

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора
по научной работе
ФБУН НИИ
эпидемиологии и
микробиологии имени Пастера,
В.Г. Дедков



« 11 » сентября 2019 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости 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 к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

Актуальность исследования

В настоящее время отмечается устойчивая тенденция роста онкологических заболеваний в мире, что объясняется старением населения, экологическими, экономическими и другими факторами. По данным Росстата РФ, в 2017 г. в России впервые выявлено почти 541 тыс. онкологических больных, умерло от злокачественных новообразований 290,7 тыс. больных, что составляет 15,9% в общей структуре смертности (вторая причина после сердечнососудистых заболеваний). Около 40% впервые выявленных злокачественных новообразований имеют III-IV стадию заболевания, что обуславливает достаточно высокий показатель однодневной летальности (22,5%). По данным Фонда независимого мониторинга «Здоровье», в 2018 году смертность населения от рака выросла в 43 регионах России

Очевидно, что наряду с использованием традиционных подходов к терапии онкозаболеваний (хирургическое вмешательство, химио- и лучевая терапия), разработка новых, более эффективных, таргетных подходов к терапии опухолей является весьма

актуальной задачей. Возможность применения для этой цели онколитических вирусов – перспективное направление медицинской вирусологии, так как эффективность виротерапии опухолей может быть обусловлена комплексным, как прямым вирулитическим действием, так и опосредованным, иммуностимулирующим действием подобных препаратов.

В этой связи поиск и разработка эффективных вирусных средств, обладающих таргетным действием на клетки-мишени, с последующим их внедрением в клиническую практику, является приоритетной задачей как медицинской науки, так и практического здравоохранения.

Таким образом, диссертационное исследование ЮРЧЕНКО Ксении Сергеевны, посвященное изучению противоопухолевого потенциала диких штаммов вируса болезни Ньюкасла в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, весьма актуально и своевременно.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов обусловлена комплексной оценкой цитотоксических свойств коллекции штаммов вируса болезни Ньюкасла (ВБН). В опытах *in vitro* автором получены результаты, свидетельствующие о наличии онколитических свойств в отношении опухолевых клеточных линий человека у «диких» штаммов ВБН. На основании проведенных исследований диссертантом определен, как модельный, штамм NDV/Altai/pigeon/770/2011, обладающий наиболее выраженными онколитическими свойствами в опытах *in vitro*. Показана его безопасность для не пораженных опухолю клеток (мононуклеары периферической крови), а в экспериментах *in vivo* – эффективность воздействия на карциному Кребс-2. Автором предложен механизм противоопухолевого действия ВБН

Проведен полногеномный сиквенс двух штаммов вируса болезни Ньюкасла, проявляющих выраженный цитотоксический потенциал на опухолевых клетках - NDV/Altai/pigeon/770/2011 и NDV/Yakutia/mallard/852/2011, а также двух штаммов с менее выраженным потенциалом. Получены новые сведения о генетической принадлежности штаммов ВБН, о возможных путях их распространения.

Научная новизна исследования подтверждается и полученным автором патентом РФ на изобретение «Штамм вируса болезни Ньюкасла для изучения онколитических свойств и механизмов онколизиса для создания прототипного противоопухолевого препарата» (№2562115).

Практическая значимость. Результаты исследования могут быть использованы для дальнейшей практической разработки и внедрения противоопухолевых препаратов комплексного воздействия, обусловленного как прямым лизисом опухолевых клеток, так и ограничением (или предотвращением) метастазирования. В ходе работы диссертант выделила и депонировала в Государственную коллекцию вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского» МЗ РФ два штамма ВБН с выраженными онколитическими свойствами, которые могут быть использованы для дальнейших исследований в данном направлении.

Обоснованность и достоверности научных положений, выводов обеспечена использованием широкого спектра вирусологических (выделение, идентификация, определение биологической активности вирусов), молекулярно-генетических (выделение РНК, подготовка ДНК-библиотек и секвенирование) гистологических, иммуногистохимических методов, применением методов световой и флуоресцентной микроскопии и морфометрического анализа. Используя комплекс указанных методов, автор провела оценку противоопухолевого действия обширной коллекции (44 штамма) «диких» штаммов ВВН как в опытах *in vitro* (опухолевые клеточные линии человека), так и в экспериментах *in vivo* (мышь линии BALB/c).

Статистическая обработка результатов проведена адекватными методами, с использованием t-критерия Стьюдента, а также с помощью пакета статистических программ «Statistica 6.0». Для обработки данных полногеномного секвенирования обоснованно использована компьютерная программа «CLCGenomicsWorkbench 5.5» (CLC Bio, США).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту, отражающие научную новизну и практическую значимость работы и обоснованы результатами собственных исследований. Выводы логично вытекают из материалов диссертации.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности, подтверждение публикаций автора.

Автором самостоятельно проведен анализ литературных источников, научно-методическое обоснование проблемы, постановка и решение основных задач исследования. Определяющим является личный вклад К.С. Юрченко в анализ, систематизацию, обобщение и интерпретацию полученных результатов.

Диссертация построена по традиционной схеме, изложена на 154 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 40 рисунками. Список литературы состоит из 290 литературных источников, включающих 17 отечественных и 273 зарубежных авторов.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, определены цель, задачи диссертационной работы, методология проведенного исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая значимость работы, описана апробация результатов исследования.

Первая глава посвящена обзору данных литературы по основной теме работы на основании анализа научных публикаций за период 1971-2018 годов, с существенным преобладанием работ, опубликованных в последние 5 - 9 лет. В обзоре изложены современные представления о биологии опухолей и подходы к онкотерапии, в том числе последние научные достижения в области таргетной терапии, включая исследования по разработке препаратов для виротерапии опухолей. Диссертант подробно освещает биологию ВВН, проводит оценку имеющихся в специальной литературе данных

относительно ВВН, как вирусного противоопухолевого агента и перспектив его использования в виротерапии, описывает механизм противовопухолевого действия ВВН. Изложение материала помогает глубже познакомиться с проблемой, которой посвящено диссертационное исследование; проведенный анализ имеющейся литературы подтверждает актуальность диссертационной работы.

Во второй главе представлены сведения об использованных в работе материалах и методах исследования. Для изучения коллекции из 44 штаммов ВВН, автором применен широкий спектр методов, включающий выделение штаммов ВВН, их накопление, титрование, культивирование в перевиваемых культурах, а также в мононуклеарах периферической крови условно здоровых людей. Цитолитические свойства вирусов исследованы в опухолевых клетках человека. Подробно описаны использованные светооптические иммуногистологические, морфологические, молекулярно-генетические методы.

Третья глава диссертации посвящена изложению результатов собственных исследований. Глава начинается с описания коллекции из 44 штаммов ВВН, выделенных от диких мигрирующих птиц преимущественно на территории Сибири и Дальнего Востока Российской Федерации в период 2008-2014 гг., сравнения способов накопления штаммов в двух системах хозяйских клеток: развивающихся куриных эмбрионах и перевиваемой линии клеток Vero. Автор обосновывает выбор 28 изолятов вируса для проведения дальнейших этапов работы. Онколитическая активность штаммов оценивалась диссертантом в нескольких опухолевых клеточных линиях человека: клетках карциномы толстой кишки (HCT116), клетках эпидермоидной карциномы рака шейки матки (HeLa), клетках немелкоклеточной карциномы легкого (A549), клетках аденокарциномы молочной железы (MCF7). Представленные результаты свидетельствуют как о различной чувствительности клеточных линий к ВВН, так и о различных онколитических свойствах природных изолятов вируса. Автором установлено, что наибольшей онколитической активностью в отношении исследованных клеточных линий обладают 7 штаммов ВВН; выявлен дозозависимый эффект воздействия вируса на клетки.

Для контроля безвредности возможного применения штаммов ВВН в терапии опухолей, Юрченко К.С. исследовала их цитотоксическое воздействие на нормальные клетки человека (мононуклеары периферической крови). Результаты этой части работы, выполненной на трех штаммах: NDV/Altai/pigeon/770/2011, NDV/Yakutiya/mallard/852/2011, NDV/Adygea/duck/12/2008 – представлены в следующем разделе главы 3, и демонстрируют отсутствие токсического действия штаммов на МНПК. Экспериментальные исследования, выполненные Юрченко К.С. в опытах *in vitro*, завершаются оценкой онколитического потенциала указанных штаммов ВВН в отношении опухолевой линии клеток Кребс-2, по результатам которой автор останавливает выбор на штамме NDV/Altai/pigeon/770/2011, активно снижающим жизнеспособность опухолевых клеток (на 35-40%). Этот штамм использован для

исследования безвредности и противоопухолевой активности ВБН в экспериментах *in vivo*.

В разделе 3.9 показано, что однократное внутривенное введение мышам линии BALB/c штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 в дозе 6,7 IgTCID₅₀/0,5 мл не вызывает развития острой токсичности, а также патологических изменений в жизненно важных органах мышей (легких, селезенки, печени, почек). Последнее подтверждено исследованием гомогенизатов тканей животных в ОТ-ПЦР и при инфицировании чувствительных систем клеток (ПКЭ, клетки Vero).

В последней части главы 3 (3.10) изложены результаты изучения противоопухолевой активности модельного вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011 в отношении солидной опухоли мышшиной карциномы Кребс-2. Данные о сдерживании роста опухоли на фоне введения серии интратуморальных инъекций вируса болезни Ньюкасла первоначально были получены в пилотном проекте. Результаты были воспроизведены в повторном эксперименте, где изучалась динамика изменений опухоли на разных сроках проведения интратуморальной вираотерапии и возможные механизмы этого процесса. Диссертант выявила снижение скорости роста опухоли под воздействием виротерапии: установлено, что на 20-е сутки после курса инъекций в опытной группе мышей размер опухоли в среднем был более чем в 2,6 раза меньше по сравнению аналогичным показателем в контрольных группах животных. Противоопухолевая активность NDV/Altai/pigeon/770/2011 определялась автором также по критериям «объемной плотности некрозов» и «численной плотности сосудов» в динамике наблюдения опухолевой ткани у животных опытной и контрольных групп. В завершении раздела 3.10 дана оценка патоморфологических изменений опухолевой ткани после виротерапии, а также предложен возможный противоопухолевый механизм действия исследуемого природного штамма ВБН.

В разделе «Заключение» содержится обсуждение полученных автором результатов в контексте с имеющимися в литературе данными по изучаемой проблеме; представлены перспективы дальнейшей разработки темы исследования.

В «Приложении» представлены сведения о депонировании штаммов NDV/Yakutia/mallard/852/2011 и NDV/Altai/pigeon/770/2011 в Госколлекцию музейных вирусов (ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» МР), а также получения патента РФ на изобретение №2562115

«Штамм вируса болезни Ньюкасла для изучения онколитических свойств и механизмов онколизиса для создания прототипного противоопухолевого препарата»

Автореферат диссертации отражает её основные положения. Апробацию результатов работы следует признать достаточной: по теме диссертации опубликовано 24 печатные работы, из них четыре статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на четырех международных и одной российской научных конференциях.

Вопросы и замечания.

1. Из таблицы 1, представленной в автореферате диссертации, следует, что между гемагглютинирующей активностью и инфекционным титром выделенных штаммов ВБН корреляции нет. Например, у штамма NDV/Sakhalin/pintail/53/2010 гемагглютинирующая активность в РГА (в системе РКЭ) равна 1:256, а инфекционный титр – только 3,4 IgTCID₅₀/мл. У штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 титр в РГА 1:128, а инфекционный – 7,2 IgTCID₅₀/мл, то есть на четыре порядка больше. Чем автор объясняет использование ГА-титра для определения заражающей дозы штаммов ВБН при инфицировании клеток с целью определения онколитической активности *in vitro* учитывая, что результат оценивался по цитопатогенному действию в культурах опухолевых клеток? Не логичнее было бы использовать заражающие дозы, определяемые по инфекционному титру вируса, учитывая, что равные ГА-дозы двух вирусов различаются на 4 порядка по инфекционности?
2. В автореферате диссертации на рисунке 4 графически представлены результаты МТТ-теста. Какой дозе соответствуют представленные данные, учитывая, что при выполнении теста были использованы три дозы вирусов (2, 8 и 16 ГАЕ), а на рисунке каждому из штаммов ВБН соответствует один показатель?
3. При оценке цитотоксичности штаммов ВБН, в качестве контроля специфического действия ВБН на опухолевые клетки, исследовали жизнеспособность нормальных клеток человека при культивировании их в среде с вирусом (метод МТТ). Для этого использовали мононуклеарные клетки периферической крови доноров, содержащие, как правило, пул как моноцитов, так и лимфоцитов. Чем автор обосновывает выбор именно этих клеток в качестве контрольных, учитывая, что ВБН не является лимфотропным вирусом? Не правильнее ли было бы использовать в качестве контроля клетки фибробластов человека?
4. В качестве дискуссионных, возникают вопросы о трактовке механизмов противоопухолевой активности ВБН. На основании полученных данных и использованного дизайна эксперимента нельзя исключить неспецифическую активацию вирусом местных иммунных реакций, тормозящих рост опухоли. Должен ли для такого эффекта вирус быть живым? Использовался ли контроль с инактивированным вирусом? Возможно, решение этих вопросов могло бы являться предметом дальнейших исследований по теме диссертации.
5. Обладающие научной новизной данные по полногеномному секвенированию четырех штаммов ВБН, к сожалению, не отражены ни в задачах, ни в выводах диссертационного исследования.
6. Требуется более четкого определения используемые автором показатели «объёмная плотность некрозов» и «численная плотность сосудов». Каким образом определяются эти параметры, должно было быть указано в главе «Материалы и методы».
7. В разделе диссертации 3.10.4. «Оценка патоморфологических особенностей опухолевой ткани после курса виротерапии», сказано, что «Макроскопический препарат опухоли солидного узла карциномы Кребс-2 представляет собой бело-розовый узел из слабо

дифференцированных крупных округлых или овальных клеток», что не корректно, поскольку макроскопически нельзя сделать вывод о размере клеток, а тем более, о степени их дифференцировки.

Указанные вопросы и замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

Заключение

Диссертация ЮРЧЕНКО Ксении Сергеевны, выполненная на тему: «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, представляет собой самостоятельно выполненную и законченную научно-квалификационную работу. По актуальности, объему проведенных исследований, методическому уровню, научной ценности и практической значимости работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями от 21 апреля 2016 года №335), утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации. Автор представленной диссертационной работы Юрченко К.С. достойна присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Отзыв обсужден и одобрен на совместном заседании отдела вирусологии и проблемной комиссии по вирусологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, протокол № 014 от 9.09.2019 года.

Зав. лабораторией экспериментальной вирусологии
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера,
д.м.н. И.Н. Лаврентьева



(197101, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д.14
Тел 8(812)2329411; e-mail: pasteur.lawr@mail.ru)

Подпись И.Н. Лаврентьевой заверяю.

Ученый секретарь ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»
Роспотребнадзора
К.м.н. Трифонова Г.Ф.



(197101, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д.14
Тел 8(812)2331762; e-mail: trifonovagt@pasteurorg.ru)