

ОТЗЫВ

официального оппонента,
кандидата биологических наук Шаршова Кирилла Александровича 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 диссертационной работы

На сегодняшний день все большее опасение вызывают случаи
геморрагических лихорадок, вызываемые филовirusами Марбург и Эбола. В
последнее десятилетие мир столкнулся с масштабными вспышками,
обусловленными эболавirusом (EBOV) Заир, в 2013-2016 гг. и в Демократической
Республике Конго в 2017-2021 гг. По данным Всемирной организации
здравоохранения, количество погибших от вспышки эболавirusа за время
эпидемии 2013-2016 гг. в Западной Африке превысило 11 тысяч человек. В
подобной ситуации приоритетной задачей является разработка вакцин и
специфических противовирусных препаратов.

Разработка вакцин и терапевтических препаратов сопряжены с работами в
специальных условиях биобезопасности, в лабораториях по работе с особо
опасными инфекциями. Подобной инфраструктурой обладают крайне
немногочисленные организации, ограничено число узких специалистов, имеющих
допуск. В связи с этим идея замены живых вирусов псевдовirusными частицами
крайне востребована, поскольку инфекционность псевдовirusных частиц
ограничена лишь одним циклом.

Это обеспечивает биологическую безопасность данной системы, которая
может быть использована для изучения стадий вирусной инфекции, опосредуемых
поверхностными белками трудно культивируемых и высокопатогенных вирусов.

В настоящее время для получения псевдовirusов филовirusов используют
две основные системы: лентивирусную и рабдовирусную. Автор сравнивает обе
системы, имеющие свои преимущества и недостатки. Лентивирусная система
достаточно толерантна к встройке гомологичных или гетерологичных
(псевдотипирование) вирусных поверхностных белков, однако, плотность дисплея

поверхностного белка на поверхности таких псевдовиральных частиц низка, а морфология значительно отличается от филовиральной, как отличается и иммунологическое поведение таких частиц.

В основе второй системы получения псевдовиральных эболавирусов лежит система почкования вируса везикулярного стоматита (VBS). Сравнение результатов нейтрализации антителами, полученными с использованием этой системы, с результатами, полученными при использовании натурального вируса, показывает, что она ближе имитирует иммунологические особенности эболавируса.

Известно, что псевдовиралы являются удобной моделью для поиска противовирусных препаратов. Потенциальные профилактические и терапевтические препараты, показавшие активность в псевдовиральной системе, могут рассматриваться как кандидаты для дальнейших работ с живым вирусом. Кроме безопасности и относительно низкой стоимости экспериментов большое значение имеет возможность быстрой смены структуры поверхностного белка вируса.

В целом, актуальность разработки псевдовиральных систем для их дальнейшего использования в изучении противовирусной препаратов против филовиралов сомнений не вызывает.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Автором впервые исследована способность поверхностного гликопротеина эболавируса Заир обуславливать проникновение в клетки летучей мыши (Tb1.lu), норки (Mv1.lu) и свиньи (СПЭВ).

Показано, что при иммунизации кур смесью лентивирусных и рабдовирусных частиц в комплексе с неполным адьювантом Фрейнда наблюдается индукция выработки антител ин класса Y, нейтрализующих псевдовиралы эболавируса Заир.

Впервые получены вирусные частицы, псевдотипированные поверхностным гликопротеином эболавируса Заир, на основе вируса везикулярного стоматита с дефектом генома по гену поверхностного гликопротеина.

Проведен анализ активности 70 производных терпеноидов с использованием псевдовиральной системы. Найдены соединения-лидеры, способные ингибировать псевдовиралы с индексом селективности, превышающим 800. Показано, что

мишенью связывания исследованных веществ является сайт связывания сертралина. Продemonстрировано, что наиболее высокой ингибирующей активностью обладают производные (-)-борнеола, индекс селективности которых на псевдовирусах превышал 800, а при использовании натурального вируса достиг 31.

Практическая значимость исследования

Полученные автором псевдовирусы эболавируса Заир обладают большим потенциалом для применения в работе по определению эффективности потенциальных лекарственных препаратов. Использование псевдовирусных частиц целесообразно рассматривать при активации гуморального иммунного ответа против филовирусов, а в дальнейшем - нейтрализующей активности сывороток людей и животных, иммунизированных экспериментальными вакцинами. Кроме того, большой значимостью обладают результаты анализа потенциальных низкомолекулярных блокаторов, эти вещества могут послужить основой для создания эффективных противовирусных препаратов.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 128 страницах, содержит 10 таблиц и 17 рисунков. Библиографический список включает 258 источников.

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

Глава «Обзор литературы» написана грамотным языком и соответствует тематике данной работы: она включает 3 больших раздела с подразделами («Филовирусы», «Молекулярная биология GP эболавирусов» и «Псевдовирусы как инструмент изучения поверхностных вирусных белков»). В конце этой главы имеется «Заключение по обзору литературы» (хотя в оглавлении о нем не указано).

Глава «Материалы и методы» полно представляет использованные методики

и свидетельствует о большом объеме проделанной автором работы. Глава «Результаты и обсуждение» имеет 4 основных структурированных раздела, в которых представлены результаты исследований, а именно: «Конструирование плазмид, содержащих ген GP EBOV», «Получение псевдовирусов EBOV и исследование комплекса свойств», «Использование псевдовирусов EBOV для поиска соединений, способных блокировать проникновение вируса в клетку-мишень» и «Изучение сайта связывания веществ с поверхностным гликопротеином эболавируса Заир». В части, касающейся обсуждения результатов, в данной главе соискатель приводит глубоко осмысленный и подробный анализ полученных результатов исследования.

В разделах «Заклучение» и «Выводы» представлены все полученные автором результаты. Выводы диссертации четко сформулированы, обоснованы, закономерно вытекают из полученных результатов и соответствуют поставленным задачам.

В целом, диссертация соответствует специальности, по которой она представлена к защите, написана ясно и логично, а ее оформление отвечает существующим требованиям. В автореферате отражены основные результаты диссертационной работы.

Достоверность результатов, обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций определяется большим объёмом экспериментальных данных по изучению поверхностных гликопротеинов филовирсов с помощью псевдовирусных частиц и поиска ингибиторов проникновения с использованием методов, адекватных целям и задачам исследования, а также методов статистической обработки полученных результатов.

Научные положения, выводы и заключение, сформулированные в диссертации, обоснованы объёмом проведённых исследований, методическими подходами, использованием современных методов исследования. Основные положения, выносимые на защиту, и выводы логично вытекают из полученных результатов. Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений и выводов не вызывают сомнений.

Публикации и апробация результатов хорошо представлены в диссертации.

Результаты работы отражены в 13 публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 5 – статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций, 8 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Результаты работы представлены на международных конференциях OpenBio (Кольцово, 2019, 2020), на XXI Зимней молодежной школе по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2020). Результаты РИД представлены в 3 патентах РФ.

Вопросы и замечания к диссертационной работе

Работа оценивается положительно. Некоторые замечания в оформлении (например, отсутствие раздела 1.4 в «Оглавлении», о чем указано выше), применение, на мой взгляд, не общепринятых терминов в описании методологии (например, «противовирусный анализ» вместо «анализ противовирусной активности или действия») не являются критическими.

1. Интересен вопрос о мнении автора об адекватности куриной модели для изучения иммуногенности псевдовирусов эболавируса Заир и альтернативных моделях в перспективе, в будущем. Существуют ли ограничения такого подхода для интерпретации результатов при оценке в целом иммунитета у млекопитающих? Как обстоит ситуация с IgG и перспективами моделирования для изучения иммуногенности псевдовирусов эболавируса в отношении их? Ведь в диссертации исследования индукции иммунного ответа по этому классу антител нет.
2. При изучении трансдуцирующей активности псевдовирусов EBOV на основании столбчатой диаграммы (рис 11) был сделан вывод, что «наиболее чувствительными были культуры клеток СПЭВ и НЕК293Т, наименее – MDCK.». Однако, это нельзя сказать однозначно для всех псевдовирусов в эксперименте, различающихся по содержанию разные частицы, как сформулировано в заключении. Так, достоверно высокий уровень люминесценции характерен для EBOV_MLD – частиц, содержащих GP эболавируса без муциноподобного домена, и VSV – частиц, содержащих G BBC. Напротив, достоверно наименьший уровень – только для частиц, содержащих

GP эболавируса. Каким образом устанавливали достоверность различий для вывода о чувствительности клеток?

В целом, работа оценивается положительно, вопросы и комментарии не являются принципиальными, несколько не умоляют ценности и качества работы.

Заключение

Диссертационная работа Зыбкиной Анастасии Владимировны «Псевдовirusы как инструменты изучения поверхностных гликопротеинов филоvirusов 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, разработаны псевдовirusные системы эболаvirusов и проведена оценка возможности их использования для поиска ингибиторов проникновения эболаvirusов 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, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент: руководитель лаборатории молекулярной эпидемиологии и биоразнообразия virusов
ФГБУ «Федеральный исследовательский центра фундаментальной и трансляционной медицины», Научно-исследовательский институт вирусологии,
e-mail: sharshov@yandex.ru
Тел. +7 960-794-21-36
к.б.н. Кирилл Александрович Шаршов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный исследовательский центра фундаментальной и трансляционной медицины»,
г. Новосибирск, 630117, ул. Тимакова, д. 2
телефон/факс приемной: +7(383)333-64-56.

