

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН НИИ эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера

д.м.н., акад. РАН

А.А. Тотолян

« 3 » декабря 2021 г.

М. П.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Волковой Натальи Вячеславовны на тему: «Получение экспериментальных ДНК-вакцин против лихорадки Марбург», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.3 – молекулярная биология и 1.5.10 – вирусология.

Актуальность темы диссертационного исследования и ее связь с планами отраслевой науки

Диссертационная работа Волковой Н.В. посвящена разработке и характеристике ДНК-вакцин против лихорадки Марбург. Вирус Марбург вызывает у людей тяжелое заболевание, сопровождающееся 90% летальностью. В настоящее время как средства профилактики – вакцины, так и средства терапии – специфические препараты против этой инфекции отсутствуют. Кроме того, ввиду исключительной опасности вируса Марбург разработка и тестирование с использованием жизнеспособного вируса требуют соблюдения серьезных мер предосторожности, что значительно ограничивает проведение таких исследований. В этой связи проведенная работа является высоко актуальной и имеет бесспорный приоритет.

В работе проведено конструирование ДНК-конструкций, обеспечивающих при трансфекции клеток экспрессию в них вирусспецифических белков. В результате проведенных исследований показано, что на эти белки вырабатывается иммунный ответ, обеспечивающий протективные свойства ДНК-вакцины в опытах на животных.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций

Актуальность выбранной темы не вызывает сомнений. В работе проведено конструирование набора генноинженерных плазмид, несущих несколько целевых белков вируса Марбург. В экспериментах показано, что эти плазмиды могут быть

использованы в качестве продуцентов материала для вакцинации, поскольку трансфекция ими клеток приводит к формированию вирусоподобных частиц, неспособных к репликации, однако несущих вирусспецифические белки. Эффективность их как антигена далее показана при характеристике клеточного и гуморального иммунного ответа, а также в опытах по протекции животных при инфицировании летальной дозой вируса. Проведённые автором исследования имеют исключительно важное значение в системе фармакологического обеспечения населения и здравоохранения в целом.

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

Основные положения диссертации, выносимые на защиту, отражающие научную новизну и практическую значимость работы, хорошо аргументированы. В первую очередь, несомненную научную новизну и практическую значимость имеет сама стратегия дизайна генноинженерных конструкций, а также ее реализация с получением на выходе прототипов ДНК-вакцин. При этом возможность избежать работ с патогенами 1-2 групп при разработке вакцин против них имеет исключительную практическую пользу.

Весьма важными представляются данные об уровне и характере иммунного ответа на ДНК-вакцины со стороны организма. Комплексный ответ, включающий как клеточный, так и гуморальный компоненты, обеспечивает оптимальную защиту от патогена, что в свою очередь продемонстрировано в опытах на животных.

Практическая значимость полученных результатов несомненна. Полученные в работе результаты можно будет использовать для дальнейшей разработки и внедрения новой платформы для производства вакцин против особо опасных инфекций. Ее внедрение имеет высокую важность с точки зрения замещения импортных противовирусных средств отечественными и развития российской фармакологии в целом. Кроме того, потенциал использования разработанной автором стратегии конструирования ДНК-вакцин выходит далеко за рамки настоящего исследования, поскольку она может быть применена для разработки аналогичных вакцин против любых других вирусов.

Содержание диссертации и её оценка

Диссертационная работа имеет традиционное построение, состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, изложенных в третьей главе, обсуждения полученных результатов и выводов, содержащего обсуждение полученных данных в сравнении с имеющимися известными фактами по данной проблеме, выводов и практических рекомендаций, списка литературы и приложений. Работа изложена на 127 страницах текста компьютерного набора, оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, содержит 4 таблицы и 34

рисунка. Библиографический указатель включает 174 источника, в т.ч. 16 на русском и 158 - на иностранных языках.

Первая глава посвящена обзору данных литературы по основной теме работы на основании анализа научных публикаций за период 1991-2020 годов. Автором проанализированы существующие подходы к разработке вакцин на базе вирусных векторов, вирусоподобных частиц, псевдовирусов и вирусных репликонов. Изложение материала помогает глубже познакомиться с проблемой и потому специальных комментариев не требует.

Во второй главе представлена информация об использованных в работе материалах и методах исследования. Из представленной информации видно, что в работе использован широкий спектр методов молекулярно-биологического, вирусологического и иммунологического исследования. Так, для конструирования ДНК-вакцин использованы такие методы, как ПЦР, рестрикционный анализ, секвенирование ДНК. Для исследования продукции вирусоподобных частиц использован метод электронной микроскопии и иммуноблоттинга. Для оценки биологических свойств полученных образцов вакцин использованы иммунологические методы, такие как иммуноферментный анализ и ELISPOT. Для оценки нейтрализующей и протективной активности ДНК-вакцины использованы стандартные методы вирусологии, такие как нейтрализация вируса *in vitro* и опыты на животных.

В 3 главе – результаты и обсуждение - представлены этапы конструирования ДНК-вакцин с анализом полученных продуктов на каждой из стадий. Получение целевых продуктов продемонстрировано убедительно и однозначно. Далее приведены результаты исследования экспрессии целевых генов и продукции вирусоподобных частиц при трансфекции клеток, анализа гуморального и клеточного иммунного ответа у животных, в том числе нейтрализующих антител. Раздел результатов завершается данными изучения протективной активности ДНК-вакцин в опытах *in vivo* на модели летальной вирусной инфекции у морских свинок. В целом глава последовательно и обоснованно описывает процесс разработки и изучения ДНК-вакцинных конструкций, где каждый следующий раздел логично вытекает из предыдущего.

Выводы и практические рекомендации составлены четко, логично вытекают из материалов диссертации. Автореферат диссертации адекватно отражает её основные положения. Апробацию результатов работы, проведенной за период 2018-2021 гг., следует признать достаточной: по теме диссертации опубликовано три печатные работы в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на 8 профильных научных конференциях и симпозиумах.

Принципиальных замечаний по существу диссертации нет.

Из недочетов работы следует указать следующие. В таблице (стр.15) в графе «Функции белков» зачастую указаны не функции, а свойства. Ряд аббревиатур не расшифрован ни в тексте, ни в списке сокращений («ICS», стр.10, «MF», стр.20. Состав трис-глицин-SDS-буферного раствора (стр.51) не приведен в соответствующем разделе.

С точки зрения оформления следует отметить многочисленные грамматические, стилистические и пунктуационные ошибки. В первую очередь это касается несогласованности чисел и падежей («Полученный ПЦР-продукты идентичны теоретически рассчитанному» (стр.73), «... были рассчитаны две пары праймеры...» (стр.71), «...для получение продукта...» (стр.73) и др.). Ряд терминов неясен и требует более развернутого разъяснения («сила сдвига», стр.31, «выпадение рибосомы», стр.70) или написан с ошибкой («филоменты» вместо «филаменты», стр.83 и 84 «липофектимин» вместо «липофектамин», стр.42). Многократно встречающуюся аббревиатуру «ц/ф» (стр.54-55 и далее) следует в каждом случае писать полностью.

Перечисленные замечания ни в коей мере не умаляют научной и практической ценности проведенного исследования и касаются лишь технической и оформительской его стороны.

К автору работы имеется несколько вопросов.

1. В чём, по мнению автора, состоит научная новизна исследования, сформулированная в п.3, и не является ли указанная комбинация методов лишь технической модификацией исследования?

2. Как определяли концентрацию вирусоподобных частиц в образцах?

3. Какая доза вируса (в БОЕ/мл или TCID₅₀/мл) использовалась при проведении опытов на животных, и как определяли необходимую дозу? Какая инфицирующая доза вируса вызывает 50% гибель животных, и насколько доза, использованная в экспериментах, превосходит ее?

4. Насколько релевантна модель лихорадки Марбург у морских свинок? Проводился ли гистологический анализ органов в ходе исследования или после гибели животных, и если да, то насколько сходными являются патоморфологические признаки инфекции у морских свинок и человека?

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные результаты необходимо использовать при дальнейшей разработке и внедрении ДНК-вакцин в качестве средства профилактики лихорадки Марбург. Эффект от внедрения результатов настоящего исследования будет выражаться в повышении эффективности контроля за этой инфекцией и снижением частоты ее неблагоприятных последствий.


ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Волковой Натальи Вячеславовны на тему «Получение экспериментальных ДНК-вакцин против лихорадки Марбурга» представляет собой самостоятельно выполненную и законченную научно-квалификационную работу, по актуальности, объему проведенных исследований, методическому уровню, научной ценности и практической значимости отвечающую требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Волкова Наталья Вячеславовна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 1.5.3 – молекулярная биология и 1.5.10 – вирусология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Проблемной комиссии по вирусологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», протокол № 5/21 от «26» ноября 2021 года.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории экспериментальной вирусологии
ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. Пастера»

д.б.н.

 В.В. Зарубаев

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

197101, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, дом 14. Телефон +7(812)233-20-92

<https://www.pasteurorg.ru/>

Подпись Зарубаева
Владимира Викторовича
Забережова

Начальник отдела кадров:

 (Чебаков П.К.)
08.12.2021

