

Отзыв официального оппонента

На диссертационную работу Волковой Натальи Вячеславовны на тему «Получение экспериментальных ДНК-вакцин против лихорадки Марбург», представленную на соискание степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.3-молекулярная биология
1.5.10-вирусология

Актуальность темы

Вирусы геморрагических лихорадок Эбола и Марбург являются одними из самых опасных патогенов в мире. Исторически вспышки филовирюсов были относительно небольшими, однако эпидемия вируса Эбола в 2013-2016 гг в Западной Африке подчеркнула угрозу, которую представляют собой филовирюсы. Наличие постоянного природного резервуара вируса и возможность его быстрого распространения в условиях современного мира, обуславливают необходимость и актуальность создания и апробации вакцин против геморрагической лихорадки Марбург.

Диссертационное исследование Волковой Н.В. посвящено разработке плазмидных ДНК-конструкций, которые могут стать основой для создания вакцины против геморрагической лихорадки Марбург. Исследование охватывает этап создания конструкций, проверку их иммуногенных свойств на лабораторных мышах, и завершается экспериментом по оценке защитных свойств одной из конструкций на морских свинках.

Научная новизна и практическая значимость исследования и полученных результатов

Научная новизна исследования обусловлена воплощением смелой идеи исключения муцин-подобного домена белка GP из состава антигена вакцинной конструкции. В работе показано, что трехкратная иммунизация плазмидной ДНК, кодирующей химерный белок GP с удаленным доменом

MLD способна вызывать образование нейтрализующих антител и защитить морских свинок от инфекции вирусом Марбург.

Также в работе впервые была создана и охарактеризована ДНК-конструкция, кодирующая одновременно три антигена вируса Марбург (GP, NP, VP40).

Обоснованность научных положений и выводов

Положения, выносимые на защиту, написаны кратко, адекватно и полностью соответствуют полученным результатам, статистическая значимость которых не вызывает сомнений.

Выводы, сделанные по итогам работы, сформулированы в целом менее корректно. Вывод 2 сделан по результатам сравнения Т-клеточного ответа только в отношении эпитопов белка GP, однако сформулирован о вирус-специфическом Т-клеточном ответе (что подразумевает использование на этапе стимуляции более широкого спектра пептидов, охватывающего несколько белков вируса Марбург).

Выбранная автором методология не позволяет сделать вывод о том, какая из конструкций вызывает более высокий уровень MARV-специфичных Т-клеток, поскольку для сравнения использованы только пептиды GP. В тоже время конструкция pVAKS-3PM кодирует не только белок GP, но и белки NP и VP40, которые также могут стимулировать Т-клеточный ответ, который имеет значение для защиты от инфекции вирусом Марбург (doi: 10.1186/1743-422X-6-132).

Структура и объем работы

Диссертационная работа написана понятным языком, аккуратно оформлена, хорошо проиллюстрирована и оставляет приятное впечатление при чтении. В обзоре литературы подробно описаны существующие разработки в области создания вакцин против вируса Марбург. При этом обзор содержит ряд спорных моментов, связанных с интерпретацией автором

отдельных научных работ (подробнее в разделе «Замечания»). Раздел «Материалы и методы» написан очень кратко, при этом местами присутствует излишняя детализация (пробирки «Ахуген»), и в тоже время отсутствует описание ряда важных параметров (заражающая доза в опыте с морскими свинками). Разделы «Результаты» и «Обсуждение» объединены в один, который легко читается и органично смотрится. В «Заключении» логично обобщены полученные в работе результаты.

Вопросы

В процессе чтения работы возникли следующие вопросы:

1) Были ли видны при электронной микроскопии шипы бека GP на поверхности вирусоподобных частиц полученных после трансфекции клеток? Какова по мнению авторов локализация белка GPDM в трансфецированных клетках и каким образом по мнению автора, происходит его представление в АПК?

2) Какова эффективность «сайта автопротеолиза» P2A использованного в конструкции плазмид pVAKS-2PM и pVAKS-3PM? Наблюдали ли авторы при Вестен-блот анализе полосу, соответствующую слитому белку VP40-P2A-NP?

3). На 600 мкг плазмиды, использованной для иммунизации мышей, в случае pVAKS-GPDM приходится больше копий гена GPDM, чем в случае pVAKS-3PM. Это в свою очередь могло повлиять на уровень экспрессии антигена GPDM у иммунизированных животных. Могут ли различия в Т-клеточном ответе быть связаны с отличием в антигенной нагрузке? Сравнивали ли уровни экспрессии антигенов при трансфекции клеток одинаковым количеством плазмидной ДНК и соответствующей нормировкой?

Замечания

- Задачи 2 и 3 фактически дублируют друг друга.

- В работе в нескольких местах упоминается, что домен MLD - наименее важный регион для развития «успешного» гуморального

иммунного ответа (стр. 82). Однако приведенные в обоснование этого тезиса две научные статьи (стр. 62) некорректно интерпретированы. В статье Bornholdt et al. 2016 рассматривались антитела только от одного переболевшего донора, а не многих «выживших людей», как указано в литературном обзоре. В работе Takada et al. 2001 не проводили картирование эпитопов GP EBOV и тем более, не оценивали роль отдельных эпитопов в защите. Таким образом, тезис о (не)важности домена MLD следует заменить предположением.

- Не указано из каких коллекций были получены использованные в работе клеточные линии.

- Не указаны номера использованных последовательностей в базе данных GenBank.

- Не указано на какой срок после последней иммунизации проводили заражение морских свинок? Сколько LD50 использовали? Каким штаммом заражали животных?

- Неясно о какой научной новизне идёт речь на стр. 85, поскольку в предыдущем абзаце обсуждается морфология вирусоподобных частиц, полученных в клетках HEK293, которая ранее уже была продемонстрирована в работе Warfield et al., 2005 (doi 10.1586/14760584.4.3.429).

- На изображении Вестерн-блот отсутствует маркер, по которому можно было бы сориентироваться о молекулярной массе фрагментов. На дорожке 1 две полосы одинаково обозначены как GP. Чему соответствует нижняя полоса?

- В таблице 3 фигурирует группа 4 – животные, иммунизированные вектором pVAKS. В описании эксперимента указано что контрольным мышам вводили физиологический раствор.

- В таблице 3 нет указания того, какие описательные статистики использованы для подсчета представленных значений для различных групп? К оформлению значений также есть небольшое замечание - размерность значения ошибки на два порядка превышает размерность значения обратного

титра, что бессмысленно для оценки разброса данных. Возможно, для описания результатов данного эксперимента более наглядным будет использование графического представления.

- Непонятно обоснование выбора конструкций pVAKS-GPDM и pVAKS-3PM для оценки Т-клеточного ответа, представленное в работе фразой «Наибольшие титры специфических антител вырабатываются ...». Без указания того, по какому конкретно антигену проводится сравнение титров антител, эта фраза лишена смысла.

- Представление данных на рисунке 29 требует существенных пояснений. Медиана и диапазон вариации (имеется ли ввиду интерквартильный диапазон?) являются недостаточно информативными при малом числе элементов выборки. Учитывая, что животных менее 10 в группе, необходимо представить данные по каждому животному. Необходимо указать поправку на множественные сравнения, которая была использована при сравнении групп в тесте Манна-Уитни и представить на графике скорректированные р-значения (вместо звездочек). Аналогичное замечание к рисунку 30.

- Фраза «достоверность рассчитывалась» является некорректной. Рекомендуется использовать термин «статистическая значимость», оценка которой проводится путем сравнения р-значения, полученного в результате применения статистического критерия и уровня значимости, установленного исследователем. Оценка может иметь два значения: «статистически значимо» и «статистически не значимо» (да/нет) в зависимости от результата указанного сравнения, поэтому термин «расчет» в данном случае не применим.

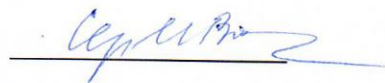
- Статистический критерий не может «подтвердить» различия. Применение статистического критерия позволяет отклонить гипотезу об отсутствии различий с определенной доверительной вероятностью, не равной единице.

В целом можно заключить, что диссертационная работа определенно обладает оригинальностью. Большинство приведенных выше замечаний не снижают ценности полученных результатов и могут быть исправлены автором в процессе презентации доклада. Представленная работа оставляет открытым вопрос о том, может ли расширение антигенного состава и способность индуцировать формирование вирусоподобных частиц, повысить защитную эффективность ДНК-вакцины против вируса Марбург. Однако работа является хорошей базой для продолжения исследований в данном направлении.

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

Диссертационная работа Волковой Н.В. по теме «Получение экспериментальных ДНК-вакцин против лихорадки Марбург» выполнена в отделе биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора на высоком научном и методическом уровне. Диссертационная работа Волковой Н.В. отвечает всем требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» от 24 сентября 2013г. № 842, утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.10 – вирусология и 1.5.3 – молекулярная биология.

Сергеева Мария Валерьевна



Кандидат биологических наук,
Ведущий научный сотрудник лаборатории векторных вакцин
ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России
Адрес: 197376 Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 15/17
Телефон: +78124991521, e-mail: mari.v.sergeeva@gmail.com

Подпись Сергеевой М.В. заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ «НИИ гриппа
им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.



Т.Г. Лобова