

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Кудрявцева Александра Николаевича

«Генетически модифицированные целентеразин-зависимые люциферазы в иммуноанализе вируса клещевого энцефалита» по специальности

1.5.6. Биотехнология на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Актуальность темы

Разработка нового метода диагностики вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) имеет важное значение для развития биотехнологии, медицины, вирусологии и др. Эпидемиологическая ситуация относительно ВКЭ характеризуется ростом заболеваемости как России, так и за рубежом. Клинически заболевание проявляется лихорадкой, интоксикацией, поражением головного, спинного мозга и даже может закончиться летальным исходом. Люди и животные заражаются ВКЭ через укусы иксодовых клещей, ареал которых находится в лесной и лесостепной зоне Евразийского континента. В рутинной лабораторной практике для диагностики ВКЭ используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией и серологический анализ. В настоящее время нет метода, который бы удовлетворял требованиям высокой чувствительности, специфичности, скорости обнаружения, достоверности диагностики с минимальными временными и материальными затратами. Поэтому тема диссертационной работы Кудрявцева А. Н., посвященная применению генетически модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз при проведении иммуноанализа вируса клещевого энцефалита, является **актуальной и своевременной**.

Цель работы - создание систем биолюминесцентного иммунологического микроанализа вируса клещевого энцефалита в клещах с

использованием преимуществ репортеров на основе ряда генетически модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз.

Для достижения поставленной цели автор сформулировал четыре задачи:

1. Разработать способ получения целевых репортерных белков – гибридных производных генетически модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз, изучить их свойства как потенциальных репортерных белков для выявления ВКЭ биolumинесцентным иммуноанализом.

2. Разработать способ выявления ВКЭ в клещах гетерогенным биolumинесцентным иммуноанализом с использованием гибридного производного генетически модифицированной люциферазы *Renilla muelleri* в качестве метки и оценить пригодность этого способа для тестирования природных клещей.

3. Разработать способ выявления ВКЭ в клещах гомогенным биolumинесцентным иммуноанализом на основе гибридных производных искусственной люциферазы NLuc и исследовать возможности его применения для экспрессного тестирования природных клещей.

4. Разработать готовый к использованию лиофилизированный реагент, включающий все компоненты реакционной смеси, для однофазного биolumинесцентного иммуноанализа ВКЭ в клещах.

Диссертационная работа обобщает результаты научных исследований, выполненных при поддержке: Российского фонда фундаментальных исследований и Красноярского краевого фонда научной и научно-технической деятельности (проект № 16-44-240648); Сибирского отделения Российской академии наук в рамках Междисциплинарного интеграционного проекта № 139 и государственного бюджета, выделенного на фундаментальные исследования в Российской академии наук: проекты № VI 57.1.1, № 0356-2016-0712 и № 0287-2022-0002.

Научная новизна. Впервые получены и исследованы свойства ряда новых функциональных гибридных белков. Установлена перспективность их использования для быстрого выявления ВКЭ микропланшетным билюминесцентным иммуноанализом. Разработан и испытан способ тестирования клещей однофазным билюминесцентным иммуноанализом, пригодный для использования во внелабораторных условиях. Получен готовый к использованию лиофилизированный реагент, позволяющий одностадийно выявлять наличие ВКЭ в экстракте клеща.

Публикации. Результаты научно-исследовательской работы доложены на международных, всероссийских и региональных конференциях. По теме диссертации опубликовано 15 работ, в том числе: 7 статей в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных изданий и журналов (Scopus, WoS, Белый список) и рекомендованных ВАК; 4 патента РФ, а также 8 публикаций в сборниках докладов научных конференций, которые в полной мере освещают основные положения диссертации. Все статьи опубликованы в журналах, соответствующих заявленной специальности.

Объекты исследования. ВКЭ, антитела к ВКЭ, иксодовые клещи, гибридные белки, целентеразин.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 124 страницах машинописного текста и содержит: введение, обзор литературы, описание методов исследования, изложение результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы (172 источника, из них 163 иностранных). Диссертационная работа содержит 7 таблиц и 40 рисунков.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования от постановки задач, проведения экспериментов и анализа полученных результатов до подготовки публикаций.

В первой главе приводится тематический обзор научной литературы о функционирование биолюминесцентных систем. Автором подробно описан процесс биолюминесценции, который заключается в химической реакции между молекулой целентеразина (люциферина) и ферментом люциферазой в присутствии кислорода. Диссертантом представлены данные, обосновывающие использование генетически модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз в иммуноанализе вируса клещевого энцефалита. Показано, что люциферин циклически окисляется люциферазой в результате чего образуются возбуждённые молекулы оксилуциферина, которые испускают свет. Литературный обзор написан достаточно грамотно, содержит самые современные сведения о проблемах диагностики вируса клещевого энцефалита, свидетельствует о том, что диссертант ориентируется в современной литературе по рассматриваемым вопросам и логично обосновывает необходимость и актуальность данного исследования.

Во второй главе представлен широкий перечень основного и вспомогательного оборудования, средств измерений, а также реактивов с указанием производителя, качественных и количественных характеристик. Часть препаратов получены от коллег и из организаций России, из США получены плазмиды и синтетический целентеразин. В качестве антигена использовали ВКЭ из вакцины Клещ-Э-Вак производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН (Россия). Экстракты природных клещей получены от Центра гигиены и эпидемиологии Красноярского края. Цельные клещи для исследований предоставлены добровольцами, а также работниками ветеринарных клиник г. Красноярска. В главе также представлены в развернутом виде 17 методик, которые использовал автор в своей работе для достижения цели, например, наработки в препаративном количестве целевых гибридных миниантител sc14D5a и люциферазы Rm7, гибридных белков, включающих иммуногенный домен

капсидного белка E ВКЭ (prED3) и фрагменты искусственной люциферазы (NLuc). Нарботку осуществляли на базе рекомбинантных клеток *E. Coli*.

Глава в полном объеме отражает методическое и инструментально-лабораторное обеспечение представленной диссертации.

Третья глава посвящена результатам и обсуждению. Среди них:

1. Разработан способ получения высокоочищенных гибридных белков, включающих домены одноцепочечного анти-ВКЭ-миниантитела либо антигенной детерминанты вируса и домены целентеразин-зависимых люцифераз: генетически модифицированной люциферазы Rm7, либо фрагментов искусственной люциферазы NLuc.

2. Показано, что во всех гибридных белках домены образуют реакционно способные пространственные структуры, сохраняя специфические свойства исходных белков: анти-ВКЭ-миниантитело во всех гибридных белках связывает ВКЭ-ассоциированные антигены с аффинностью, близкой к таковой исходного миниантитела; домен люциферазы Rm7 термостабильный вариант люциферазы мягкого коралла *Renilla muelleri* обладает субстрат-зависимой биолюминесценцией; домены фрагментов люциферазы NLuc комплементируют с восстановлением субстрат-зависимой биолюминесценции при образовании комплексов между доменами антитела и антигена.

3. Показано, что гибридный белок (14D5a-Rm7) термостабильный вариант люциферазы мягкого коралла *Renilla muelleri* является высокочувствительным репортером для иммуноанализа ВКЭ. Разработан способ выявления ВКЭ твердофазным микроанализом в клещах; протестированы экстракты более чем 1500 природных клещей, диагностическая чувствительность и специфичность анализа соответственно составили 100% и 98,9%.

4. Получена пара гибридных белков, пригодных для высокочувствительного выявления ВКЭ однофазным конкурентным

иммуноанализом. Разработан дизайн анализа для тестирования природных клещей. Биотест достоверно разделяет группу «здоровых» и ВКЭ-инфицированных клещей

5. Разработаны условия хранения компонентов биолюминесцентного выявления ВКЭ твердофазным иммуноанализом сэндвич-типа (поверхностно активированные планшеты, лиофилизированный биолюминесцентный гибридный белок 14D5a-Rm7), при которых не меняются поверхностные свойства планшет и бифункциональные свойства гибридного белка.

6. Получен и успешно испытан готовый к использованию лиофилизированный реагент «Все в одном», включающий образцы положительного и отрицательного контролей и рабочий образец, для выявления ВКЭ в клещах однофазным биолюминесцентным анализом конкурентного типа.

Практическая направленность работы не вызывает сомнений. Все полученные результаты могут быть использованы для создания отечественных высокоэффективных и чувствительных биолюминесцентных диагностикумов для выявления ВКЭ в клещах в клинико-диагностических лабораториях, в стационарах или в полевых условиях. Предложенный подход однофазного анализа на основе комплементации фрагментов люциферазы NLuc может быть использован для детекции других молекулярных мишеней путем замены биоспецифических доменов гибридных белков-репортеров.

Автор выносит на защиту следующие четыре положения.

1. Разработаны способы получения высокоочищенных препаратов, генетически-модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз, генетически слитых с иммуноглобулинами или антигенами, изучены свойства этих гибридных белков как репортеров для иммуноанализа ВКЭ.

2. Биолюминесцентный твердофазный иммуноанализ ВКЭ в клещах на основе гибридного белка, генетически модифицированной люциферазы (Rm7) и миниантитела (sc14D5a) позволяет выявлять вирус с диагностической чувствительностью 100% и специфичностью 98,9%.

3. Однофазный конкурентный биолюминесцентный иммуноанализ ВКЭ на основе комплементации фрагментов искусственной люциферазы (NLuc) позволяет достоверно выявлять вирус в инфицированных природных клещах ($p=0,000013$, $N=86$).

4. Разработан и успешно испытан готовый к использованию лиофилизированный реагент, включающий все компоненты для однофазного биолюминесцентного иммуноанализа ВКЭ в клещах.

Замечания к диссертационной работе

1. Кто, как и в каких условиях работал с добровольцами? Выполнялись ли этические принципы защиты достоинства, права, безопасности и благополучия участников исследований?

2. В тексте диссертации и в автореферате автор указывает 15 опубликованных работ в изданиях, но приводит при этом – 7 статей, 4 патента и 8 тезисов?

3. Приводятся результаты измерений с указанием доверительных интервалов, например, Рис. 3.14, Рис. 3.13, Рис. 3.18, однако развернутая описательная статистика отсутствует, что затрудняет критическую оценку данных.

4. Отсутствует анализ вклада погрешностей, системных ошибок измерительных приборов в экспериментальные результаты. Результаты измерений без указания абсолютной или относительной погрешности позволяют относить их только к аналитическим оценкам.

5. Вывод о 100 % диагностической чувствительности ВКЭ твердофазным микроанализом не корректен, он противоречит положениям фундаментальной математической статистики.

6. По тексту диссертации встречаются орфографические ошибки и стилистические погрешности, например, на стр. 76, третья строка снизу «Высокопроизводительных – Высокопроизводительный». По всему тексту в предложениях диссертации и автореферата используются слова «был, было, были», что избыточно для глагола в прошедшем времени.

7. В разделе «Содержание» на стр. 2, Глава 2 имеет название «Материалы и методы исследования», но в тексте диссертации Глава 2 на стр. 43 – название сокращено – «Материалы и методы».

Высказанные замечания и вопросы не являются критическими, носят дискуссионный характер и не снижают научно-практическую ценность диссертации.

Заключение

Таким образом, диссертация Кудрявцева Александра Николаевича на тему «Генетически модифицированные целентеразин-зависимые люциферазы в иммуноанализе вируса клещевого энцефалита», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук является законченным научным трудом. Работа имеет существенное значение для развития биотехнологии, вирусологии, медицины, микробиологии, эпидемиологии и др. В ней сформулированы теоретические положения и практические результаты, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в развитии направления – создание систем биолюминесцентного иммунологического микроанализа вируса клещевого энцефалита в клещах с использованием преимуществ репортеров на основе ряда генетически модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз, что имеет важное теоретическое и практическое значение.

Отмеченные замечания диссертационной работы носят технический характер, не затрагивают новизны, практической значимости научных результатов.

В соответствии с выше сказанным, рецензируемая диссертация Кудрявцева Александра Николаевича является законченной научно квалификационной работой и **соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14** «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

Генералов Владимир Михайлович,

доктор технических наук, 05.11.17 – Приборы, системы и изделия медицинского назначения,

ведущий научный сотрудник Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «ВЕКТОР» Роспотребнадзора.

Контактные данные: 630559, Россия, Новосибирская область, р.п. Кольцово.

Тел: 8 [REDACTED] 73, Эл. почта: g [REDACTED] nsc.ru

“ 12 ” января 2026 г. [REDACTED] Генералов В.М.

Подпись Генералова В.М. заверяю:

Ученый секретарь, кандидат биологических наук

“ 13 ” января 2026 г. [REDACTED] Прыткова О.В.

