ОТЗЫВ

Рихтера Владимира Александровича

на диссертацию **Назаренко Алины Сергеевны**
«Онколитический потенциал некоторых арбовирусов на моделях опухолей поджелудочной железы и глиобластомы»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 Вирусология

Актуальность темы диссертации

Рак поджелудочной железы и глиобластома относятся к наиболее трудно поддающимся терапии злокачественным новообразованиям с крайне негативным прогнозом выживаемости. Существенную роль в плохом прогнозе выживаемости пациентов с раком поджелудочной железы и глиобластомой играют особенности иммуносупрессивного опухолевого микроокружения, труднодоступность опухолей для хирургического удаления и резистентность к лекарственной терапии.

До настоящего времени практически нет эффективных препаратов и методов для лечения этих заболеваний. В разработке находится целый ряд подходов, но явного успеха пока, к сожалению, не достигнуто.

Терапия поджелудочной железы и глиобластомы с использованием онколитических вирусов считается одним из наиболее перспективных методов лечения. Обоснованность данного терапевтического подхода подтверждена регистрацией в Японии препарата Teserpaturev (G47Δ) на основе онколитического штамма вируса простого герпеса 1 типа, одобренного для лечения глиобластомы, а также тем фактом, что в настоящее время проходит целый ряд клинических исследований препаратов на основе различных онколитических вирусов - вируса осповакцины, аденовируса, вируса простого герпеса и других вирусов. Хочется надеяться, что дальнейшие разработки в этой области могут привести к созданию новых высокоэффективных лекарственных средств для лечения этих тяжелых заболеваний. Изучение онколитических свойств флавивирусов имеет и самостоятельную практическую ценность, связанную с особенностями данного семейства. Использование его представителей в онколитической терапии является весьма нетривиальным подходом: вследствие высокой патогенности вирусы этой группы крайне редко рассматриваются в мировой практике в качестве терапевтических агентов. Вместе с тем вакцинный штамм 17D вируса жёлтой лихорадки (ВЖЛ) занимает особое положение: его безопасность подтверждена многолетней историей применения в вакцинопрофилактике, что позволяет рассматривать штамм 17D ВЖЛ в качестве перспективного онколитического агента.

В этом ряду разработок представленная работа может рассматриваться как один из многообещающих подходов. Попытка разработать противоопухолевый препарат на основе арбовирусов является благородной и

перспективной задачей. Таким образом, актуальность работы не вызывает сомнений.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 190 страницах и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки, список сокращений и условных обозначений, список цитируемой литературы. Работа содержит 67 рисунков, 4 таблицы и 1 приложение. Список литературы содержит 214 источников.

Во введении диссертации сформулирована научная проблема, обоснована её актуальность, определены цель и задачи исследования. Здесь же последовательно раскрыты научная новизна и практическая значимость выполненной работы, приведены основные положения, выносимые на защиту. Автором обоснована достоверность полученных результатов, описана их апробация, а также охарактеризованы структура и объём диссертации.

Первая глава содержит обзор литературы, посвященный репродукции и онколитическим свойствам представителей семейств *Flaviviridae*, *Rhabdoviridae* и *Picornaviridae*, которые рассматриваются в данной работе в качестве объектов исследования. Рассмотрены особенности вирусного жизненного цикла, результаты исследований отдельных онколитических вирусов и факторы, способные влиять на восприимчивость опухолевых клеток.

В разделе об описании онколитических свойств вируса везикулярного стоматита (ВВС) обсуждаются варианты его применения в качестве онколитического агента, механизмы резистентности опухолей к вирусному онколизу и подходы к усилению противоопухолевой терапии. Этот раздел непосредственно связан с заключительным направлением собственной работы Алины Сергеевны. Отдельное рассмотрение протоковой аденокарциномы поджелудочной железы и глиобластомы помогает обосновать выбор опухолевых моделей.

Обзор охватывает несколько взаимосвязанных направлений вирусологии и экспериментальной онкологии. Вместе с тем полнота освещения отдельных вирусов и обновление литературной базы требуют внимания; соответствующие вопросы приведены в разделе замечаний. Эти частные недостатки не препятствуют пониманию необходимости проведения собственных исследований.

Во второй главе представлены использованные материалы и методы. Охарактеризованы исследуемые клеточные культуры, вирусы, лабораторные животные, способы культивирования клеток и вирусов, титрования вирусов, оценки противоопухолевого действия, получения вирусных комплексов и методы работы с животными. Важным достоинством методической части является сочетание нескольких подходов к оценке жизнеспособности клеток.

Третья глава объединяет результаты собственных исследований и их обсуждение. Ее построение последовательно раскрывает четыре основных

направления: скрининг онколитической активности ВЖЛ (штамм 17D) и ВКЭ (штамм Софьин) в сравнении с ВВС (штамм Индиана) и полиовирусом 1 типа (штамм Сэбина), углубленное изучение действия ВЖЛ на клеточные линии опухолей поджелудочной железы, оценку его действия на сингенной модели Pan02 и исследование сочетания ВВС с фотодинамической терапией.

При проведении скрининга противоопухолевой активности ВЖЛ и ВКЭ автором было установлено, что клеточные линии глиобластомы человека T98G, LN-229 и GL6 устойчивы к выраженному онколитическому действию исследуемых вирусов. Этот отрицательный результат имеет самостоятельную ценность. Он ограничивает экстраполяцию выводов о противоопухолевом потенциале флавивирусов на весь спектр опухолевых нозологий и определяет выбор другого вируса для дальнейшей разработки комбинированной терапии глиобластомы. Онколитическая активность ВЖЛ показана на клеточных линиях нейробластомы, астроцитомы, опухолей молочной железы, толстой кишки, легкого и поджелудочной железы. Для вируса клещевого энцефалита выявлена способность к репродукции в исследуемых опухолевых культурах при отсутствии либо ограниченной выраженности цитопатического действия в большинстве из них.

Раздел, посвященный исследованию онколитической активности ВЖЛ в отношении рака поджелудочной железы, показывает различия в чувствительности между культурами MIAPaCa-2, PANC-1 и Capan-2. Автор обсуждает возможную связь восприимчивости клеток с особенностями интерферонового ответа, что формирует обоснованное направление последующего исследования, хотя само по себе сопоставление чувствительности культур еще не устанавливает причинный механизм. Опыты на трехмерных сфероидах MIAPaCa-2 показывают, что действие вируса сопровождается изменением структуры тумароида. Полученный результат дополняет данные об оценке онколитического действия на монослойных культурах. Также в данном разделе отмечено, что несмотря на отсутствие прямого литического действие на мышиную клеточную линию Pan02, вирус способен к репродукции в ней. Это важно для обоснования последующего проведения испытаний на животных.

В следующем разделе представлены исследования штамма 17D ВЖЛ на сингенной модели Pan02. Показано замедление опухолевого роста при действии вируса, причем наиболее выраженный эффект от онковиротерапии отмечен при предварительной иммунизации животных. Данные о динамике роста опухоли рассмотрены вместе с результатами гистологического исследования. Наблюдаемые эффекты позволяют автору предполагать участие иммунных механизмов, что требует дополнительных исследований в последующем. Исследование многократной терапии ВЖЛ выявило наличие токсических эффектов и снижение медианы выживаемости. Представление такого результата повышает научную ценность раздела: Алина Сергеевна не ограничивается описанием благоприятных эффектов и предлагает оптимизацию интервалов введения в последующих экспериментах.

Заключительный раздел диссертации посвящен изучению противоопухолевых эффектов сочетания вируса везикулярного стоматита с фотосенсибилизатором протопорфирином IX на клеточных линиях глиобластомы человека. Для облегчения доставки фотосенсибилизатора был получен комплекс ВВС с протопорфирином IX, который продемонстрировал скромный онколитический эффект. Алина Сергеевна объясняет ограниченную эффективность исследованного комплекса неблагоприятным влиянием фотосенсибилизатора на вирусную репродукцию. В связи с этим фактом было изучено последовательное применение фотодинамического воздействия и вируса. Результатом стало усиление цитотоксического эффекта. Также проведена оценка комбинированной терапии на трехмерных культурах глиобластомы. Таким образом, данный раздел обосновывает дальнейшую разработку комбинированного подхода.

Заключение обобщает результаты четырех направлений исследования. Шесть выводов соотносятся с поставленными задачами, а практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы логично следуют из полученных данных.

Научная новизна результатов диссертационной работы

В представленной работе впервые были подробно изучены цитотоксические эффекты арбовирусов (ВЖЛ, ВКЭ и ВВС) на онкотрансформированные клетки человека и животных с целью создания на их основе противоопухолевых лекарственных препаратов. Установлены различия в восприимчивости клеток к вирусному онколизу ВЖЛ и ВКЭ, способностью вирусов к репродукции в исследуемых культурах и выраженностью цитопатического действия. Показано, что наиболее перспективным в этом качестве можно рассматривать вирус желтой лихорадки. Используя этот вирус, можно предпринимать попытки разработать эффективные лекарственные средства для терапии рака поджелудочной железы и глиобластомы. Установлено, что вирус способен эффективно реплицироваться в клетках PDAC и вызывать их гибель. Важным результатом стало выявление устойчивости клеточных линий глиобластомы (T98G, LN-229, GL6) к ВЖЛ, что четко очерчивает границы его терапевтического применения.

В отношении ВКЭ выявлена способность к активной репродукции в опухолевых клетках без выраженного цитостатического действия. Это делает его малопригодным для использования в качестве онколитического агента.

В работе предложено совместное использование ВВС в комбинации с протопорфирином IX при проведении фотодинамической терапии. Показано, что одновременное введение фотосенсибилизатора и вируса неэффективно из-за инактивации вирионов. Необходимо разносить во времени введение этих двух препаратов.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость работы заключается в изучении механизмов подавления жизнеспособности инфицированных клеток. Подробно изучено участие метаболических процессов раковых клеток в ответ на действие онколитических вирусов.

В работе даны практические рекомендации для разработки противоопухолевых препаратов на основе ВЖЛ (штамм 17D). Обоснован подход для комбинированного применения онколитических вирусов с фотодинамической терапией.

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

Достоверность результатов обеспечивается применением современных молекулярно-биологических, клеточных и вирусологических методов. Во всех экспериментах используются контрольные опыты. Применены адекватные статистические обработки результатов исследования.

Полученные результаты опубликованы в 4 рецензируемых журналах, индексируемых в Web of Science, Scopus и РИНЦ, охватывающие ключевые направления исследования, что подтверждает степень проработанности материала. Основные результаты также представлены на российских и международных научных конференциях.

Соответствие автореферата основному содержанию диссертации

В автореферате представлены общая характеристика работы, основное содержание работы и список работ, опубликованных по теме диссертации. Основное содержание работы содержит сравнительный скрининг исследуемых вирусов, изучение штамма 17D ВЖЛ на моделях рака поджелудочной железы и раздел, касающийся комбинированной терапии глиобластомы. Основные выводы согласуются с содержанием диссертации.

Ознакомление с авторефератом позволяет составить целостное представление об объёме выполненного исследования, применённых экспериментальных моделях и научном вкладе автора в изучаемую проблему. Содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации.

Оценка диссертационного исследования

В целом работа представляет собой законченное научное исследование, грамотно и качественно проведенное, и оставляет благоприятное впечатление.

Замечания по диссертации

Несмотря на общую высокую оценку работы можно сделать ряд замечаний:

1. Некоторое недоумение вызывает давность представленных в литературном обзоре работ. По теме, близкой к данному исследованию,

ежегодно публикуется несколько десятков работ. Однако, в списке цитируемых работ почти не представлены статьи последних лет.

2. В обзоре литературы (стр. 18) говорится о попытке разработки лекарственного препарата на основе вируса синего языка. Дана ссылка на работу 2011 года. Интересно было бы узнать дальнейшую судьбу этого исследования.

3. Значительная часть исследования посвящена вирусу клещевого энцефалита. В обзоре литературы автор совсем не рассказывает о нём при подробном описании других, не использованных в работе вирусах.

4. В разделе 3.1.1.1. (стр. 78) утверждается, что ни ВЖЛ, ни ВКЭ не проявляют выраженного цитотоксического действия в отношении глиобластомы человека, но эффективно подавляют развитие мышиной глиобластомы. Было бы полезно объяснить этот факт.

5. В разделе 3.1.1.1. (стр. 81 - 82) утверждается, что ВКЭ, при отсутствии цитотоксического эффекта, тем не менее продуцируется в поражённых клетках. Этот факт подтверждается наличием РНК ВКЭ в культуральной жидкости при достаточно высокой концентрации. Возникает вопрос: что происходит с заражёнными клетками, если вирус из них высвобождается в культуральную жидкость? Неужели они при этом сохраняют жизнеспособность?

6. На рисунках 46 и 48 на временных графиках было бы полезно на оси абсцисс обозначить дни введения очередной дозы вируса.

7. В разделе 3.3.3. говорится, что при многократном введении вируса с интервалом в 7 дней, после третьего введения наблюдаются значительные побочные эффекты, ограничивающие дальнейшее применение вируса. Не пытались ли исследователи увеличить интервал введения препарат? Если нет, то почему?

Тем не менее, все высказанные вопросы и замечания носят дискуссионный характер и нисколько не умаляют важность и научную ценность представленной работы.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней

Учитывая актуальность, объем проведенных исследований, научную новизну и практическую значимость, диссертационная работа «Онколитический потенциал некоторых арбовирусов на моделях опухолей поджелудочной железы и глиобластомы» отвечает требованиям пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения учёных степеней», утверждённым Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в ред. Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023 г. № 101, от 18.03.2023 г. № 415, от 26.10.2023 г. № 1786, от 25.01.2024 г. № 62, от 16.10.2024 г. № 1382, от 18.07.2026 г. № 905), предъявляемым к

диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор, Назаренко Алина Сергеевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 Вирусология.

Согласен на сбор, обработку, хранение и размещение в сети «Интернет» моих персональных данных (в соответствии с требованиями Приказа Минобрнауки России №1 от 09.01.2020 г. (ред. от 01.03.2024 г.), необходимых для работы диссертационного совета 24.1.255.01.

д.б.н., заведующий лабораторией биотехнологии, г.н.с., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре Сибирского отделения Российской академии наук Дата: 06.11.2026		Рихтер В.А. *(подпись)*

Сведения:

Рихтер Владимир Александрович

Докторская диссертация защищена по специальности
1.5.3 «Молекулярная биология»
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
им. Д.Г. Кнорре Сибирского отделения Российской академии наук
Адрес организации: 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д. 8
Телефон: +7-913-986-35-52
e-mail: richter@1bio.ru

Подпись Рихтера В.А. заверяю

Ученый секретарь Института химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре СО РАН, к.б.н. Е.Б. Логашенко