

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию **Осипова Ивана Дмитриевича**
«ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТЕЛОМЕРАЗА-СПЕЦИФИЧНОГО
АДЕНОВИРУСА СЕРОТИПА 6,
УСИЛЕННОГО ГЕНОМ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ГМ-КСФ»,
представленную
на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Актуальность исследования. Онколитическая виротерапия - это перспективная и активно развивающаяся технология борьбы с онкологическими заболеваниями, в которой генетически модифицированные репликативно-компетентные вирусы используются для инфекции и лизиса опухолевых клеток. Диссертационная работа Ивана Дмитриевича Осипова направлена на расширение молекулярного инструментария онколитической виротерапии. Целью работы было создание и функциональная оценка новых онколитических вирусов на основе аденовируса серотипа 6. Актуальность исследования не вызывает сомнений. Семейство вирусов Adenoviridae обладает целым рядом достоинств в качестве агентов онколитической виротерапии. Относительно меньшая популяционная распространенность Ad6 позволяет предполагать, что этот серотип может иметь преимущества по отношению к традиционно используемому серотипу Ad5 в силу уменьшения негативного эффекта противоаденовирусного иммунитета.

Структура и оформление диссертации. Работа написана по классической схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка цитированной литературы (всего 241 литературных источников). Работа изложена на 153 страницах, содержит 30 рисунков, 4 таблицы, а также 17 приложений с нуклеотидными последовательностями полученных генетических конструкций. Во «Введении» кратко охарактеризована актуальность темы исследования, обозначены проблемы и сформулированы цели и задачи. «Обзор литературы» объясняет понятие онколитической виротерапии и суммирует сведения о биологии аденовирусов и их использовании в качестве противоопухолевых векторов. Значительное

внимание уделяется описанию особенностей серотипа Ad6. В заключении обзора автор представляет свое видение нерешенных проблем и направления дальнейших исследований. В целом, представленный в обзоре материал хорошо отражает современное состояние проблемы. Для решения поставленных задач автор использовал широкий спектр современных экспериментальных методов. Их подробное описание представлено в главе «Материалы и методы». Глава убедительно демонстрирует высокий методический уровень работы. В разделе «Результаты и обсуждение» представлены экспериментальные данные, которые логично скомпонованы и интерпретированы. Иллюстрации убедительны. Глава «Заключение» представляет собой обобщение полученных данных, их новизны и перспектив практического применения. Закрывающие диссертацию «Выводы» соответствуют поставленным задачам. Автореферат соответствует диссертации. Таким образом, оформление диссертации можно назвать безупречным.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость.

Хотя другие авторы уже использовали аденовирус серотипа 6 в качестве агента онколитической терапии, достоинства и недостатки этого серотипа изучены пока недостаточно. Работа И.Д.Осипова вносит новый существенный вклад в имеющиеся представления об эффективности Ad6. Прежде всего, автор и его коллеги показали в экспериментах *in vitro* и *in vivo* на клетках глиобластомы, что природный серотип аденовируса 6 не уступает широко используемому аденовирусу серотипа 5 по своим онколитическим и цитотоксическим свойствам. Ключевым элементом работы стало создание рекомбинантного аденовируса серотипа 6 с повышенной онкоспецифичностью и способностью секретировать иммуномодулирующие агенты. Автор осуществил впечатляющую по сложности серию генно-инженерных операций, результатом которых стало получение аденовируса Ad6 с двумя модификациями генома: промотор гена EA1 был заменен на промотор гена теломеразы человека, а область E3 включала ген гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (ГМ-КСФ). Первая из этих модификаций должна способствовать преимущественному размножению вируса в клетках, экспрессирующих теломеразу человека (повышенный уровень которой характерен для широкого круга опухолевых клеток), вторая — секрецию ГМ-КСФ для усиления активности рекомбинантного вирусного препарата. Важно отметить, что в результате этой работы автор

впервые показал возможность создания рекомбинантного аденовируса с использованием исключительно методов рекомбинации *in vitro*.

Далее было показано, что введенные модификации не отразились негативным образом на репликативной активности и экспрессии отдельных генов вируса Ad6-hT-GM в сравнении с его природным предшественником Ad6 и, кроме того, что заражение клеток вирусом Ad6-hT-GM обеспечивало продукцию функционального ГМ-КСФ. В экспериментах на нескольких трансформированных клеточных линиях автор обнаружил, что цитотоксическая активность Ad6-hT-GM не уступает активности аденовирусов дикого типа Ad5 и Ad6. При этом Ad6-hT-GM обладает сниженной цитотоксичностью в отношении здоровых клеток.

В финальной части работы была проведена оценка противоопухолевого эффекта Ad6-hT-GM на модели иммунодефицитных мышей линии SCID с имплантацией опухолевых клеток человека. Результаты позволяют сделать вывод о том, что Ad6-hT-GM проявляет достоверный противоопухолевый эффект и увеличивает выживаемость мышей опытных групп по сравнению с контрольными.

Совокупность полученных в диссертационной работе И.Д.Осипова свидетельствуют о том, что созданный рекомбинантный аденовирус серотипа Ad6 является перспективной платформой для разработки противоопухолевых средств. Основные результаты представленных в диссертации исследований И.Д.Осипова опубликованы в международных журналах Q2-Q1. Практическая значимость полученных результатов подтверждается патентом на изобретение.

Замечания. Несмотря на общее очень благоприятное впечатление от диссертационной работы И.Д. Осипова, в порядке дискуссии хотелось бы высказать одно замечание. Вывод о повышенной онкоспецифичности Ad6-hT-GM по сравнению с природным Ad6 основан на очень ограниченном количестве клеточных линий. Кроме того, для большей уверенности в оценке эффекта введенного в рекомбинантный аденовирус промотора теломеразы хотелось бы видеть определение уровня экспрессии теломеразы в исследуемых линиях. Ссылки на данные других авторов в этом случае представляются недостаточными.

