

ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата биологических наук,

Матвеева Андрея Леонидовича на диссертацию

Кудрявцева Александра Николаевича

«ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ В ИММУНОАНАЛИЗЕ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА»

представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология

Актуальность диссертационной работы.

В настоящее время создание новых высокочувствительных и специфичных аналитических систем для мониторинга зоонозных инфекций является важной задачей для здравоохранения. Одной из наиболее опасной и значимой зоонозной инфекцией для Российской Федерации является вирус клещевого энцефалит. Несмотря на имеющуюся эффективную и доступную отечественную вакцину для профилактики клещевого вирусного энцефалита количество вакцинированных в Российской Федерации остается на достаточно низком уровне, около 10%. Экстренная профилактика клещевого энцефалита для не вакцинированных укушенных пациентов, включает введение препарата сывороточного иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита. Однако применение этого препарата сопряжено с биологическими рисками и часто не рекомендуется. Применение этого препарата оправдано в первые 72 часа после укуса. При этом стандартное время до получения анализа о наличии вируса клещевого энцефалита в клеще при его сдаче в пункте сдачи клещей в крупной населенном пункте составляет не менее 48-72 часа, при его транспортировке из отдаленных районов 120 часов. Известно, что в среднем носителями вируса клещевого энцефалита являются лишь 1-10 % клещей. В связи с этим возникает необходимость раннего выявления вируса у клещей, в том числе в отдаленных районах что могло бы существенно снизить вероятность возможных осложнений, связанных с необоснованной иммунопрофилактикой, и стать основой для своевременного терапевтического вмешательства и госпитализации пациентов. По этой причине разработка рутинных методов диагностики, обеспечивающих быстрый и достоверный анализ, в том числе в внелабораторных условиях, остается актуальной. В диссертации Кудрявцева А. Н. предложены новые подходы для детекции вируса клещевого энцефалита с использованием генетически модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз, слитых с высокоаффинным одноцепочечным антителом к домену 3 гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита.

Таким образом тема диссертации действительно актуальна, полученные данные несомненно будут важны для разработки новых экспресс диагностических наборов для выявления вируса клещевого энцефалита.

Научная новизна работы и практическая ценность результатов, полученных в работе

В работе Александра Николаевича впервые созданы бифункциональные репортерные белки, сочетающие биоспецифичные домены моноклонального антитела против домена 3 гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита люциферазой или её фрагментами. Изучены их характеристики, показана их перспективность для быстрого выявления вируса клещевого энцефалита микропланшетным биолюминесцентным иммуноанализом. На основе гибридного белка sc14D5a-Rm7 разработан протокол твердофазного иммуноанализа для детекции вируса клещевого энцефалита в клещах, который успешно прошёл многолетние полевые испытания на клещах, снятых с домашних животных и людей.

Создана однофазная конкурентная тест-система для детекции ВКЭ. Получен готовый к применению реагент, содержащий контрольные и рабочие смеси гибридных белков и субстрат люциферазы. Апробация на модельных и природных образцах подтвердила специфичность и чувствительность созданной тест-системы.

Полученные в диссертации результаты могут быть использованы для создания отечественных высокочувствительных биолюминесцентных тест-систем для выявления вируса клещевого энцефалита в клещах, применимых как в лабораторных, так и в полевых условиях. Предложенный метод однофазного анализа, основанный на комплементации фрагментов люциферазы NLuc, является универсальным: замена биоспецифичных доменов позволяет адаптировать его для детекции других мишеней.

Структура и общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 124 страницах машинописного текста и включая 7 таблиц и 40 рисунков. Она состоит из следующих разделов: «введение», «генетически модифицированные целентеразин-зависимые люциферазы как репортёры в иммуноанализе обзор литературы», «материалы и методы исследования», «результаты и обсуждения», «закключение», «выводы», «список сокращений» «список цитируемой литературы». Список литературы содержит 172 библиографические ссылки.

В главе 1 приведен обзор литературы посвящённый целентеразин-зависимым люциферазам описаны структурно-функциональные особенности целентеразин-зависимых биолюминесцентных систем; приведены современные данные о рекомбинантных люциферазах Renilla, Metridia и Gaussia для применения в качестве репортёра в *in vitro* анализе. Описаны современные данные об применении искусственной люциферазы NanoLuc в различных вариантах в качестве репортёра *in vitro*. Раздел написан ясным научным языком и охватывает множество различных материалов по теме исследования.

В разделе «материалы и методы» подробно описаны все используемые материалы и процедуры при проведении исследования. Раздел «результаты и

обсуждения» занимает большую долю в общем тексте диссертации и поэтапно описывает как были получены результаты, представленные в диссертации.

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов

Достоверность результатов определяется применением адекватных современных методик для проведения экспериментов и анализа полученных данных. Проведенный статистический анализ полученных данных также подтверждает достоверность полученных данных. Сделанные выводы, несомненно, являются обоснованными и логичными и опираются на полученные в диссертации данные и не противоречат литературным данным.

По теме диссертации было опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах, в том числе 3 статьи в Q1 журналах, входящий в перечень ведущих рецензируемых научных изданий и журналов, рекомендуемых ВАК и получено 4 патента РФ. Результаты диссертации представлены в виде докладов на восьми международных и всероссийских конференциях.

Замечания и предложения

В результате прочтения работы возникли небольшие замечания и вопросы, имеющие технический или дискуссионный характер, которые не снижают научную значимость исследования и не уменьшают общего положительного впечатления от диссертационной работы.

Из литературы известно, что родительское антитела 14D5 имеет разные константы аффинности к гликопротеинам E разных субтипов клещевого энцефалита, различающиеся в 10 и более раз. Поэтому возникли следующие вопросы:

Определяли ли генотип вируса клещевого энцефалита в положительных клещах?

Каким генотипом (генотипами) были искусственно заражены клещи, исследуемые в работе?

Из текста работы также не совсем ясно, в том числе из этой фразы: «Цельные клещи для исследований предоставлены добровольцами, а также работниками ветеринарных клиник г. Красноярска» из каких клещей готовили экстракты для выявления вируса клещевого энцефалита. Известно, что домашних животных в основном кусают клещи рода *Dermacentor*, которые редко переносят клещевой энцефалит. Были ли определены виды клещей в которых выявляли вирус клещевого энцефалита? Вероятно 10 ложноположительных клещей можно просто исключить из анализа или наоборот, показать лучшую чувствительность, чем у коммерческого набора.

Еще одним интересующим вопросом является каким образом авторы предполагают применять свой метод в полевых условиях и труднодоступных местах?

Заключение.

Таким образом, диссертация Кудрявцева Александра Николаевича на тему «ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ В ИММУНОАНАЛИЗЕ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи по созданию новых диагностических инструментов для детекции вируса клещевого энцефалита, 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, Кудрявцева Александра Николаевича, заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Официальный оппонент:

Матвеев Андрей Леонидович,
кандидат биологических наук (03.01.03 – молекулярная биология),
заведующий лабораторией противомикробных препаратов,
ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского
отделения Российской академии наук (ФГБУН ИХБФМ СО РАН)
630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8
телефон: 8 (383) 363-51-57,
e-mail: g[redacted]@mail.com


(подпись)

1 *Матвеев А.Л.*
(расшифровка подписи)

Дата «21» января 2026 г.

Подпись к.б.н. Матвеев А.Л. заверяю
Зам. директора ФГБУН ИХБФМ СО РАН
телефон: 8 (383) 363-51-55
e-mail: secretart@niboch.nsc.ru



к.х.н. Пестряков П.Е.