

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Кононовой Алены Александровны «Псевдовирусная система на основе вируса везикулярного стоматита для поиска противовирусных средств, действующих на вирусные поверхностные белки», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

### **Актуальность исследования**

Вирусные пандемии наносят большой вред общественному здоровью и диктуют необходимость быстрого реагирования, в частности, путем создания диагностических и терапевтических средств. В случае высокопатогенных вирусных возбудителей, требования личной и общественной безопасности являются ограничивающими условиями широкомасштабных исследований противовирусных препаратов, поскольку только ограниченное число лабораторий в Российской Федерации соответствуют международным и отечественным стандартам биобезопасности при работе с патогенами I-II групп. Преодолеть такие ограничения позволяют разработки альтернативных моделей, воспроизводящих некоторые физиологические особенности возбудителей опасных инфекций. Хорошо себя зарекомендовавшими модельными системами являются псевдовirusы. Псевдовirusы представляют собой рекомбинантные вирусные частицы, в которых основные структурные и оболочечные белки могут быть заменены на интересующие белки других вирусов. Генно-инженерные модификации вирусного генома делают использование псевдотипированных вирусов безопасным, поскольку такие рекомбинантные вирусы способны заражать клетки-мишени, но не производить инфекционное вирусное потомство. Благодаря этому, псевдовirusы широко используют для исследования механизма вирусной инфекции - входа вируса в клетку, узнавания рецепторами, а также для разработки противовирусных препаратов, вирус-нейтрализующих антител и вакцин. Наибольшую актуальность разработка псевдовирусных систем приобрела при исследовании препаратов против возбудителей летальных инфекций - вирусов Марбурга и Эболы, а также против вирусов, характеризующихся высокой антигенной изменчивостью, таких как вирусы гриппа. В качестве основы для получения псевдовirusов чаще всего используют системы на основе ретровirusов и вируса везикулярного стоматита.

Работа Кононовой А.А. посвящена разработке псевдовиральной системы на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита и использованию ее для поиска ингибиторов поверхностных белков филовирусов и вируса гриппа А субтипа H5N1. Исследование является актуальным и имеет высокое прикладное значение, поскольку предлагает к использованию полученные в работе псевдовиральные системы для тестирования противовирусных препаратов, в том числе для вируса Марбурга, для лечения которого в настоящее время нет зарегистрированных противовирусных препаратов.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа Кононовой А.А. изложена на 130 страницах, оформлена по стандартному плану, и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация содержит 24 рисунка, 2 таблицы, 1 приложение и список цитируемой литературы из 171 источника.

Во введении автор описывает существующую проблему, обосновывает актуальность предлагаемого исследования, оценивает научную и практическую значимость работы, формулирует цель и задачи. Цель исследования сформулирована четко, автор выделяет 5 задач, успешное выполнение которых в ходе работы позволило добиться поставленной цели.

Обзор литературы посвящен проблеме использования псевдовирусов при изучении вирусных инфекций и разработке противовирусных средств, он состоит из 2х частей. В первой части автор описывает естественные вирусные псевдотипы и различные рекомбинантные псевдовиральные конструкции, проводит аналитический обзор вирусологических и молекулярно-биологических задач, которые могут быть решены с использованием псевдовирусных систем. Привлекательно, что автор дает оценку преимуществ и недостатков применения псевдовирусов, что отражает критический взгляд на проблему и характеризует соискателя как сформировавшегося ученого. Вторая часть обзора литературы посвящена вирусным поверхностным белкам и их роли в инфекции, в том числе, в зависимости от стадии инфекции. Также поверхностные белки рассмотрены как фармакологические мишени для разработки противовирусных средств, что важно для оценки научной и практической значимости предлагаемого исследования. Обзор демонстрирует хорошую теоретическую подготовку Кононовой А.А.

Глава “Экспериментальная часть”, содержит как разделы “Материалы и методы”, так и “Результаты”. Представлено описание использованных экспериментальных методов,

и можно отметить широкий спектр применяемых генно-инженерных и молекулярно-биологических подходов, подробное описание клеточных линий, плазмид и рекомбинантного штамма вируса везикулярного стоматита. Список используемых оригинальных соединений, протестированных на антивирусную активность, приведен отдельным приложением. Набор применяемых методов соответствует поставленным задачам. Раздел “Результаты” изложен на 24 страницах, где подробно описаны и проиллюстрированы полученные результаты.

Глава “Обсуждение результатов” посвящена анализу преимуществ и недостатков псевдовирюсов, полученных в работе, в сравнении с существующими альтернативными системами. Особое внимание уделено моментам оригинальности и новизны предложенных псевдовирюсных моделей, а также анализу возможных сфер применения полученных результатов в практике.

Раздел “Выводы” содержит 5 пунктов, они соответствуют поставленным задачам и сформулированным на основе полученных результатов.

Также основные результаты диссертационной работы кратко суммированы в автореферате, с указанием основных характеристик работы – актуальности исследования, новизны и практической значимости, сведений об апробации работы, там присутствуют все выводы и список публикаций по теме исследования. Публикации по теме диссертации опубликованы относительно недавно, с 2014 по 2017 гг.

### **Научная новизна и практическая значимость исследования**

В результате выполненного исследования автором получена коллекция псевдовирюсов на основе капсида вируса везикулярного стоматита (ВВС) и капсида лентивируса. Впервые получены псевдовирюсы на основе рекомбинантного ВВС, несущие одновременно оба основных поверхностных белка вируса гриппа А (гемагглютинина и нейраминидазы). Эти псевдовирюсы могут служить удобным и безопасным инструментом для изучения патогенеза инфекции вируса гриппа H5N1 в клетках головного мозга. Кроме того, получены рекомбинантные вирусные частицы, псевдотипированные гликопротеином вируса Марбурга. Полученные псевдовирюсные системы позволяют проводить поиск и изучать механизм действия новых противовирусных препаратов, что имеет большое практическое значение для обеспечения биобезопасности и борьбы с вирусными инфекциями. Полученные в работе результаты опубликованы в виде трех публикаций в рецензируемых научных журналах.

### **Общие замечания**

1. В главе “Материалы и методы” отсутствует описание линии клеток, которая была использована для сборки псевдолвирусов на основе лентивирусного капсида (Стр.63). Нет описания метода выделения псевдовиральных частиц. Автор указывает, что “сбор псевдовиральных частиц проводился методом люминометрии или проточной цитометрии”, при этом скорее всего имеет в виду анализ сборки лентивирусных частиц указанными методами.
2. На стр. 70 автор указывает, что “На основе рВВС были получены псевдовиральные системы, экспрессирующие на своей мембране гемагглютинин Н5 в комбинации с другими нейраминидазами N1 вируса гриппа”, однако не указывает число полученных типов псевдовиральных систем и не описывает их состав по нейраминидазам. Возможно, эти данные следовало бы представить в виде таблицы.
3. В тексте главы “Синцитий-образующая способность различных типов гемагглютинина” (Стр. 81) не указано, на какой клеточной линии выполнена работа.
4. В выводе №1 возможно стоило указать, что полученные псевдовиральные препараты имели трансген люциферазы.
5. В приложении отсутствует нумерация исследуемых соединений, что несколько затрудняет их идентификацию по тексту диссертации.

#### **Замечания к оформлению работы:**

1. Надписи на некоторых рисунках выполнены слишком мелким шрифтом (Рис. 1, Рис. 4).
2. Основные подразделы, такие как “Результаты”, лучше было бы начинать с отдельной страницы.
3. В рукописи присутствует незначительное число опечаток и несогласованных выражений. Так в цели работы вместо “вируса гриппа А” написано “вируса группы А”.

Однако, указанные замечания, не уменьшают научную значимость работы, а носят рекомендательный характер.

**Заключение.** Диссертационная работа Кононовой Алены Александровны “Псевдовиральная система на основе вируса везикулярного стоматита для поиска противовирусных средств, действующих на вирусные поверхностные белки”, выполненная в Новосибирском национальном исследовательском государственном университете, представляет собой цельное и законченное исследование, в котором на высоком экспериментальном уровне проведены исследования по разработке и практическому применению псевдовиральных систем на основе вируса везикулярного стоматита для скрининга противовирусных препаратов. Работа полностью соответствует критериям, предъявляемым

к кандидатским диссертациями и соответствует паспорту специальности 03.01.03 – молекулярная биология. Автореферат полноценно отражает объем и содержание исследования. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и качеству научных публикаций представленная работа соответствует критериям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Диссертационная работа оформлена в соответствии с Положениями №5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а автор диссертации, Кононова Алена Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник

Лаб. Биотехнологии ИХБФМ СО РАН

к.б.н.



О.А. Коваль

Подпись к.б.н. О.А. Коваль заверяю

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к.б.н.



Г.Е. Пестряков

04.09.2020

630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Тел. 8(383)3635190, E-mail: o.koval@niboch.nsc.ru