

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Марии Юрьевны Пахаруковой на диссертацию Соловарова Иннокентия Сергеевича «Использование экстрактов растений и ДНК-аптамеров в качестве источников новых препаратов, обладающих противовирусной активностью в отношении вируса клещевого энцефалита», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология

Актуальность темы диссертационной работы

Высокая актуальность исследования клещевых инфекций подчеркивается в первую очередь их высокой распространенностью в Европе и Азии и стабильно высокой заболеваемостью клещевыми инфекциями среди населения. Несмотря на эпидемическую значимость этого заболевания, единственный препарат для специфического лечения и профилактики клещевого энцефалита – донорский иммуноглобулин человека обладает рядом существенных недостатков. Поэтому необходима разработка новых средств надежной и специфической терапии клещевого энцефалита. Таким образом, диссертационная работа Соловарова И. С. представляется весьма актуальной и востребованной работой.

Основное внимание в своей работе Иннокентий Сергеевич сосредоточил на двух перспективных источниках новых препаратов против клещевого энцефалита – ДНК-аптамерах и экстрактах веществ из растительного сырья. Для достижения поставленной цели автором был проведен большой объем экспериментальных исследований, направленных на решение следующих задач:

1. Сформировать панель перспективного растительного сырья для проведения исследования, оценить противовирусную активность водных растительных экстрактов в отношении вируса клещевого энцефалита *in vitro*;
2. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии провести фракционирование экстракта, проявившего наибольшую противовирусную активность, и определить фракции, обладающие прямым вирулицидным действием;
3. С помощью масс-спектрометрического анализа активных фракций идентифицировать кандидатные компоненты, обуславливающие вирулицидное

действие экстракта и оценить вирулицидные свойства идентифицированных компонентов в химически чистой форме;

4. Сформировать библиотеку вырожденных ДНК-аптамеров, провести отбор аптамеров к вирусу клещевого энцефалита с помощью технологии систематической эволюции лигандов с экспоненциальным обогащением (SELEX) оценить аффинность обогащенного пула, установить нуклеотидную последовательность аптамеров после проведенного отбора к вирусу и оценить прямые вирулицидные свойства синтетических олигонуклеотидов.

Основные результаты выполненной работы, их достоверность и научная новизна

В рамках работы Иннокентием Сергеевичем была изучена противовирусная активность водных экстрактов трех лекарственных растений *H. erectum*, *P. bistorta*, *T. chebula* в отношении вируса клещевого энцефалита. Автор показал, что наибольшим вирулицидным действием *in vitro* обладает водный экстракт *T. chebula*. Автору удалось выявить три химических соединения, обуславливающих вирулицидные свойства в экспериментах *in vitro*, – корилагин, тригаллоил глюкозу и пуникалагин.

Иннокентием Сергеевичем при проверке вирулицидного действия химических чистых аналогов компонентов экстракта *T. chebula* и вычисления полумаксимальных эффективных концентраций EC50 впервые продемонстрировано, что пуникалагин обладал наибольшей эффективностью в отношении ингибирования вируса клещевого энцефалита, его EC50 равна 0,0007 мг/мл, при этом корилагин и тригаллоил глюкоза были менее эффективны.

Кроме того, Иннокентием Сергеевичем проведен отбор аптамеров на основе технологии SELEX с использованием ДНК-библиотеки вырожденных последовательностей аптамеров длиной 40 нуклеотидов. Автору удалось провести восемь последовательных раундов селекции аптамеров, на основании которых было отобрано и отсеквенировано 16 последовательностей аптамеров, которые связывались селективно с вирусом клещевого энцефалита. Иннокентием Сергеевичем было выбрано четыре последовательности аптамера для проверки их вирулицидной активности в отношении вируса клещевого энцефалита.

Все вышесказанное ясно указывает на новизну и научную ценность полученных результатов.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Соловарова И. С. построена по классической схеме. Она состоит из введения, двух глав обзора литературы, двух глав собственных исследований, заключения и выводов, списка литературы. Работа изложена на 159 страницах, иллюстрирована 34 рисунками и 1 таблицей. Список использованной литературы содержит 396 источников.

Раздел «Введение» содержит все необходимые подразделы: «Актуальность темы исследования», «Степень разработанности», «Цель работы», «Задачи», «Научная новизна», «Теоретическая значимость», «Практическая значимость», «Методология и методы исследования», «Положения, выносимые на защиту», «Степень достоверности и апробация работы». В целом, глава «Введение» написана убедительно, все положения хорошо обоснованы.

Обзор литературы посвящен современному состоянию исследований вируса клещевого энцефалита, разработки средств лечения, профилактики и контроля клещевого энцефалита, включая лекарственным средствам на основе растений. Кроме того, в обзоре литературы освещены основные вопросы и представления об аптамерах, их строению, способах селекции и изучения аффинности.

Глава «Материалы и методы» содержит описание большого перечня разнообразных методов исследований: от вирусологических и микробиологических до молекулярно-генетических и биохимических технологий. Нужно отметить, что при выполнении работы Иннокентий Сергеевич продемонстрировал умение комбинировать различные методические подходы, что позволило ему получить большой объем взаимно дополняющих данных по выявлению и идентификации в экстрактах растений и в библиотеках ДНК-аптамеров новых молекул и веществ, обладающих вирулицидной активностью в отношении вируса клещевого энцефалита.

Глава «Результаты» хорошо иллюстрирована, все рисунки и таблицы понятны и полностью соответствуют полученным результатам.

Тем не менее к работе есть несколько замечаний:

1. Результаты по вирулицидному действию как в автореферате, так и в тексте диссертации показаны, как диаграмма значений полумаксимальных эффективных концентраций EC50, однако традиционно такие данные представляются как сигмоидальная кривая зависимости «доза-ответ», на основании которой вычисляются концентрации EC50. Кроме того, не показано, насколько математическая модель «доза-ответ» статистически значима, т.е. соответствует полученным экспериментальным данным. То же касается представления данных цитотоксичности отдельных компонентов.
2. Автором не представлены результаты вычисления констант связывания отдельных аптамеров с белками вируса клещевого энцефалита. Поэтому непонятно, на каком именно критерии основан выбор четырех из 16 выявленных аптамеров для проверки вирулицидной активности.
3. В работе было поставлено 4 задачи, при этом выводов сделано пять, поэтому прямую связь задача-вывод сложно установить. Кроме того, выводы сформулированы нечетко. Так, вывод номер 3 и вывод номер 4 фактически дублируют информацию. Вывод номер 5 не обладает научной новизной, т.к. неудивительно, что мембрана с порами размером 100 кДа будет пропускать олигонуклеотиды, но не будет пропускать через свои поры вирус клещевого энцефалита в комплексе с аптамерами.

Заключение

Следует отметить хороший методический уровень проведенного исследования и логичность изложения полученных данных. Совокупность представленных экспериментальных данных и теоретических положений позволяет квалифицировать работу Соловарова И.С. как значимое событие в области молекулярной вирусологии. Содержание автореферата соответствует материалам, представленным в диссертации, и полностью отражает суть проведенного исследования.

Соловаров И.С. представил материалы, изложенные в работе, на 7 научных конференциях, в 6 статьях в научных журналах, относящихся к списку ВАК.

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов диссертации не вызывают сомнений. Автор хорошо владеет современной литературой по тематике, задачи исследования были полностью решены.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная работа соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, критериям пунктов 9-11, 13 и 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года № 842, с изменениями постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а ее автор, Соловаров Иннокентий Сергеевич, заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.10 – вирусология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярных
механизмов патологических
процессов ФГБНУ ФИЦ ИЦиГ СО РАН

Пахарукова Мария Юрьевна

26.02.2024

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»;

630090, г. Новосибирск, проспект Лаврентьева 10;

+7 (383) 363-49-63 (дополнительный 2210);

E-mail: pmaria@yandex.ru

Доктор биологических наук, Пахарукова Мария Юрьевна
ученый секретарь ИЦиГ СО РАН
Орлова

