

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории генетических технологий в создании лекарственных средств Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) Костюшевой Анастасии Павловны на диссертационную работу Тучинской Ксении Константиновны «Влияние неинфекционных частиц вируса клещевого энцефалита на иммунный ответ и эффективность противовирусных препаратов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. – «Вирусология».

Актуальность темы диссертационного исследования.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) широко распространен на территории РФ и представляет серьезную проблему для здравоохранения. Он способен вызывать тяжелое заболевание, связанное с поражением центральной нервной системы (ЦНС), которое может иметь длительные последствия и сказываться на качестве и уровне жизни. На данный момент вакцинация является наиболее эффективным способом защиты от заболевания, тем не менее редкие случаи заболевания среди вакцинированных регистрируются. Поэтому создание противовирусных препаратов против ВКЭ остается актуальной задачей. Одним из важных, но ранее неисследованных аспектов в изучении ВКЭ, является наличие в популяции флавивирусов большого числа неинфекционных вирусных частиц, имеющих антигенную структуру, отличную от нормальных инфекционных вирионов. Наличие в популяции избыточного количества таких частиц может сказываться как на индукции нормального иммунного ответа после заражения вирусом, так и на адекватности результатов анализов по протективности профилактических и лечебных противовирусных препаратов.

Новизна полученных результатов и выводов.

В представленной диссертационной работе Тучинской К.К. были подробно изучены неинфекционные вирусные частицы, которые

присутствуют в популяции ВКЭ. Предложенный метод оценки соотношения неинфекционных и инфекционных вирусных частиц показал свою адекватность в ряде экспериментов. В исследовании впервые было показано, что неинфекционные вирусные частицы, в избытке образующиеся при прогревании вируса теряют инфекционность вследствие конформационных изменений белка Е, а не разрушения вирионов. Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что неинфекционные вирусные частицы ВКЭ не изменяли динамику заболевания, однако оказывали влияние на формирование гуморального и Т-клеточного иммунного ответов, что подтверждает важность данного исследования. Несмотря на то, что препараты с избыточным содержанием неинфекционных вирусных частиц не снижали эффективность вакцины КЭ, они влияли на формирование антительного ответа после заражения, значительно снижая бустерный ответ за счет связывания с уже имеющимися антителами. В *invitro* экспериментах также показано, что неинфекционные вирусные частицы выступают в роли дополнительных конкурентных мишеней как для антител, так и для низкомолекулярных противовирусных препаратов, что увеличивает значимость работы, особенно для исследователей, которые занимаются разработкой новых эффективных противовирусных препаратов.

Степень достоверности и обоснованности представленных данных.

Диссертационное исследование выполнено на современном экспериментальном уровне, полученные результаты достоверны, о чем свидетельствует наличие повторов и правильно подобранный в каждом отдельном эксперименте статистический анализ полученных результатов. Выводы диссертации сформулированы в соответствии с полученными результатами и соответствуют поставленным при проведении исследования задачам. Результаты диссертационной работы Тучинской К.К. представлены в статьях, опубликованных в ведущих иностранных и отечественных журналах.

Материалы диссертации были представлены на различных международных и отечественных научных конференциях, в том числе в виде устных докладов.

Структура диссертационной работы.

Диссертационная работа построена по классической схеме и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, выводы, перспективы дальнейшей разработки темы, список использованных сокращений и список использованной литературы. Работа изложена на 125 страницах машинописного текста, иллюстрирована 51 рисунком и 10 таблицами. Список литературы включает 201 источник.

В главе «Введение» автором подробно обоснована актуальность работы, цель и задачи проводимого исследования, научная новизна и значимость полученных результатов.

Обзор литературы состоит из 10 разделов. В первом разделе автор описывает методы определения неинфекционных вирусных частиц в популяции вирусов, их преимущества и недостатки. Во втором разделе были собраны данные о разнообразии неинфекционных вирусных частиц в популяции различных вирусов, их структура и свойства с акцентом на патогенез и иммунный ответ. Третий, четвертый и пятый разделы посвящены строению и функциям белков непосредственно флавивирусов, а также сравнительной характеристике флави- и альфавирусов. В шестом и седьмом разделах подробно описан цикл репродукции флавивирусов и неинфекционные вирусные частицы, которые образуются в результате инфекции, помимо зрелых инфекционных вирионов. Восьмой и девятый разделы описывают клиническую картину заболевания КЭ и иммунный ответ. Десятый раздел содержит данные о существующих вакцинных препаратах против КЭ и препаратов для экстренной терапии КЭ, которые в данный момент находятся на этапе разработки.

В главе «Материалы и методы» подробно приведены используемые в работе вирусы, культуры и лабораторные животные, а также подробно описаны вирусологические и молекулярно-биологические методы. Используемые подходы и методики соответствуют поставленным задачам.

Глава «Результаты и обсуждение» включает 9 разделов, посвященных разным этапам работы. В первом разделе автор оценивает вклад различных факторов, которые могут повлиять на соотношение неинфекционных и инфекционных вирусных частиц, которые образуются в результате инфекции ВКЭ.

Во втором разделе описываются незрелые неинфекционные вирусные частицы. Стоит отметить, что ранее данный тип частиц был изучен в основном для флавивируса, переносимого комарами. Полученные результаты доказывают, что незрелые вирусные частицы присутствуют в популяции исследуемых штаммов ВКЭ.

В следующих двух разделах рассматривается влияние неинфекционных вирусных частиц, полученных путем термической обработки, и незрелых неинфекционных вирусных частиц на динамику инфекции и эффективность вакцины *KЭin vivo*. Продемонстрировано, что заражение препаратами с избыточным содержанием неинфекционных вирусных частиц не влияет на основные параметры инфекционного процесса, а существующая вакцина показала высокую эффективность против исследуемых препаратов.

Далее автором проводится оценка влияния незрелых неинфекционных вирусных частиц на гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ *in vivo*. В работе показано, что избыточное содержание незрелых вирусных частиц увеличивает процент серопозитивных животных на 7-е сутки после заражения, однако приводит к быстрому снижению титров нейтрализующих антител. Новые подходы по изучению Т-клеточного ответа позволили авторам увидеть разницу в Т-клеточных рецепторах, экспонированных на Т-клетках, пролиферирующих в ответ на заражение препаратами зрелого и незрелого вирусов.

Следующий раздел посвящен важности бустерного ответа, при заражении вирусом после вакцинации. Показано, что неинфекционные вирусные частицы способны значительно снижать бустерный ответ и способны изменять спектр антительного ответа при заражении, что в свою очередь при определенных условиях может приводить к снижению эффективности профилактических противовирусных препаратов.

В последних двух разделах показано, что помимо снижения титров антител *in vivo*, было показано, что неинфекционные вирусные частицы также влияют на результаты оценки противовирусной активности нейтрализующих антител и низкомолекулярных противовирусных препаратов *in vitro*.

Замечания по содержанию работы.

В качестве замечаний хотелось бы отметить, что можно было подробнее описать используемые в работе противовирусные низкомолекулярные соединения. Рекомендуется в будущем получить изображение незрелых вирусных частиц ВКЭ в крио-ЭМ и антитела, способные разделять зрелые и незрелые вирусные частицы. Замечания не снижают значимости полученных результатов.

Заключение.

Таким образом, диссертационная работа Тучинской Ксении Константиновны на тему: «Влияние неинфекционных частиц вируса клещевого энцефалита на иммунный ответ и эффективность противовирусных препаратов» представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук является законченной научно-квалификационной работой по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований полностью соответствует требованиям пункта пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в ред. Постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г.; №650 от 29.05.2017 г.; №1024 от 28.08.2017 г.; №1168 от

01.01.2018 г.; № 426 от 20.03.2021 г.; №1539 от 11.09.2021 г.), предъявляемым к кандидатским и докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – «Вирусология».

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетических технологий в создании лекарственных средств
Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского,
ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет)
e-mail: kostyusheva_ap@mail.ru
тел. 8 499-245-35-78

Костюшева Анастасия Павловна



Адрес: Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), г. Москва, ул. М. Пироговская, д. 20, 119435, тел. 8 499-245-35-78, эл. почта: martsinovsky-institute@mail.ru.