза кур, микоплазмы. С ответом на эти вопросы и решением этих задач автор столкнется, если будет продолжать начатое исследование.
5. Необходимо пояснить, почему определяя титр вируса в TCID₅₀/мл при

оценке онколитической активности штаммов использовали дозу, определяемую в ГА. Насколько эти показатели коррелируют?

6. Подпись к рисунку 21 следовало сделать более информативной.

Сделанные замечания и предложения никак не умаляют огромный объем результативной работы, проведенной соискателем, не носят принципиального характера и не влияют на общую оценку диссертационной работы.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Юрченко Ксении Сергеевны «Изучение противоопухолевого потенциала диких штаммов вируса болезни Ньюкасла на опухолевых клетках человека и на модели экспериментального онкогенеза *in vivo*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология, является самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержатся решения актуальных задач современной вирусологии.

Диссертационная работа по своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов соответствует требованиям п. 9 - 14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, (с изменениями от 21 апреля 2016 г. № 335), предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Юрченко Ксения Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Официальный оппонент:

заместитель руководителя производственного
направления федерального государственного
бюджетного научного учреждения «Федеральный
научный центр исследований и разработки
иммунобиологических препаратов им. М.П.
Чумакова РАН»,
доктор медицинских наук (03.02.02 – вирусология),
профессор

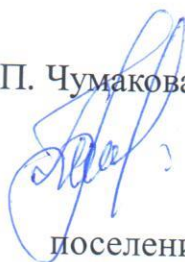
Игнатьев Георгий Михайлович

Подпись Игнатьева Г.М. заверяю:

Ученый секретарь

ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»

к.б.н.



Белякова Алла Владимировна

Почтовый адрес: 108819 поселение Московский, посёлок Института
полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, город Москва

тел: +7 495 841-90-02

e-mail: marburgman@mail.ru ; ignatjev_gm@chumakovs.su

