

Відгук

офіційного опонента на дисертацію **Мельнічук Наталії Сергіївни**
«Вплив олігорибонуклеотидів на інфекційність вірусу грипу *in vitro* та
грип-індуковану експресію генів вродженого імунітету *in vivo*»,
яка подана здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Актуальність теми дисертаційної роботи. Грип та інші гострі респіраторні інфекції є найпоширенішими захворюваннями людини і складають майже 70 % усіх інфекційних захворювань. До 90 % населення страждає однією з цих інфекцій принаймні раз на рік. Щорічні епідемії вірусу грипу А спричиняють численну смертність і економічні втрати. Існуюча пандемія коронавірусу COVID19 спричинила 2 мільйонна смертей у світі, 20 тисяч смертей в Україні та великі економічні втрати. Ко-інфекції з вірусом грипу та іншими респіраторними вірусами ускладнюють перебіг захворювання. Через пандемію коронавірусу COVID19, зниження поширення респіраторних захворювань, таких як грип є дуже важливим завданням.

У зв'язку з резистентністю вірусу грипу до існуючих ліцензійних протигрипозних препаратів існує потреба у пошуку протигрипозного препарату спрямованого проти нових мішеней. На сьогоднішній день відсутні ліцензійні інгібітори гемаглютиніну (НА), що робить НА новою перспективною мішенню для створення нового протигрипозного препарату.

Основною причиною смерті пацієнтів від грипу є цитокиновий шторм, який призводить до надмірного запалення, набряку, дисфункції та пошкодження тканин легенів і є результатом вродженої імунної відповіді клітин хазяїна на вірус грипу. Тому використання терапевтичного препарату для ослаблення вродженої імунної відповіді у поєднанні з противірусною дією може зменшити симптоми та пошкодження тканин легенів, які спричинені вірусом грипу.

Раніше співробітниками лабораторії було продемонстровано, що природні олігорибонуклеотиди (ОРН) та їхні комплекси з D-манітолом (ОРН-D-M) на основі сумарної дріжджової РНК мають протигрипозну та протизапальну дії. Проте механізм їхньої дії ОРН-D-M залишається досі незрозумілим та потребує вивчення. Тема дисертаційної роботи являється актуальною, оскільки направлена на вивчення впливу ОРН на активність НА вірусу грипу та експресію генів вродженого імунітету за умов грипу з метою наблизитися до розуміння механізмів одночасної протигрипозної та протизапальної дії ОРН, яка є актуальним підходом у лікуванні інфікованих грипом.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт групи молекулярної фармакології відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетних тем № 2.2.4.15 – «Вивчення впливу олігонуклеотидів на сигнальні білки та експресію генів вродженого імунітету» (номер державної реєстрації – 0113U002779, 2014-2018 рр.) та №35/15 – «Комплексоутворення препаратів РНК з низькомолекулярними лігандами та їх лікувальна ефективність» (номер державної реєстрації – 0115U005603, 2015-2019 рр.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих в дисертації. Дисертаційна робота Н.С. Мельнічук є достатньою та базується на детальному аналізі літературних джерел за проблемою, що вирішувалась в ході виконанні даної роботи, коректно визначених мети та постановці задач дослідження, використанні методів досліджень, аналізі результатів роботи, коректному формулюванні висновків дисертації. Обґрунтованість і достовірність результатів досліджень, отриманих в рамках дисертаційної роботи, підтверджено апробацією на семінарах та конференціях, а також публікаціями статей у наукових фахових виданнях та статей у журналах, що входять до міжнародної наукометричної бази SCOPUS.

Новизна наукових положень, висновків і рекомендацій. Зміст дисертаційної роботи свідчить про системний підхід до проведення досліджень, наявність наукових результатів, висновків і пропозицій, що в сукупності можуть бути важливими для вирішення наукової проблеми, яка полягає у визначенні можливих механізмів протигрипозної та протизапальної дії ОРН. Науковими результатами дисертації є пригнічення інфекційності вірусу грипу шляхом блокування НА-гліканової взаємодії, та наведено нові дані щодо сумарної флуоресценції гемаглютиніну вірусу грипу, а також показано неспецифічну низькоафінну взаємодію ОРН та ОРН-D-M з НА. Було показано, що через 48 год після інфікування вірусом грипу A/Fort Monmouth/1/1947 (H1N1) у легенях мишей BALB/c підвищується експресія генів *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8*, *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifna2*, *Ifnb1*, *Ifnγ*, *Il6*, *Il1b*, *Il12a*, *Tnf*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*. Виявлено, що препарати ОРН та ОРН-D-M при профілактиці та лікуванні інфекції грипу знижують грип-індуковану надекспресію генів *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8*, *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifna2*, *Ifnb1*, *Ifnγ*, *Il6*, *Il1b*, *Il12a*, *Tnf*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Xdh*, *Nos2*, *Arg2* у легенях мишей BALB/c, та показано, що самі препарати ОРН та ОРН-D-M не впливають на профілі експресії цих генів вродженого імунітету.

Автором запропоновано механізм ослаблення надмірної імунної відповіді на вірус грипу ОРН шляхом пригнічення гіперекспресії мРНК *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8*, що призводить до перешкоджання підвищення експресії TLR-стимульованих генів вродженого імунітету.

Практичне значення результатів дисертаційного дослідження. Представлені дослідження поглиблюють розуміння механізму дії природних ОРН проти вірусу грипу. Отримані результати модуляції вродженої імунної відповіді терапевтичними олігорибонуклеотидами шляхом впливу на Toll-подібні рецептори розкривають розуміння нормалізації компонентів вродженого імунітету (наприклад цитокиновий профіль) при гострому токсичному ураженні печінки, цукровому діабеті II типу, ВІЛ інфекції,

гострому інфаркті міокарда. Крім того, низькоафінна взаємодія ОРН з глікопротеїном вірусу грипу розкриває уявлення щодо механізму противірусної дії ОРН проти широкого спектру вірусів, що має практичне застосування. Отримані результати щодо змін експресії генів вродженого імунітету за дії грипу та ОРН стали підґрунтям для розробки тест-системи для аналізу експресії генів уродженого імунітету.

Повнота викладу в опублікованих працях положень, висновків, рекомендацій. Основні положення та результати досліджень достатньо повно викладено у 17 наукових працях, з них 4 статті у виданнях, що входять до наукометричної бази SCOPUS, 1 стаття у фаховому журналі та 12 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних та міжнародних наукових конференцій: CYS Conference for young scientists (Київ, 2015); The 8th International conference bioresources and viruses (Київ, 2016); The 2nd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry» (Online, 2016); X Parnas Conference Young Scientist Forum „Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine” (Вроцлав, Польща, 2016); V Науково-практична конференція школи молодих науковців ПАТ «Фармак» (Київ, 2017); The 7th International Weigl Conference (Львів, 2017); The 3rd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (Online, 2017); Міжнародна конференція молодих вчених «XI Parnas Conference» (Київ, 2018); VI науково-практична конференції школи молодих науковців ПАТ «Фармак» (Київ, 2018); XII український біохімічний конгрес (Тернопіль, 2019).

Загальна характеристика структури та змісту роботи за розділами:

У Вступі представлено актуальність теми дисертаційної роботи, її важливість, а також сформульовано мету і задачі дослідження. Крім того, обґрунтовано наукову новизну отриманих результатів, їх практичне значення, визначено особистий внесок дисертанта, подано інформацію про апробацію результатів дисертаційної роботи та посилання на публікації за темою дисертаційної роботи.

Перший розділ дисертації складається з 3-х підрозділів у яких автор проаналізував більшість вагомих літературних першоджерел за темою дослідження. У першому підрозділі «Вірус грипу та особливості патогенезу грипозної інфекції» автор описала сучасні уявлення про вірус грипу, патогенез інфекції вірусу грипу та НА. Охарактеризовано систему вродженого імунітету як неспецифічний захист проти вірусу грипу, детально проаналізувала TLR-асоційовану імунну відповідь на вірус грипу, роль NF-κB, цитокінів та вільних радикалів під час грипу. Також автор навела літературний огляд терапевтичних олігонуклеотидів, де широко описала характеристику та властивості ОРН та ОРН-D-M. Розділ добре ілюстровано графічним матеріалом.

У другому розділі «матеріали та методи досліджень» описано методики та методи, які застосовувалися під час виконання дисертаційного дослідження. Зокрема для виконання роботи автор використала МТТ-тест, аналіз TCID₅₀, реакцію гемаглютинації, флуоресцентну спектроскопію, ПЛР у режимі реального часу, вестерн-блот, оцінка вмісту ПОЛ та інші методи лабораторних досліджень. Також в розділі більш детально охарактеризовано методики впливу ОРН на життєздатність клітин під час грипозної інфекції, інфекційний та гемаглютинуючий титр вірусу грипу, титр та флуоресценція НА та гіперекспресію генів вродженого імунітету спричинену вірусом грипу використовуючи модель грипозної пневмонії у мишей за профілактичною та лікувальною схемами застосування препарату.

У третьому розділі «Результати експериментальних досліджень» представлено результати власних досліджень у 2 підрозділах. Перший підрозділ містить результати дослідження впливу ОРН та ОРН-D-M на інфекційність вірусу грипу *in vitro* та включає 4 пункти, у яких показано пряму інактивуючу дію ОРН на вірус грипу A/FM/1/47/H1N1, яка проявлялася у інгібуванні цитопатичної дії вірусу грипу у клітинах MDCK. Зниження інфекційного титру вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1 препаратами ОРН та ОРН-D-M. Автор показала, що ОРН та ОРН-D-M знижують

активність НА вірусу грипу, що призводить до перешкоджання гемаглютинін-гліканової взаємодії. Використовуючи ізольований НА, показано тривалу взаємодію між НА і ОРН, ОРН-D-M з доволі низькою афінністю, що призводить до зниження активності НА.

У другому підрозділі описано результати модуляції грип-індукованої гіперекспресії генів вродженого імунітету препаратами ОРН та ОРН-D-M *in vivo*, який містить 6 пунктів. Автор дослідила, що вірус грипу штаму A/FM/1/47/H1N1 індукує гіперекспресію мРНК *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifna2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il6*, *Il1β*, *Il12α*, *Tnfa*, *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8* у тканинах легенів мишей. Вперше показано підвищену експресію мРНК *Ifnε*, *Ifnk* за умов грипу у тканинах легенів мишей. Виявлено, що введення ОРН та ОРН-D-M мишам за профілактичною та лікувальною схемами знижує рівні мРНК генів *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifna2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il6*, *Il1β*, *Il12α*, *Tnfa*, *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8*, транскрипція яких була індукованою вірусом грипу. Ослаблення гіперекспресії *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Xdh*, *Nos2* терапевтичними олігорибонуклеотидами спостерігалось також на рівні трансляції. Вперше показано, що інгібування індукції рівнів мРНК деяких генів вродженого імунітету у відповідь на вірус грипу суттєвіше за умови профілактичної схеми дії ОРН та ОРН-D-M на вірус грипу.

У четвертому розділі «Аналіз та узагальнення результатів» проведено аналіз отриманих результатів у ході виконання дисертаційної роботи. Автор у даному розділі зводить усі результати та аналізує їх, порівнюючи з літературними даними та висловлює власні міркування. Автором запропонована гіпотетична модель впливу олігорибонуклеотидів на інфекційність вірусу грипу та TLR-асоційовану імунну відповідь на вірус грипу. Було висунуто припущення, що серед природних олігорибонуклеотидів є послідовності, які зв'язуються з НА і змінюють його конформацію та активність, що призводить до зниження інфекційності вірусу

грипу, а також послідовності, які зв'язуються з Toll-подібними рецепторами ослаблюючи надмірну вроджену імунну відповідь.

Завершується робота **висновками**, які впливають зі змісту роботи, є логічними, і такими що відображають основні результати дисертаційної роботи. Виходячи з аналізу основної частини дисертації, можна дійти висновку, що мета дисертаційної роботи в ході виконання дослідження була досягнута, а дисертація є завершеною науковою кваліфікаційною працею.

В авторефераті з оптимальною докладністю відображено зміст усіх розділів дисертації, її наукові положення та висновки.

Зауваження та дискусійні положення дисертаційного дослідження.

У дисертації мають місце окремі орфографічні та стилістичні помилки, які, однак не перешкоджають сприйняттю результатів роботи, не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи у розв'язанні важливого наукового завдання щодо вивчення впливу ОРН на активність НА вірусу грипу та експресію генів вродженого імунітету за умов грипу.

У цілому позитивно оцінюючи роботу, слід звернути увагу на окремі положення дисертаційної роботи, що потребують додаткового обґрунтування або пояснення.

1. Не досить ґрунтовно описано характеристику досліджуваних олігорибонуклеотидів у дисертаційній роботі.

2. У дисертаційній роботі не було детально описано механізм проникнення екзогенних олігорибонуклеотидів у живі клітини. Тому виникає запитання чи можуть глікани поверхневих рецепторів клітини бути спільними для вірусу грипу та екзогенних олігорибонуклеотидів?

3. Чи було проведено порівняльне дослідження протигрипозної дії природніх олігорибонуклеотидів з стандартними протигрипозними препаратами?

Загальна оцінка роботи і відповідність встановленим Вимогам.

Зауваження, подані вище, не впливають на загальну оцінку наукової новизни і висновків дисертації. Подана до захисту дисертація Мельнічук Н.С. є оригінальним і завершеним науковим дослідженням. Результати роботи є новими. Аналіз публікацій дисертанта показує, що основні результати дисертації були отримані здобувачем самостійно. Результати досліджень апробовано на міжнародних та українських конференціях. Автореферат адекватно та повно відображає зміст дисертації. За актуальністю теми, рівнем та обсягом виконаних досліджень, науковою новизною та практичним значенням отриманих результатів дисертаційна робота “Вплив олігорибонуклеотидів на інфекційність вірусу грипу *in vitro* та грип-індуковану експресію генів вродженого імунітету *in vivo*” повністю відповідає вимогам щодо кандидатських дисертацій п.11 «Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567 (зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України №656 від 19.08.15), а її автор, Мельнічук Наталя Сергіївна, заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент

Завідувач лабораторії імунобіології

Інституту біохімії імені О. В. Палладіна

НАН України

доктор біологічних наук, професор

Д.В. Колибо

