

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Игнатьева Георгия Михайловича на диссертацию **Зыбкиной Анастасии Владимировны** «Псевдовirusы как инструменты изучения поверхностных гликопротеинов филовirusов и поиска ингибиторов проникновения», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Актуальность темы

Филовirusные геморрагические лихорадки, вызываемые прежде всего virusами Марбург и Эбола, с момента их первого выделения (virus Марбург – в 1968 году, virus Эбола – в 1976 году) продолжают оставаться проблемой мирового здравоохранения, что обусловлено высокой контагиозностью возбудителей, выраженной летальностью, сложным иммунопатогенезом периодически возникающими вспышками. Безусловно, эффективная вакцина, как средство профилактики этих заболеваний, могла бы решить данную проблему. Если в прошлом и начале этого века тенденции в разработке таких препаратов опирались на научный анализ с учетом иммунопатогенеза инфекций, то последние разработки никак не предполагают положительное решение этого вопроса. В 2014 году Kai Zacharowski показал эффективную возможность патогенетического лечения геморрагических лихорадок, но этот несомненный успех не отменил необходимость поиска специфических противовirusных препаратов. Проведение скрининга противовirusных препаратов требует большой и рутинной работы с virusом в условиях BSL-4. Интенсивность такой работы может создать аварийную ситуацию. Для таких работ и для скрининговой оценке иммунитета могут быть использованы псевдовirusы. Инфекционность псевдовirusных частиц ограничена лишь одним циклом. Это обеспечивает биологическую безопасность данной системы, делает стоимость исследований гораздо ниже, чем стоимость работ в BSL-4. В настоящее время для получения псевдовirusов филовirusов используют две системы: лентивirusную и рабдовirusную. Каждая из систем

имеет свои преимущества и недостатки, но в целом псевдовirusы являются удобной моделью для поиска противовирусных препаратов.

Таким образом разработка псевдовirusов для их дальнейшего использования в изучении противовирусной препаратов против филоvirusов является актуальной.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций обеспечена анализом имеющейся по теме диссертации литературы, молекулярно-биологических, биотехнологических, статистических методов и репрезентативным числом проведенных исследований.

Все изложенное позволяет считать результаты диссертационного исследования достоверными, а выводы обоснованными, соответствующими поставленным задачам.

Научная новизна

При выполнении работы исследована способность поверхностного гликопротеина эболаvirusа Заир обуславливать проникновение в клетки летучей мыши (Tb1.lu), норки (Mv1.lu) и свиньи (СПЭВ). Показано, что иммунизация кур смесью лентивирусных и рабдовирусных частиц в комплексе с неполным адьювантом Фрейнда индуцирует наработку антител класса Y, нейтрализующих псевдовirusы эболаvirusа Заир. С использованием псевдовirusа на основе virusа везикулярного стоматита с дефектом генома по гену поверхностного гликопротеина получены вирусные частицы, псевдотипированные поверхностным гликопротеином эболаvirusа Заир, варианты гена GP с заменами аминокислот в позициях Y517, D522 и M548 на остаток аланина. С использованием псевдовирусной системы проведен анализ активности 70 производных терпеноидов. Найдены соединения-лидеры, способные ингибировать псевдовirusы с индексом селективности, превышающим 800. Показано, что мишенью связывания исследованных веществ является сайт связывания сертралина. Наиболее высокой ингибирующей активностью обладают производные (-)-борнеола, индекс селективности которых на псевдовirusах превышал 800, а при

использовании натурального вируса достиг 31.

Практическая значимость

Полученные псевдовirusы могут быть использованы:

- для скрининга лекарственных препаратов, обладающих противовирусной активностью в отношении эболавирусов;
- для оценки нейтрализующей активности сывороток как людей, так и животных;
- для активации гуморального иммунного ответа против филовirusов.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности, подтверждение публикаций автора

Диссертация изложена на 128 странице, состоит из введения, разделов включающих в себя:

- анализ и обсуждение литературы по теме диссертации, включающей источники о структуре филовirusов, морфологии вириона, функции белков, псевдовirusах как инструмента изучения поверхностных вирусных белков;
- материалов и методов;
- результатов и обсуждения. Заключение, Выводов, Списка литературы. Приложения и благодарностей. Список используемых сокращений представлен перед введением, что делает ознакомление с диссертацией удобным.

Работа иллюстрирована 10 таблицами, 17 рисунками. Список литературы включает 258 источников, все иностранные.

В общей характеристике работы обоснована актуальность темы исследования, определены цель, задачи диссертационной работы, методология проведенного исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, описана апробация результатов исследования и личный вклад автора.

Автором проведен анализ современной научной литературы за 30-и летний период о структуре филовirusов, роли вирусных белков (отдельно –

белке GP эболавирусов), жизненном цикле, сборке вирионов представлен подробно и содержательно. Данный раздел диссертации так же включает анализ литературы о использовании псевдовирюсов для изучения поверхностных вирусных белков. Он включает в себя информацию об истории использования псевдовирюсов, возможных системах псевдовирюсов (ленте – и рабдовирюсах), использовании псевдовирюсов для изучения антител и их использовании в качестве иммуногеннов.

Анализ литературы по хорошо и доступно представляет анализ имеющейся научной литературы по теме диссертации, в нем присутствует авторская оценка материалов и их связь с результатами, полученным непосредственно самим автором. Проведенный автором анализ имеющейся по теме диссертации литературы подтверждает ее актуальность.

Раздел материалы и методы написан четко и информативно. Стилъ подачи информации свидетельствует о том, что автор полностью владеет методами, которые описывает. В разделе представлены использованные автором материалы, клеточные линии, растворы и питательные среды, использованное оборудование. Методы описаны достаточно подробно и могут быть воспроизведены.

В разделе результаты и обсуждение представлены результаты конструирования плазмид, получения псевдовирюсов и изучения их свойств – трасдуцирующей активности, иммунохимических свойств, иммуногенности. Представлены результаты использования псевдовирюсов для скрининга соединений, способных блокировать проникновение вирусов в клетки-мишень. Необходимо отметить, что в данном разделе представлены результаты изучения ингибирующей активности изучаемых соединений в отношении мутантных вариантов псевдовирюсов GP EBOV (ген GP EBOV в который внесены мутации).

Заключение диссертационной работы основано на обсуждении результатов изучаемой проблемы в контексте с имеющимися в литературе

данными. Выводы, сделанные автором в итоге проведенной работы, полностью основываются на представленном материале.

Степень достоверности и апробация результатов этой комплексной работы не вызывает сомнений. Все полученные в ходе исследования экспериментальные данные хорошо представлены в научных публикациях – по материалам диссертационного исследования получены три патента РФ и опубликовано 5 научных работы, все - в журналах, рекомендованных ВАК. Материалы работы были представлены на двух научных конференциях. Автореферат и опубликованные работы в полной мере отражают содержание диссертации, поставленные цели и задачи.

Вопросы и замечания

Оценивая представленную работу в целом положительно есть замечание, которое носит рекомендательный характер:

В разделе материалы и методы метод 2.2.23 «Иммунизация кур» следовало более подробно описать метод получения IgY антител, или сослаться на работы Иванова А.И., который последние десять лет с успехом применяет получение IgY для научных исследований. Обсуждение полученных при изучении иммуногенности псевдовирусов результатов с результатами Иванова А.И. по изучению IgY в отношении полиовирусов, клещевого энцефалита и желтой лихорадки, несомненно пошли бы на пользу работе.

Тем не менее, данное замечание не носит принципиального характера и не влияет на общую положительную оценку диссертационной работы.

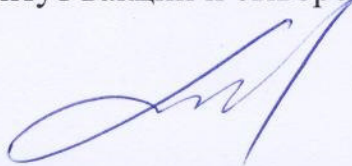
Заключение

Диссертационная работа Зыбкиной Анастасии Владимировны «Псевдовирусы как инструменты изучения поверхностных Создание высокопродуктивных моноклональных клеточных линий, гликопротеинов филовирсов и поиска ингибиторов проникновения», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология является завершенной научно-квалификационной работой, в которой, на основе выполненных автором исследований, решена задача

разработки, получения псевдовирусов и их использования для поиска ингибиторов проникновения эболавирусов в клетки.

Диссертация и автореферат полностью соответствуют критериям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сама автор, Зыбкина Анастасия Владимировна, по совокупности представленных ею материалов, актуальности темы выполненной диссертации, научно-практической значимости и ценности полученных результатов, личному вкладу, достойна присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент: доктор медицинских наук, профессор
старший научный сотрудник
Федерального бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»,



Игнатьев Георгий Михайлович

Почтовый адрес: 105064, Российская Федерация, г. Москва, Малый Казенный переулок дом 5а e-mail: marburgman@mail.ru

Подпись д.м.н., профессора Г.М. Игнатьева заверяю Подпись доктора медицинских наук, профессора Игнатьева Георгия Михайловича заверяю:

Директор Федерального бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»,

Доктор медицинских наук, член корреспондент РАН



Свитич Оксана Анатольевна