

ОТЗЫВ

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

Актуальность и новизна диссертационной работы связана с тем, что она направлена на развитие научных исследований патогенных вирусов и создание новых противовирусных препаратов с использованием новых молекулярно-биологических подходов. Использование этих достижений позволяет конструировать новые рекомбинантные вирусы, модифицированные молекулами высокопатогенных вирусов и применять их для исследования их свойств в более безопасных условиях. Это обеспечивает ускорение исследований и кардинально снижает риски работы с вирусными патогенами для исследователей и общества. Возможности направленного редактирования генома псевдовиралов дают принципиально новые возможности для поиска и создания средств профилактики и лечения опасных вирусных заболеваний. Диссертант попытался создать и разработать псевдовиральные системы для исследования марбургвируса и вируса гриппа А пригодные для поиска новых противовирусных средств.

Это позволяет рассматривать диссертационную работу как пионерское исследование, обладающее крайне высокой научной значимостью, новизной и большой практической значимостью.

Диссертация Кононовой А.А. написана по традиционному плану и состоит из трех основных разделов: обзора литературы (1), экспериментальной части (2) и обсуждения результатов (3). Данные разделы дополнены введением, заключением, выводами, списком использованной литературы и приложением. Во введении определены актуальность проблемы, цели и задачи работы, научная новизна и практическая ценность полученных результатов, а также положения, выносимые автором на защиту. Обзор написан подробно, ясно и логично. Раздел материалы и методы свидетельствует о том, что работа выполнена с использованием современных методов молекулярной биологии и вирусологии и не оставляет сомнений в достоверности полученных результатов и адекватности их анализа. Результаты собственных исследований изложены в разделе 2 разбитом на одиннадцать подразделов. Результаты представлены четко и последовательно, хорошо иллюстрированы, что убеждает в полноте проведенного исследования и достоверности полученных результатов. Обсуждение результатов диссертационной работы проведено достаточно полно.

Целью настоящей работы, в формулировке автора работы, «являлась разработка псевдовиральной системы на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита и использование ее для поиска ингибиторов поверхностных белков филовирусов и вируса группы А субтипа H5N1».

В процессе выполнения диссертационной работы автором были сформулированы и решались следующие основные задачи:

- Конструирование и получение препаратов рекомбинантного вируса везикулярного стоматита (pVBC), модифицированного

поверхностными белками вируса гриппа H5N1, и оценка их трансдуцирующей активности.

- Изучение инфекционных свойств полученных pBBC.
- Оценка возможности применения полученных pBBC для изучения роли поверхностных белков вируса гриппа H5N1 в развитии вирусной инфекции, а также для поиска и описания потенциальных противовирусных средств.
- Разработка модели pBBC с поверхностным белком GP *Marburg marburgvirus*, для поиска и изучения противовирусных средств.

В рамках настоящей работы получена коллекция псевдовирuсов на основе BBC. В частности, был получен псевдовирuс с HA и NA вируса гриппа методом ко-экспрессии репликационно-неполноценного капсида BBC (с инактивированным геном G-белка) и плазмидных векторов, кодирующих эти белки вируса гриппа H5N1. Показано, что предложенная система может быть использована для поиска противовирусных препаратов направленно блокирующих гемагглютинин и нейраминидазу вируса гриппа. Аналогичная работа была выполнена в отношении получения псевдовирuса, несущего ген гликопротеина G марбургвируса.

Это позволило изучить активность оригинальных химических соединений N-гетероциклических сложных эфиров борнеола на начальные стадии филовирuсной инфекции. Противовирусные свойства наиболее активных веществ были подтверждены *in vitro* с использованием филовирuсов.

К важнейшим достижениям диссертационной работы следует отнести:

- Получение рекомбинантных виpусов везикулярного стоматита экспрессирующих поверхностные белки вируса гриппа A субтипа H5N1.
- Установление возможности применения предложенной псевдовирuсной системы для поиска и изучения ингибиторов

обоих поверхностных белков вируса гриппа H5N1 – гемагглютиниона и нейраминидазы.

- Создание модели многоциклового заражения псевдовируса на основе репликационно-дефектного рВВС с поверхностным гликопротеином G марбургвируса.
- Проведение исследований противовирусной активности более 100 соединений - производных полусинтетических терпеноидов и найдены соединения, относящиеся к N-гетероциклическим производным сложных эфиров борнеола, специфически ингибирующие проникновение MARV рВВС в клетки. Среди них обнаружено высокоактивное противовирусное соединение (1S,4S)-1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-ил-3-(4-метилпиперидин-1-ил)пропаноата, для которого IC_{50} составляет 4 ± 1 мкМ при относительно низкой токсичности.

Рассмотрение работы показывает, что диссертационная работа Кононовой Алены Александровны является самостоятельным законченным исследованием, посвященным проблеме конструирования рекомбинантных вирусов везикулярного стоматита и оценки возможности их использования для поиска противовирусных препаратов. Представленная работа не лишена определенных недостатков. К ним следует отнести:

- Хорошо известно, что таксономия вирусов стремительно изменяется. В 2019 году Международный вирусологический таксономический комитет внес существенные изменения и дополнения в таксономию филовирусов. К сожалению, диссертант только частично учел эти изменения при подготовке диссертационной работы. Однако изменение таксономии в отношении филовирусов преследовало цель привнести в научное сообщество новые названия видов филовирусов и сделать их отличными от названия вируса. Предполагалась, что

использование новых названий имен и видов филовирусов позволило бы также улучшить понимание конкретного исследования через уточнение трактовки используемых таксономических понятий в каждом случае их использования.

- Не совсем согласен с трактовкой автором результатов количественных определений тех или иных показателей. Например, раздел выводы (стр. 99) содержит приблизительные значения для некоторых показателей. Это такие выражения « ... составил порядка 10^9 БОЕ/мл», «были ниже в 2 и 10 раз ...», «полуингибирующая концентрация составляет 4 ± 1 мкМ, при индексе селективности равном 60 ...» и т.д.. Представление этих показателей в более точных цифровых значениях представляется более правильным. Это же касается особенностей статистической обработки численных значений. В разделе 2.1.18 указано, что «... при $p < 0.05$ различия считали достоверными. В таблицах и на рисунках значения представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение». Это затрудняет понимание достоверности данных, представленных в таблицах и рисунках. Видимо, было необходимо ввести дополнительные обозначения, указывающие степень достоверности данных в таблицах и рисунках.
- Имеются редакционные замечания. Так, например, качество микрофотографий в рисунке 8 автореферата (стр. 12) низкое, что не позволяет наглядно иллюстрировать полученные результаты. При этом аналогичный рисунок 21 диссертационной работы (стр. 86) выполнен в более высоком качестве. Список публикаций диссертанта (стр. 20) в автореферате далеко не полный и выполнен в разном форматировании для всех трех представленных публикаций. В целом, количество редакционных неточностей

превышает обычную норму для текстов такого объема и сложности. Дополнительное редактирование помогло бы значительно улучшить качество работы. При этом диссертация хорошо читается, написана профессионально.

На мой взгляд, для достижения основных результатов диссертационной работы был использован адекватный набор молекулярно-биологических и вирусологических методов исследования для получения и исследования рекомбинантных вирусов, оценки новых кандидатных противовирусных препаратов с использованием псевдовирусных систем на основе вируса везикулярного стоматита. Это позволило автору успешно решить задачи диссертационной работы. Диссертация представляет законченное исследование, выполненное на современном методическом и теоретическом уровнях. Выводы сформулированы корректно и соответствуют полученным результатам. Основные положения автореферата полноценно отражают материалы диссертационной работы.

Диссертационная работа выполнена в классическом стиле, она изложена на 130 страницах, содержит 24 рисунка, 2 таблицы и приложение. Список литературы содержит 171 ссылку на работы отечественных и зарубежных авторов.

Полученные результаты были апробированы на одной международной конференции (IUMS 2017, Сингапур). По теме диссертации опубликовано 3 статьи и получен один патент РФ. К сожалению, библиографические данные на труды конференции IUMS 2017 и патент РФ не приведены в диссертационной работе и автореферате. Тем не менее, по данным Российской научной электронной библиотеки (https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=1011523&pubrole=100&show_refs=1&show_option=0) результаты исследований, по всей вероятности, были представлены еще на двух международных конференциях в Иркутске и Новосибирске.

Заключение

Оценивая работу в целом, можно твердо сказать, что проведенные исследования принесли интересные научные результаты, их новизна и достоверность не вызывают сомнений. Описан метод получения рекомбинантных вирусных частиц на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита модифицированных поверхностными белками вируса гриппа и марбургвируса, изучены их инфекционные свойства. Предложенный подход позволил оптимизировать процедуру поиска и изучения эффективных противовирусных препаратов, направленных на белки оболочки вирусов. Это дало возможность эффективно оценивать кандидатные противовирусные препараты и изучать механизмы их противовирусного действия. Выявлены соединения на основе природных терпеноидов, которые способны специфически подавлять вирусную инфекцию. Представляется, что диссертационная работа закладывает фундаментальные основы для развития дальнейших исследований в области синтетической биологии патогенных вирусов человека и может принести новые возможности для совершенствования методов профилактики и лечения вирусных инфекций у человека.

Обобщая вышесказанное, можно сказать, что, несмотря на некоторые замечания, которые носят дискуссионный и редакционный характер, большая научная и практическая важность работы Кононовой А.А. «Псевдовирусная система на основе вируса везикулярного стоматита для поиска противовирусных средств, действующих на вирусные поверхностные белки», дает все основания считать, что диссертационная работа соответствует паспорту специальности 03.01.03 – молекулярной биология и полностью соответствует требованиям 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 Приложениями № 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации, Кононова Алена Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Зав. отделом
молекулярной вирусологии
флавивирусов и вирусных гепатитов,
ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора,
д.б.н., проф.

В.Б. Локтев

Подпись Локтева В.Б. заверяю:
Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора,
к.б.н., доцент



О.А. Плясунова

Локтев Валерий Борисович
630559, Новосибирская обл., п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора
Тел (383) 3367400 доп.2453
loktev@vector.nsc.ru
ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор» Роспотребнадзора.
Д.б.н., профессор, заведующий отделом молекулярной вирусологии
флавивирусов и вирусных гепатитов.