

ОБЗОР ОТЗЫВОВ,

поступивших на диссертацию и автореферат диссертации Ряполовой Анастасии Владимировны,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по научной специальности 1.5.3. Молекулярная биология,

тема: Изучение противоопухолевых свойств рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, экспрессирующего комбинацию иммуностимулирующих факторов

Фамилия И.О., организация	Вопросы/Замечания	Ответы/Комментарии
1	2	3
От Рихтера В.А., доктора биологических наук, заведующего лабораторией биотехнологий, г.н.с., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск	Вызывает вопрос выбор онкотрансформированных клеточных линий для изучения цитотоксического действия и противоопухолевой эффективности полученного вируса. В тексте работы нет объяснения, почему были выбраны именно эти клеточные линии. Можно было бы расширить список культур, по крайней мере, для первичного скрининга.	С замечанием согласна, использование большего набора клеточных линий обогатило бы работу. Основной причиной ограниченности был фактический доступ к раковым линиям мыши, имеющимся на момент проведения экспериментов в распоряжении сотрудников направления «Генная терапия» Университета «Сириус».
	Все <i>in vitro</i> результаты получены на 2D-культурах, однако в последнее время использование 3D-культур позволяет получить наиболее точные результаты, иногда диаметрально противоположные. Дополнительно сочетание подходов сокультивирования и 3D-культур позволяет провести более быстрый скрининг эффективности онколитических вирусов на раковых моделях различной этиологии. Известно, что в университет "Сириус" успешно развивается направление по получению 3D-культур. Было бы	С замечанием согласна, давно известно, что опухоль формируют не только опухолевые клетки, но стромальные и эндотелиальные клетки. Их динамическое взаимодействие вызывает изменения в фенотипах клеток, ангиогенезе, ингибирует апоптоз раковых клеток и приводит к прогрессированию рака. Использование 2D-культивирования – наиболее распространенный подход <i>in vitro</i> экспериментов, позволяющий получить быстрые и воспроизводимые результаты, однако сложные взаимосвязи, характерные для контекста <i>in vivo</i> и реальных

	целесообразно использовать этот потенциал для дальнейшего развития работы.	клинических случаев, не учитываются при таком подходе. Использование технологии 3D-культивирования совместно с сокультивированием с другими клетками, формирующими опухоль, значимо усиливает релевантность получаемых результатов реальной клинической картине.
	Исследование ограничено использованием только сингенных моделей на мышах. Оценка эффективности на более крупных животных или на ортотопических моделях, более приближенных к клинической ситуации, бы в большей мере исследовать трансляцию результатов применения rVSV от мыши к человеку.	С замечанием согласна. Выражаем надежду, что окончание строительства ресурсного центра in vivo исследований лабораторного комплекса университета «Сириус» позволит проведение экспериментов на более сложных ортотопических моделях. Использование же более крупных животных на текущей стадии разработки препаратов rVSV выглядит нерелевантным.
	Часть иллюстративного материала в тексте и приложениях требует более подробных подписей или пояснений к используемым обозначениям, что повысило бы ясность представления результатов для читателя.	С замечанием согласна.
	В тексте встречаются опечатки и стилистические погрешности («ноозоологий», «осуществляется», «опухолевого узла», «клеток линии»), однако они не влияют на понимание содержания.	С замечанием согласна.
От Замятнина А.А., доктора биологических наук, профессора, исполняющего обязанности декана факультета биоинженерии и биоинформатики, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего	В работе изменения содержания иммунных клеток в опухолевом узле оценены методом проточной цитометрии, однако полученные данные не были дополнительно подтверждены другими методами,	С замечанием согласна, использование ортогональных методов подтверждения наблюдаемых изменений важны. Однако применение метода проточной цитометрии для фенотипирования иммунных клеток опухолевого микроокружения отличается

<p>образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», г. Москва</p>	<p>позволяющими изучить состав опухолевого микроокружения.</p>	<p>высокой производительностью и чувствительностью по сравнению с иммуногистохимией. Использование методов высокопроизводительного ДНК/РНК-секвенирования совместно с результатами, полученными методом проточной цитометрии, могли бы углубить знания об ответе раковой клетки на заражение вирусом.</p>
	<p>Несмотря на высокий уровень работы, используемые линии животных в работе были разными, что может влиять на наблюдаемые эффекты. Так же используемые клеточные линии отличаются и по характеристикам формируемых ими опухолей (B16-F10 – «холодные» опухоли, а CT26.WT – «горячие»). Можно ли провести прямое сравнение результатов проведенных экспериментов?</p>	<p>С замечанием согласна. Действительно прямое сравнение полученных результатов невозможно. На данный момент рассматривается возможность проведения повторного эксперимента на B16-F10-модели по схеме, описанной при работе с клетками CT26.WT. К сожалению, как использование только одной линии животных, так и «выравнивание температуры» опухолей невозможны ввиду происхождения опухолевых клеток.</p>
	<p>Большое место в диссертации уделяется потенциальному изменению опухолевого микроокружения посредством rVSV-mIL12-mGMCSF, однако в части <i>in vitro</i> исследований нет места экспериментам по сокультивированию раковых клеток, зараженных вирусом, и иммунных клеток, например, макрофагов. Такой эксперимент потенциально мог бы обогатить работу и усилить ее демонстрируемые выводы.</p>	<p>С замечанием согласна.</p>
	<p>В работе разные методы молекулярной и клеточной биологии, однако нет никакой информации о применении методов</p>	<p>С замечанием согласна. На данный момент ведется совместная работа с сотрудниками направления «Вычислительная биология»</p>

	математической биологии. Планируется ли их внедрение в следующие исследования с участием VSV?	университета «Сириус» по внедрению методов математического моделирования при разработке rVSV-терапии.
От Буздина А.А., доктора биологических наук, профессора РАН, руководителя исследовательской группы, Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус»	Не проведено <i>in vivo</i> исследование влияния человеческих вариантов цитокинов в геноме VSV на терапевтическую эффективность онколитического вируса.	С замечанием согласна. На данный момент rVSV, экспрессирующего человеческие варианты цитокинов, нет, потому такое исследование не было проведено.
	В работе большое внимание уделяется нарушению интерферонового ответа в раковых клетках, однако на панели используемых линий не проводится анализ секреции как интерферонов 1 типа, так и интерферонов 2 типа, при этом наблюдается практически полная невосприимчивость к заражению VSV у клеток линии SCC VII.	С замечанием согласна. Действительно измеренного уровня экспрессии интерферонов до и после проникновения вируса – важное замечание для последующих работ.
От Демидова О.Н., доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург	Несмотря на высокий уровень и научную новизну работы, в диссертации недостаточно подробно описаны свойства раковых клеток, их взаимодействие друг с другом и т.д., место, уделенное разделу «1.1. Биология опухолей», должно было быть значительно больше.	С замечанием согласна.
	В диссертации исследуется экспрессия гена p53, однако известно, что его функциональная активность регулируется на посттрансляционном уровне, поэтому анализ активности белка p53 в ответ на заражение вирусом мог бы значительно усилить работу.	С замечанием согласна. Экспрессия p53 не может на прямую быть соотнесена с функциональной активностью белка p53. Значительная часть эффектов, связанных с клеточной гибелью и вызываемых p53, складывается из активностей регулируемых им генов. При этом активация белка запускается рядом посттрансляционных модификаций, в которых принимают участие различные белки (Mdm2, ARF, киназы ATM

и ATR, т.д.). Чтобы сделать вывод о клеточной гибели по пути апоптоза в ответ на заражение VSV, конечно, нужно исходить из экспрессии белка, а если это невозможно по ряду причин (временные, экономические, технические и т.д.), то только использование данных о дополнительных участниках каскада может позволить сделать косвенное заключение об апоптозе. Конкретно в нашей работе была изучена экспрессия гена *SMAC*, основная функция которого – это связывание с IAP в цитозоле для их нейтрализации и активации каспаз, и гена *GSDME*, белковый продукт которого участвует в превращении невоспалительного апоптоза в пироптоз (Приложение А диссертации), однако различия в уровнях экспрессии не были статистически значимыми, потому это не позволило «усилить» результаты.

Однако есть работы, которые используют данные об экспрессии гена *p53* как прогностический маркер у больных раком и стратифицирующий фактор (10.1038/s41598-025-23713-5, 10.3390/cancers12102834), что несколько обнадеживает исследователей, ограниченных некоторой методологией.

Также мы исследовали экспрессию генов ряда цитокинов (*IFNs*, *IL-1*, др.), что напрямую не коррелирует с активностью этих белков, но может свидетельствовать о транскрипционной регуляции в ответ на заражение клетки вирусом.

		<p>Важно отметить, что проводимый кПЦР-анализ не преследовал цели выявить противовирусный ответ клетки и механизм ее гибели, но таким относительно простым и доступным способом мы надеялись выявить различия в чувствительности клеточных линий. При этом, несмотря на отсутствие информации об уровнях экспрессии белка, данные об уровне экспрессии мРНК, его кодирующей, показывают, как минимум, готовность клетки производить белок – попытка запуска, даже если он дефективный и тормозящий, сигнального пути (в данном случае, направленного на борьбу с вирусом).</p>
	<p>В работе проводится исследование экспрессии генов IFN, однако противовирусный эффект IFN основан на эффектах белковых молекул, соответственно, необходимо использование методов ИФА или вестерн-блоттинга для получения достоверных данных об изменении противовирусного статуса клетки в ответ на заражение rVSV.</p>	<p>С замечанием согласна.</p>
	<p>Для иммунофенотипирования использовался метод проточной цитометрии, который показал отсутствие статистически значимых различий в инфильтрации иммунными клетками между экспериментальными группами. Могут ли быть наблюдаемые эффекты связаны с пробоподготовкой? Почему не использовался ИГХ-анализ?</p>	<p>С низкой вероятностью отсутствие статистически значимых различий между терапией VSV и плацебо в основных популяциях иммунных клеток может быть связано с пробоподготовкой опухолевых клеток к иммунофенотипированию. Эксперимент был спланирован «волнами», чтобы не допустить «перестаивания» клеточной суспензии после выделения. По всей видимости, наблюдаемая</p>

		<p>терапевтическая эффективность была связана с прямым онколизом, а не с иммунной стимуляцией. С другой стороны, важно учитывать активацию клеток, которая не была изучена в этом исследовании. ИГХ анализ действительно позволил бы изучить реальную представленность иммунных или иных клеток в конкретном месте опухоли. Однако производительность метода проточной цитометрии сильно выше, чем у любого другого гистологического метода (как стандартная пробоподготовка, так и анализ полей зрения и «углубления» в саму опухоль по ходу подготовки гистологического препарата).</p>
<p>От Зубковой О.В., кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории иммунобиотехнологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, г. Москва</p>	<p>Несмотря на высокий уровень и научную новизну работы, в диссертации недостаточно подробно описана методика конструирования генома рекомбинантного ВСВ. Последовательности праймеров на гены иммуностимулирующих факторов указаны только в таблице в главе Материалы и методы и нет подробного описания метода клонирования этих генов в геном ВСВ, так как правильная сборка генома рекомбинантного вируса является ключевым этапом работы. При этом в таблице 2.1 в качестве используемого вектора указана плазида pVSV-dM51-mIL12-mGMCSF. Складывается впечатление, что геном вируса был сконструирован не автором лично. Отсутствуют данные о подлинности полученного рекомбинантного вируса</p>	<p>С замечанием согласна. Действительно дизайн генома вируса был разработан ранее Карабельским А.В., Ивановым Р.А., Улитиным А.Б. и Нагорных М.О. (патент на изобретение RU2817896C1), в последующем мной лично осуществлялась сборка упомянутой конструкции и последующее получение вируса согласно индивидуальному плану развития аспиранта Университета «Сириус». Отсутствие всеобъемлющего описания процедуры получения и верификации изменений в геноме вируса являются значимым недостатком диссертации.</p>

	<p>везикулярного стоматита. Нет данных о сохранении мутации в М белке в результате оживления и пассирования вируса в клетках ВНК-21. Также отсутствуют данные, подтверждающие наличие целевой последовательности (комбинации иммуностимулирующих факторов) в геноме вируса.</p>	
	<p>В классических вирусологических методах по трансдукции принято заражать клетки вирусом в дозе, например, от 0,1 до 10 инфекционных вирусных частиц на клетку – MOI (Multiplicity of Infection). Используемая доза вирусное препарата 1×10^6 TCID50 на 150 000 клеток, то есть 6,67 инфекционных вирусных частиц на клетку является достаточно высокой, при которой трудно оценить разницу между цитопатическим действием вируса и цитотоксичностью.</p>	<p>С замечанием согласна. Использование дозы вируса, выраженной в TCID50, было обосновано последующим переходом к <i>in vivo</i> исследованиям. Такое решение также объясняется опорой на все клинические исследования с участием VSV в качестве онколитического вируса, где доза определяется либо через TCID50, либо через PFU.</p>
	<p>Репликативная активность ВСВ с мутацией в М-белке и без (параграф 3.1.) не оценивается по количеству GFP-позитивных клеток. Это анализ трансдуцирующей активности. Для оценки репликации необходимо было определять количество инфекционных вирусных частиц в культуральной среде через 24 и 48 часов после заражения клеток.</p>	<p>С замечанием согласна, точнее было бы указать, что опора на GFP-позитивные клетки определяет репликативную активность вируса не прямо, а опосредовано.</p>
	<p>Использование термина «вирусный онколиз» не совсем корректно в отношении экспериментов на мышинных клетках меланомы В16-F10 и легочной карциномы Льюиса LL/2, тем более на основании оценки областей зеленой флуоресценции. Этот</p>	<p>С замечанием согласна.</p>

	<p>термин используется для описания процесса происходящего в организме или метода лечения новообразований с помощью вирусов.</p>	
	<p>В экспериментах по оценки изменения уровня экспрессии генов под воздействием rVSV-GFP в линиях раковых клеток B16-F10 и LL/2 не хватает сравнения со здоровыми клетками. А если в нормальных клетках тоже происходит повышение транскриптов мРНК генов, можно ли делать вывод о чувствительности раковых клеток к ВСВ?</p>	<p>С замечанием согласна. Будущие исследования будут дополнены анализом экспрессии генов здоровых клеток (с нормальным интерфероновым сигнальным каскадом) в ответ на заражение rVSV.</p>
	<p>Анализ выживаемости животных с СТ26.WT-индуцированной опухолью показал лучший эффект в группе животных, получивших rVSV-GFP (около 15% выжили). Вы указали, что в повторном эксперименте нет полной сходимости полученных результатов. При этом рекомбинантный вирус rVSV-mIL12-mGMCSF не имеет преимущества по сравнению с контрольным. Как вы это объясните?</p>	<p>Количество животных, перешедших в ремиссию, из группы rVSV-mIL12-mGMCSF в первом эксперименте с использованием клеток СТ26.WT составило 37,5%, однако во втором эксперименте эти данные не подтвердились (0 животных в ремиссии). При этом для rVSV-GFP-терапии наблюдалось 12,5% животных в ремиссии в 1м эксперименте и 15% - во 2м, однако статистически значимых различий между кривыми выживаемости групп rVSV как в 1м, так и во 2м экспериментах нет. Строго говоря, сделать вывод о большей успешности терапии rVSV-GFP или rVSV-mIL12-mGMCSF не представляется возможным. Проведение дополнительных экспериментов с большим количеством животных может помочь сделать однозначные выводы о терапевтическом преимуществе или его отсутствии rVSV-mIL12-mGMCSF.</p>

	<p>Как вы объясните отсутствие разницы между rVSV-GFP и rVSV-mIL12-mGMCSF на активацию иммунного ответа?</p>	<p>Есть несколько причин, по которым в исследовании отсутствуют различия в фенотипе иммунных клеток между rVSV-группами:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Точки забора на 11 и 20 дни не «улавливали» происходящие изменения ввиду динамичности состава опухолевого микроокружения; 2. Использование вирусов может преимущественно влиять не на представленность клеток, а на их функциональность, что, к сожалению, не было изучено в этом исследовании; 3. Состав анализируемых популяций клеток требует оптимизации, чтобы выбрать наиболее чувствительные к эффектам действия вируса и иммуностимулирующей вставки; 4. Экспрессия иммуностимулирующей вставки, закодированной в геноме вируса, может происходить на низком уровне, что критично для проявления ее эффекта. 5. Возможно, прямой онколиз в большей мере объясняет эффективность использования онколитического вируса на конкретной модели опухоли.
--	--	--