

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Шмарова Максима Михайловича на диссертацию Каторкиной Елены Ивановны на тему «Функциональная характеристика гликопротеина CD2v вируса африканской чумы свиней, слитого с Fc фрагментом иммуноглобулина G свиньи», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – «Вирусология».

Актуальность темы. Африканская чума свиней (АЧС) - инфекционная болезнь диких и домашних свиней, характеризующаяся высокой летальностью (до 100%), сверхострым, подострым, острым и хроническим течением. На территории Российской Федерации (РФ) АЧС регистрируется с 2007 года и на протяжении последних лет страны Восточной Европы и Китай являются территорией стационарного неблагополучия по данному заболеванию.

На протяжении многих лет исследовательские группы всего мира усиленно работают над созданием вакцины против АЧС на основе как аттенуированных штаммов, так и рекомбинантных вирусов, с использованием ДНК и РНК технологий. Одним из актуальных направлений при создании эффективных средств специфической профилактики против АЧС является использование рекомбинантных белков (эпитопов) иммунологически значимых белков вируса АЧС.

Вирусные белки, присутствующие на оболочке вирионов и поверхности инфицированных клеток, являются основной мишенью для клеточно-опосредованного иммунитета и могут быть мишенями для нейтрализующих антител, что, несомненно, требует детального изучения.

Ранее были идентифицированы белки, предположительно отвечающие за способность к интернализации вируса: p72 / B646Lp, p54 / E183Lp и p30 / CP204Lp. Антитела против этих белков p72 / B646Lp и p54 / E183Lp могут ингибировать связывание вируса с клетками, а антитела против p30/CP204Lp интернализацию вируса. Были также идентифицированы и другие белки вируса АЧС, которые также отвечают за проникновение и распространение вируса. К ним относятся белки CD2v / EP402R, p12/ O61Rp, D117L. Однако, применение данных белков в качестве протективных антигенов обеспечивали только частичную защиту, не защищали животных от вирусов АЧС гетерологического происхождения.

Особенности строения вирусной оболочки, с большим количеством гликозилированных белков, позволяют вирусу «маскировать» антигенные

детерминанты и избегать воздействия иммунной системы. Следовательно, поиск и применение способов решения сформировавшейся задачи, в частности, увеличение представленности поверхностных антигенов вируса АЧС (например, белок CD2v, С-лектиноподобный белок, белок мембраны вируса Р54), за счет увеличения его иммуногенности, является одним из существующих подходов создания средств лечения и профилактики против африканской чумы свиней. Белок CD2v, обладает гемадсорбирующей активностью и демонстрирует определенный протективный потенциал, рассматривается как наиболее перспективный антиген для создания кандидатной вакцины против АЧС.

Разными авторами было показано, что белок CD2 играет важную физиологическую роль в облегчении адгезии между Т-клетками и антиген-презентирующими клетками (АПК) путем специфического взаимодействия с LFA-3 (lymphocyte function-associated antigen - 3), тем самым способствуя распознаванию Т-клетками чужеродных антигенов, представленных основным комплексом гистосовместимости на АПК SLA. Блокирование этого взаимодействия CD2-LFA3 свободным лигандом, анти-CD2-антителами или растворимым CD2 приводило к ингибированию различных функций Т-клеток.

Технология Fc-слияния успешно была применена для ряда борьбы с многими инфекционными болезнями вирусной и бактериальной этиологии. В качестве протективных антигенов могут выступать структурные, капсидные, гликопротеины, а также протеины, отвечающие за гемадсорбирующие свойства вируса. Применение Fc-технологии для создания антигенов в различных системах экспрессии, против вирусов Эбола, ВПЧ, туберкулеза, лихорадки Денге, применяли иммунизацию животных очищенными рекомбинантными белками и также имели эффективное включение клеточного и гуморального иммунитета. В качестве вектора доставки антигена могут выступать, как очищенные рекомбинантные белки, так и различного рода вирусные вектора (бакуловирусы, аденовирусы и др.). Показано, что вне зависимости от способа доставки антигена Fc-слитые молекулы индуцируют сильный клеточный и гуморальный иммунные ответы.

В связи с вышеизложенным, Е.И. Каторкиной выбрана актуальная тема, направленная на получение рекомбинантных химерных молекул кодирующие химерный белок CD2v, связанный с Fc-фрагментом иммуноглобулина G1 и изучены их характеристики.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Сформулированные в диссертационной работе научные положения, выводы и рекомендации в полной мере обоснованы представленными теоретическими и экспериментальными данными, полученными в результате собственных исследований. Перечень используемых биоинформатических, молекулярно-биологических, вирусологических и физико-химических методов исследований позволяет соискателю изучить характеристики полученных рекомбинантных молекул вируса АЧС, связанных с Fc-фрагментом, что соответствует поставленным в работе задачам.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций. К достоинству диссертационной работы относится использование обширного спектра современных методов исследований. Достоверность результатов подтверждается электрофореграммами продуктов амплификации генов, схемами генетических конструкций, таблицами и графиками оценки показателей жизнеспособности и скорости роста культуры клеток, после трансфекции клеток СНО, фотографиями качественного анализа, графиками динамики жизнеспособности культур клеток на этапе прохождения селекции на антибиотике, таблицами и графиками показателей стабильности продуктивности клеточных линий, электрофореграммами, подтверждающими аутентичность полученных химерных молекул, фотографиями качественного анализа гемадсорбции эритроцитов, графиками и диаграммами анализов связывания.

Результаты диссертационной работы опубликованы в шести научных работах, в том числе трех статьях в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Перечне рецензируемых научных изданий. Материалы диссертации прошли публичное обсуждение на трех научных конференциях и на заседаниях Ученого совета ФГБНУ ФИЦВиМ.

Научная новизна работы заключается в том, что автором получены химерные молекулы антигена CD2v вируса АЧС (штамм «Ставрополь 01/08»), слитые с Fc-доменом свиного IgG 1 изотипа, которые являются аутентичными по отношению к исходным молекулам. получены стабильные клеточные линии «СНО-CD2-Fc» и «СНО-Fc-CD2», экспрессирующие химерные рекомбинантные молекулы Fc-CD2v и CD2v-Fc, которые обладают Fc-опосредованной активностью, пролиферирующими свойствами и вызывают выброс интерферона- γ .

С точки зрения практической значимости новизна исследования подтверждена депонированием культур клеточных линий, экспрессирующих

рекомбинантные химерные молекулы в Государственная коллекцию микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных ФГБНУ ФИЦВиМ.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности.

Диссертационная работа изложена на 124 страницах и включает: введение, обзор литературы, материалы, методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список сокращений, список использованной литературы, включающий 126 источника, из которых 121 - иностранные. Диссертация иллюстрирована 47 рисунками и 21 таблицей и дополнена приложениями.

Во введении автором обоснована актуальность темы исследования, определены и сформулированы его цель и задачи, констатирована научная новизна, теоретическая и практическая значимость, внедрение результатов исследования, а также представлены основные положения, выносимые на защиту, методология и методы исследования.

Обзор литературы изложен со знанием изучаемой проблемы на современном уровне и соответствует теме исследований. Ссылки на источники достоверны, научная информация по проблеме, как в нашей стране, так и за рубежом представлена сведениями последних лет. Автором подробно и полно проанализированы вопросы организации генома вируса АЧС, механизма репликации вируса, индукции иммунного ответа, вариабельности вируса и т.д. Особый интерес вызвала глава, посвященная современным подходам в создании эффективных вакцин на основе технологии Fc-слияния.

На основании проведенного литературного анализа Е.И. Каторкина объективно и целенаправленно спланировала проведение собственных исследований направленных на получение и функциональную характеристику гликопротеина CD2v вируса АЧС, слитого с Fc-фрагментом свиного IgG 1 изотипа.

Экспериментальные данные, представленные в диссертационной работе, корректно обработаны и интерпретированы, выводы являются логичным завершением результатов исследований, что дает возможность сделать заключение о высоком уровне научной и профессиональной подготовки соискателя, и свидетельствует о достижении поставленной цели работы.

Автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

Все вышеизложенное позволяет дать работе положительную оценку. Однако в процессе ознакомления с диссертационной работой возникли следующие замечания:

- литературный обзор следовало бы более корректно структурировать для избежания повторного упоминания отдельных тезисов, касающихся например роли вакцинации в борьбе с инфекционными заболеваниями и т.п.;
- в разделе, посвященном анализу связывания химерных молекул CD2v-Fc и Fc-CD2v с Fc-рецепторами при описании метода ИФА ошибочно указано, что был использован раствор свиных IgG антител, конъюгированных с ферментной меткой (пероксидазой хрена);

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней.

Диссертационная работа Каторкиной Елены Ивановны на тему «Функциональная характеристика гликопротеина CD2v вируса африканской чумы свиней, слитого с Fc фрагментом иммуноглобулина G свиньи», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – Вирусология, представляет собой завершённую научно-квалифицированную работу.

По своей актуальности, новизне и практической значимости полученных результатов, методическому уровню, объёму выполненных исследований, соответствует п. 9 «Положение о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением №842 Правительства РФ от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждение ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 - Вирусология.

Официальный оппонент,
доктор биологических наук
Заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России
123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18, тел. +7 (499)193 30 01
E-mail: mshmarov@yahoo.com



Шмаров Максим Михайлович
27.11.2020г.

Подпись М.М. Шмарова заверяю:

Заместитель директора по научной работе
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России,
доктор биологических наук, профессор



Пронин Александр Васильевич