

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Ивина Юрия Юрьевича на тему: «Роль секьюрити-белков L и 2A вируса энцефаломиокардита в развитии клеточной патологии», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология

### Актуальность темы диссертации

Вирусные инфекции составляют большую группу заболеваний человека и животных. Вирусы могут вызывать как заболевания, не угрожающие жизни пациента и ее качеству, так и являться причиной развития тяжелых патологий и даже смерти больных. Недавняя пандемия новой коронавирусной инфекции, вызывающего комплекс патологий, известной как COVID-19, и вызвавшая гибель нескольких миллионов людей во всем мире служит еще одной иллюстрацией важности исследования вирусов и создания средств противодействия эпидемиям и пандемиям. Одним из таких инструментов являются профилактические вакцины, многие из которых основаны на непатогенных штаммах соответствующего возбудителя. И для создания таких вакцин необходимо понимать механизмы патогенеза вирусов, чтобы было возможно проводить направленный дизайн их непатогенных вариантов. Прекрасной иллюстрацией работоспособности такого подхода является полиовирусная вакцина.

Пикорнавирусы представляют собой большое семейство безоболочечных вирусов, геном которых представлен геномной цепью РНК. К ним относятся такие известные патогены как вирус ящура, энтеровирусы (включая вирусы Коксаки и риновирусы), вирусы гепатитов А и Е, а также группа кардиовирусов, к которой относится изучаемый диссертантом вирус энцефаломиокардита (EMCV). Эти инфекции способны вызывать поражение желудочно-кишечного тракта, сердца, печени и других органов и тканей. Несмотря на то, что в большинстве случаев вызываемые пикорнавирусами инфекции протекают как острые заболевания с выздоровлением большинства пациентов, в ряде случаев отмечена возможность как развития жизнеугрожающих патологий (напр., фульминантного гепатита при гепатите А) или хронических инфекций (при гепатите Е). Соответственно, крайне актуальной задачей для вирусологии является создание инструментария для иммунопрофилактики таких инфекций. Поэтому исследование механизмов патогенеза пикорнавирусов в целом и анализ функций их белков, которые могут подавлять защитные системы клетки в частности являются важным и актуальным.

Еще одним аргументом в защиту высокой актуальности данной работы может быть использование энтеровирусов в качестве онколитических агентов в

рамках терапии онкологических заболеваний. Во всем мире активно развивается направление, связанное с поиском природных вирусов и созданием их генноинженерных производных, которые могли бы селективно заражать опухолевые клетки и/или селективно вызывать их гибель. Энтеровирусы также известны как перспективные онколитические агенты. Можно видеть, что диссертант использует в своей работе линии клеток рабдосаркомы и карциномы шейки матки, на которых он исследует механизмы вирус-индуцированной гибели.

### **Краткая характеристика основного содержания диссертации**

Диссертационная работа написана по традиционной схеме и состоит из введения, и 4-х глав основной части диссертации, включая: обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение. Кроме того, в диссертации имеются разделы заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений и список литературы. Работа изложена на 133 страницах, иллюстрирована 7 таблицами и 44 рисунками, а список литературы содержит 192 источника.

В разделе «Введение» кратко представлены актуальность работы, степень разработанности темы исследования, цель и задачи исследования, научная новизна полученных результатов, их теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, а также информация о публикации и апробации результатов, свидетельствующие о степени достоверности результатов.

Глава «Обзор литературы» состоит из нескольких подразделов. В них приведены сведения о пикорнавирусах в общем и о вирусе энцефаломиокардита в частности, представлены краткие данные о структуре генома и белках вируса, их основных функциях. Кроме того, более подробно изложены сведения об основных объектах исследования – белках L и 2A вируса, которые отвечают за противодействие защитным системам клетки (секьюрити-белкам). В отдельных подразделах Обзора литературы описано влияние пикорнавирусов на процессы трансляции в клетке и на клеточную гибель – эти данные необходимы для понимания диссертационной работы и места ее результатов в контексте мировых исследований.

В главе «Материалы и методы» диссертант приводит все основные использованные им методы и методики (включая методы математической статистики), а также описывает реагенты. Подробность изложения в данном разделе достаточна для воспроизведения экспериментов и подтверждения результатов независимыми исследователями. Хотелось бы особо подчеркнуть, что автор работы крайне тщательно подошел к описанию состава всех использованных реакционных смесей, ферментов, буферных растворов и т.д.,

что отмечается не во всех диссертационных работах. Широкий спектр экспериментов говорит о высокой квалификации диссертанта. Кроме того, содержание раздела служит обоснованием соответствия диссертации заявленной специальности.

В главе «Результаты» логично и последовательно описывается суть диссертационной работы. На первом этапе Ю.Ю. Ивин методами генетической инженерии сконструировал мутантные варианты геномов вируса с мутациями или делециями в областях, кодирующих секьюрити-белки L и 2A, получил соответствующие варианты вируса и исследовал их репликационную способность в трех линиях клеток: почки хомяка (ВНК-21), рака шейки матки (HeLa) и рабдосаркомы (RD). Было обнаружено, что а) модификация этих белков приводит к снижению уровней репликации патогена и б) вирус и его формы адаптируются к клеточным линиям с появлением мутаций. Далее было найдено, что вирус с инактивированным белком L вызывает быстрое ингибирование кэп-зависимой трансляции в клетках, что сопровождалось фосфорилированием основного регулятора – фактора инициации трансляции eIF2 $\alpha$ , а также снижением уровней накопления белков самого вируса. Интересно, что данный эффект наблюдался лишь в линиях раковых клеток человека. На следующем этапе работы диссертантом было показано, что вирус с мутантным белком L в культуре клеток HeLa вызывает апоптоз, тогда как варианты вируса дикого типа и с делецией в гене белка 2A – имели место как апоптоз, так и некроз. Опять же, в культуре клеток хомяка белок L не оказывал влияние на механизм клеточной гибели. Наконец, в культуре клеток рабдосаркомы механизм клеточной гибели зависел от обоих исследованных секьюрити-белков.

В разделе «Обсуждение» диссертант анализирует полученные данные и помещает их в контекст исследований, проводимых другими научными группами. Хотелось бы подчеркнуть логичность рассуждений и представленных выводов работы. Наконец, в разделе «Заключение» кратко суммированы основные результаты диссертационной работы.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

Все полученные результаты, выводы, вынесенные на защиту положения, а также практические рекомендации являются обоснованными. Они подтверждаются показанными в работе экспериментальными данными, выбором современных методов исследований, которые соответствуют задачам диссертационной работы в целом и отдельных ее этапов. Выводы подтверждаются также наличием альтернативных подходов к исследованию. Отдельным подтверждением достоверности и обоснованности является

использование в работе методов математической статистики для обработки экспериментальных данных.

Основные результаты диссертационного исследования полностью отражены в печати, опубликованы в 3 рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и соответствуют требованиям категорирования журналов, в которых должны быть опубликованы научные результаты диссертационного исследования.

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.10. Вирусология, биологические науки.

#### **Научная новизна выполненной работы**

Юрием Юрьевичем Ивиным продемонстрирована функция белков L и 2A как секьюрити-белков вируса энцефаломиокардита, роль белков в репликации самого патогена и в модуляции жизнеспособности клеток и ряда процессов в самих инфицированных клетках. В частности, диссертант показал, что в линиях раковых клеток человека белок L нарушает процессы кэп-зависимой трансляции, что оказывает влияние на накопление белков самого вируса, созревании его структурных белков и, как следствие, на репродукцию патогена. Кроме того, он обнаружил, что этот же белок играет роль в регуляции пути (механизма) гибели инфицированных клеток, а также установил специфичность эффекта для опухолевых клеток. Наконец, им была обнаружена и роль второго секьюрити-белка – 2A, в ряде культур раковых клеток человека. Ю.Ю. Ивиным была также продемонстрирована возможность повышения выживаемости инфицированных клеток совместным ингибированием каспаз клеток и белков L и 2A вируса.

#### **Практическая значимость работы**

Созданные варианты вируса энцефаломиокардита с инактивацией секьюрити-белков L и 2A могут быть использованы как живые вакцины против данного патогена в ветеринарии. Кроме того, может найти применение и сам метод направленного изменения патогенности пикорнавирусов при работе с другими представителями этого семейства.

#### **Замечания по диссертационной работе**

Как и любое современное и интересное научное исследование, данная диссертационная работа вызывает целый ряд вопросов при ее прочтении. Достоинством данной диссертации является то, что ответы на возникающие по ходу ее чтения находятся в последующих подразделах диссертации. Это говорит о логичности исследования и изложения результатов.

Тем не менее, имеется и ряд вопросов и технических замечаний:

- 1) В обзоре литературы имеются прекрасные иллюстрации, которые помогают быстро анализировать изложенный материал. При этом хотелось бы увидеть чуть более расширенные подписи к некоторым из них. В частности, на

рисунках 1 и 3 представлена структура геномов пикорнавирусов в целом и вируса энцефаломиокардита в частности. Диссертант отметил различные белки разным цветом, например, выделив белки L и 2A красным. Однако подписи к рисункам не содержат информации, что отражают выбранные цвета. Кроме того, в разделе имеется небольшое количество не очень корректных формулировок, например, «блокирует транскрипцию интерферонов» (Стр. 23).

- 2) В разделе «Материалы и методы» перечислены три использованные клеточные линии, однако отсутствует информация о их источнике (коллекции, компании-поставщике) или соответствии заявленному (STR-профилирование). Кроме того, есть техническое несоответствие списка описанию пересевов клеток, в котором внезапно упоминается линия клеток Vero. Наконец, автору следовало упомянуть, какой вариант среды ДМЕМ он использовал (высоко- или низкоглюкозный), особенно учитывая измерение в работе метаболической активности.
- 3) В разделах «Введение» или «Результаты» было бы правильным обосновать выбор использованных в работе клеточных линий.
- 4) Основной научный вопрос заключается в том, почему в диссертационной работе не исследовали влияние секьюрити-белков на статус системы противовирусной защиты клетки (продукция интерферонов I и III типов, индукция интерферон-зависимых генов) и не анализировали статус этой системы в выбранных клеточных линиях. Диссертант упоминает в обзоре литературы, что основной изучаемый им белок (L) может блокировать апоптоз за счет взаимодействия с олигоаденилатсинтазой (Стр. 39) – классическим интерферон-индуцируемым белком. Можно ожидать, что один из механизмов действия секьюрити-белков будет заключаться в блокировании интерферонового ответа белком L, что можно было бы оценить анализом уровней мРНК нескольких генов обратной транскрипцией и ПЦР в реальном времени в уже имеющихся образцах. Тем не менее, необходимо отметить, что это направление не было запланировано в диссертационной работе. Соответственно, данный вопрос является не замечанием, но скорее направлением дальнейших исследований.

Вместе с тем, указанные замечания и вопросы являются скорее техническими и, как следствие, не умаляют высокой значимости диссертационного исследования.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Ивина Юрия Юрьевича на тему: «Роль секьюрити-белков L и 2A вируса энцефаломиокардита в развитии клеточной патологии», 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, предъявляемым к кандидатским диссертациям 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.; №101 от 26.01.2023 г.; с изменениями в действующей ред. №62 от 25.01.2024 г.), а ее автор Ивин Юрий Юрьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

**Официальный оппонент:**

Главный научный сотрудник,  
заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций  
ФГБУН институт молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,  
доктор биологических наук  
эл. почта aivanov@yandex.ru,  
телефон: +7 (499) 135-23-11

Иванов Александр Владимирович

Подпись д.б.н. А.В. Иванова заверяю.

Ученый секретарь ФГБУН института молекулярной биологии  
им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук,  
канд. физ.-мат. наук.

Коновалова Елизавета Владимировна

«18» октября 2024 г.



119991, г. Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, д.32

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Тел.: +7 (925) 068-36-30 e-mail: aivanov@yandex.ru