

**ВІДГУК**  
**офіційного опонента – кандидата біологічних наук старшого наукового співробітника відділу онкогематології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України**  
**Завелевича Михайла Петровича**  
**на дисертацію Мельнічук Наталії Сергіївни "Вплив олігорибонуклеотидів на інфекційність вірусу грипу *in vitro* та грип-індуковану експресію генів вродженого імунітету *in vivo*", подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук із спеціальності 03.00.03 – молекулярна біологія**

**Актуальність теми дослідження**

Актуальність теми дисертації не викликає сумнівів, оскільки питання, які піднімаються дисертантом, знаходяться на передньому краї досліджень у сучасній біології та теоретичній медицині. Особливо актуальним пошук противірусних засобів стає зараз у часи пандемії коронавірусу.

Хоча вакцинація являє собою "першу лінію захисту" проти грипозної інфекції, мінливість антигенів вірусів грипу змушує змінювати склад вакцин щороку. Вважається також, що існуюча стратегія розробки протигрипозних вакцин не зможе спрацювати в разі не прогнозованого виникнення пандемічних штамів. Пошук універсальної вакцини, яка була б дієвою проти різних штамів вірусу грипу (до речі, спрямованої проти консервативних ділянок гемаглютиніну), поки що знаходиться на стадії розробки. До речі і ефективність існуючих вакцин проти вірусів грипу є далеко не стовідсотковою.

Щодо хіміотерапії грипу, то існуючі зареєстровані препарати є в тій чи іншій мірі ефективними проти певних штамів вірусу і діють вони або на реплікацію вірусу в клітині (це класичний варіант хіміотерапії вірусних інфекцій, який ґрунтується на суттєвій різниці клітинних та вірусних ферментів реплікації), або на вихід вірусу з клітини (інгібітори нейрамінідази). Останнім часом активно досліджується й резистентність вірусів грипу щодо існуючих препаратів, і вже з'явилися повідомлення про комбіновану резистентність проти препаратів обох існуючих класів. З багатьох причин дуже важливим є розробка препаратів, які перешкоджають не тільки саме реплікації вірусу грипу та його вивільненню, а й надходженню вірусу грипу до клітини.

Якщо гемаглютиніни вірусу грипу є основним компонентом багатьох вакцин, то чому ж серед зареєстрованих препаратів немає таких, які б були спрямовані проти цього компоненту віріону?

За даними літератури у світі ведуться активні пошуки речовин, які б інгібували процес мембранного злиття при інфекції клітин вірусом грипу, опосередкованого гемаглютиніном. Здебільшого це низькомолекулярні сполуки типу бензохінонів та гідрохінонів, а також інгібітори протеаз. Але в літературі не було відомостей щодо такої дії олігорибонуклеотидів та їхніх похідних, хоча в окремих публікаціях повідомляється про ефективне зв'язування нуклеїнових аптамерів з гемаглютинінами вірусу грипу. Невідомими лишаються і механізми інгібування опосередкованих гемаглютинінами процесів. Слід зазначити, що останнім часом дуже багато уваги приділяється розробці інгібіторів процесів приєднання вірусів різних класів до поверхні клітин з наступним їх проникненням всередину клітини як загальної стратегії хіміотерапії різних вірусних інфекцій, що до речі справедливо і по відношенню до корона вірусної інфекції.

Все зазначене вище свідчить про актуальність теми, розробленої дисертанткою.

Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт групи молекулярної фармакології Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. з

вивчення біологічної активності олігонуклеотидів та механізму їхньої дії та створення на основі природних олігонуклеотидів нових лікарських препаратів з протизапальною та противірусною дією. Представлена робота є логічним продовженням загальної стратегії досліджень групи молекулярної фармакології, зокрема серії досліджень препаратів на основі РНК, які знайшли своє практичне застосування. Дисертаційна робота Н.С. Мельничук присвячена дослідженню механізмів противірусної активності в аспекті прямої взаємодії олігорибонуклеотидного комплексу з вірусом грипу та його компонентами.

### **Достовірність та обґрунтованість наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації**

Достовірність та обґрунтованість викладених у дисертації наукових положень забезпечена використанням широкого спектру методів дослідження, адекватних сформульованій меті та задачам дослідження, а також застосуванню адекватних методів статистичного аналізу. Структура дисертаційної роботи логічна, матеріали розділів викладено відповідно до мети і поставлених задач.

Метою дослідження було вивчення впливу олігорибонуклеотидного комплексу на інфекційність вірусу грипу А *in vitro* та індуковану експресію генів вродженого імунітету у відповідь на інфекцію вірусу грипу *in vivo*. Автор чітко сформулювала мету та відповідні завдання, спрямовані на досягнення цієї мети.

Для виконання поставлених завдань були використані сучасні методи дослідження, зокрема культивування клітин та методи аналізу інфекційності вірусу грипу, метод флуоресцентної спектроскопії, ПЛР, імуноблот-аналіз.

Дисертаційну роботу викладено на 145 стор., проілюстровано 30 рисунками, вона містить 4 таблиці. У списку використаних літературних джерел 229 посилань.

В першому розділі подано стислий огляд літератури з питань, що стосуються теми дисертації. Детально розглянуті питання, пов'язані з інфекцією вірусу грипу та імунною відповіддю на окремі його компоненти, зокрема роль Toll-подібних рецепторів в імунній відповіді на вірус грипу. Розглянуто також, які зміни профілю цитокінів та хемокінів відбуваються в процесі грипозної інфекції. Ще один розділ присвячено аналізу олігорибонуклеотидів різних класів в плані можливої противірусної активності. Дисертант справедливо зазначає, що незважаючи на доведений широкий спектр біологічних властивостей олігорибонуклеотидів, молекулярні механізми їхньої противірусної та імуномодулюючої дії й досі залишаються невідомими. Текст розділу проілюстровано власними схемами автора. Цікавою є табл. 1.2, в якій схематично і наочно наводяться механізми дії різних типів синтетичних олігонуклеотидів. За виключенням деяких неточностей у термінології, в огляді літератури практично немає суттєвих недоліків, хіба що не зазначено вже відомі інгібітори, які перешкоджають проникненню вірусу грипу до клітини, опосередкованому гемаглютиніном. Бажано б було також зробити певне узагальнення щодо ще невіршених питань стосовно стратегії хіміотерапії грипозної інфекції.

У другому розділі дисертаційної роботи описано методи дослідження, застосовані при виконанні даної роботи. Методи описано детально із зазначенням всіх реагентів та приладів. Зокрема, детально описані методи роботи з вірусом грипу в культурі клітин та молекулярно-біологічні методи, які було застосовано для визначення рівнів експресії на рівні РНК низки генів цитокінів та хемокінів, а також генів патерн-розпізнавальних рецепторів. В розділі немає суттєвих недоліків, за винятком хіба що окремих стилістичних огріхів.

Експериментальна частина складається з двох великих фрагментів, які до речі, вдало поєднані у відповідності до загальної ідеї дослідження. Перший розділ експериментальних досліджень присвячено доказу інгібувальної активності олігорибонуклеотидів у відношенні

вірусу грипу та з'ясуванню механізмів такої активності. В комплексному дослідженні переконливо показано, що інгібувальна активність пов'язана із безпосередньою взаємодією олігонуклеотидів із позаклітинним віріоном, а саме із його гемаглютиніном. Продемонстровано як біологічні ефекти взаємодії олігонуклеотидів з вірусом, так і зміни спектрів флуоресценції гемаглютиніну в результаті такої взаємодії, які свідчили про низькоафінну взаємодію між гемаглютиніном та олігонуклеотидами або їхніми комплексами з манітолом.

Цікавим є висновок про те, що виявлена різниця ефективної дози олігорибонуклеотидів для різних штамів вірусу грипу дозволяє припустити, що досліджувані речовини взаємодіють з гемаглютинінами різних штамів вірусу з різною афінністю і це ймовірно пов'язано з амінокислотним складом рецептор-зв'язуючого регіону гемаглютиніну. Корисними у цьому відношенні були б дослідження в майбутньому методом молекулярного моделювання, оскільки дуже важливим є визначення ділянок молекул гемаглютинінів, з якими взаємодіють досліджувані препарати. До того ж при аналізі противірусної дії досліджуваного комплексу на два різновиди вірусу грипу А продемонстровано різну ефективність за зниженням інфекційного титру вірусу. Тобто, ймовірно, навіть низькоафінне зв'язування характеризується певною специфічністю, на що вказує дисертантка, хоча, зазначу, що в обговоренні цього факту слід було б приділити трохи більше уваги. Невелике зауваження до цієї частини стосується трактовки експериментів з інкубуванням гемаглютиніну з олігорибонуклеотидами впродовж різних часових проміжків. Автор вважає, що одержані дані свідчать про незворотність такої взаємодії, але мені здається, що про незворотність взаємодії могли б свідчити експерименти з інкубуванням з наступним витриманням в середовищі без олігорибонуклеотидів. Мені також здається, що більш раціонально було б розмістити підрозділ щодо противірусної дії олігорибонуклеотидів на два різновиди вірусу грипу А *in vivo* відразу ж після підрозділу, в якому показано зниження інфекційного титру вірусу в дослідах *in vitro*.

Другий великий розділ роботи стосується аналізу впливу досліджуваних олігонуклеотидів на експресію низки генів в умовах інфікування вірусом грипу експериментальних тварин. Дуже важливими є дані про те, що інфекція вірусом грипу індукує експресію генів всіх основних типів інтерферонів. при цьому самі по собі досліджувані олігорибонуклеотиди не індукують експресії генів інтерферонів (можливо через відсутність дволанцюгових структур). Разом з тим, деякі дані стосовно впливу олігорибонуклеотидів на систему інтерферону, принаймні на рівні експресії відповідних генів, є досить неоднозначними. Так, за умов грипозної інфекції індукується експресія генів всіх різновидів інтерферонів, індукується також і експресія трьох генів 2,5-олігоаденілатсинтетази, одного з основних компонентів системи інтерферону, та деяких інших генів, стимульованих інтерферонами. Разом з тим, застосування олігорибонуклеотидів тією чи іншою мірою обумовлює зниження експресії генів інтерферонів, індукованої грипозною інфекцією, хоча вплив олігорибонуклеотидів на експресію різних генів відповіді на інтерферони не є однозначним. Зауважу, що частково таку суперечливість досить цікавих результатів можна пояснити неоднаковою кінетикою активації різних генів відповіді на інтерферон та самих генів інтерферонів, неоднаковим ефектом різних доз олігорибонуклеотидів, але це звісно потребує окремого дослідження, що виходить за рамки даної роботи. Звичайно також цікавим було б зіставити ці дані з визначенням інтерферону безпосередньо за його біологічною активністю.

Аналогічна тенденція, тобто відсутність індукції олігорибонуклеотидами, значна індукція експресії за умов грипозної інфекції та її зменшення за дії олігорибонуклеотидів за умов інфекції простежується і у відношення ряду досліджуваних генів хемокінів, хоча відносні зміни є дещо меншими, аніж у випадку інтерферонів. Підводячи підсумок цим

дослідженням, слід зауважити цікавий факт відсутності активації олігорибонуклеотидами експресії всіх досліджуваних в роботі генів різних груп (в тому числі і Toll-подібних рецепторів) та практично однакову спрямованість ефектів олігорибонуклеотидів на експресію генів, індукованих за умов грипової інфекції.

Окремо слід зазначити також дослідження щодо експресії транскрипційного фактора NF- $\kappa$ B за інфекції тварин вірусом грипу та за дії досліджуваних олігорибонуклеотидів. Відомо, що активація цього фактору за інфекції вірусом грипу може як сприяти реплікації вірусу, так і інгібувати її. Хоча достеменно відомо, що вірусна інфекція активує сигнальний шлях NF- $\kappa$ B, роль NF- $\kappa$ B в реплікації вірусу на сьогодні багато в чому залишається нез'ясованою. В дисертаційній роботі показано, що олігорибонуклеотиди за обох схем застосування скасовують підвищення експресії NF- $\kappa$ B на рівні РНК, хоча на рівні білка ці зміни виражені в значно меншій мірі. Дисертантка справедливо зазначає, що такі розбіжності ймовірно пов'язані з часовими факторами.

Узагальнюючи наведені дані, дисертантка робить висновок, що, незважаючи на те, що інфекційний титр вірусу грипу у інфікованих тварин після профілактичної та терапевтичної схем застосування олігорибонуклеотидів та їхніх комплексів з манітолом залишався високим, експресія генів вродженого імунітету суттєво знижувалася, вказуючи на ефективнішу протизапальну дію досліджуваних речовин порівняно з противірусною. Такий висновок повною мірою можна віднести і до експресії генів системи інтерферону. У цьому зв'язку слід все ж зазначити, що зниження титру вірусу на два логарифми є досить суттєвим, що може бути пов'язане в першу чергу із прямою дією олігорибонуклеотидів на позаклітинний вірус. В будь-якому випадку, одержані дані вказують на неоднозначність ефектів олігорибонуклеотидів *in vivo* та *in vitro* та свідчить про необхідність системного підходу при аналізі ефектів тих чи інших противірусних агентів.

В розділі 4 дисертантка узагальнює та аналізує одержані результати. В цьому розділі послідовно викладено стислі результати відповідних розділів дослідження у зіставленні з даними літературних джерел. Принципових зауважень до розділу обговорення немає.

Висновки чітко сформульовані і відповідають поставленим в дисертації завданням.

### **Новизна та практичне значення одержаних результатів**

Аналіз змісту роботи свідчить про те, що проведене дослідження відзначається високим науковим рівнем та безсумнівно містить елементи новизни, що і було винесено автором на захист. Так, одержано нові дані щодо дії олігорибонуклеотидів на позаклітинний вірус грипу та доведено механізми інактивуючої дії цих препаратів за рахунок взаємодії з гемаглютиніном вірусу. Показано, що всі досліджувані ефекти олігорибонуклеотидів стають більш значимими в разі їхньої стабілізації манітолом. Особливо важливими є дані про зміни експресії генів системи інтерферону, деяких хемокінів та Toll-подібних рецепторів під впливом олігорибонуклеотидів, застосованих за грипової інфекції *in vivo*. Проведені дослідження сприяють розумінню механізмів противірусної та протизапальної дії олігорибонуклеотидів та їхніх комплексів. Накопичені дані безсумнівно стануть у пригоді в разі практичної розробки противірусних та імуномодуючих препаратів на основі олігорибонуклеотидів.

За матеріалами дисертації опубліковано 17 наукових робіт (статей та тез), що відображають основний зміст дисертаційної роботи, серед них 5 статей у фахових періодичних виданнях, затверджених переліком МОН України.



### **Дискусійні положення, зауваження щодо змісту дисертації та запитання до дисертанта**

Зазначу, що в цілому загальне враження від представленої дисертаційної роботи є позитивним, а зазначені вище зауваження не зменшують високої оцінки дослідження. Деякі неточності щодо презентування матеріалу були зазначені вище і частково вже були виправлені при остаточній підготовці рукопису. Робота не тільки завершує певний етап дослідження, а й ставить подальші завдання, які будуть вирішуватись у майбутніх дослідженнях, в чому безумовно також одна з її переваг.

У порядку дискусії хотілось би обговорити деякі загальні питання, які впливають як з даного дисертаційного дослідження, так і із загально біологічних міркувань щодо проблем, які підняті у цій роботі.

– Як можна пояснити, що олігорибонуклеотиди спричинюють зниження експресії генів інтерферонів, індукованої грипоною інфекцією, і чи не буде це перешкоджати прояву противірусної активності цих препаратів?

– Прохання порівняти кількісно за даними літератури і власними даними афінність взаємодії аптамерів із високою специфічністю зв'язування з гемаглютиніном та досліджуваних олігонуклеотидів із низькоафінним зв'язуванням. Які можливі переваги олігорибонуклеотидних комплексів як противірусних та імуномодуючих засобів перед синтетичними аптамерами?

– Чи Ви маєте якісь припущення відносно фізико-хімічної природи зв'язків між олігорибонуклеотидами та гемаглютиніном?

### **Загальний висновок та оцінка дисертації**

Дисертаційна робота Мельничук Наталії Сергіївни "Вплив олігорибонуклеотидів на інфекційність вірусу грипу *in vitro* та грип-індуковану експресію генів вродженого імунітету *in vivo*" є самостійною, цілісною, закінченою науковою працею. Актуальність обраної теми дослідження, обґрунтованість наукових положень та висновків, наукова новизна одержаних результатів, повнота їхнього викладу в опублікованих працях підтверджують, що автор виконала це дослідження на належному високому рівні. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів дисертація відповідає вимогам п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 р., (зі змінами, внесеними згідно Постановами Кабінету Міністрів України №656 від 19.08.2015 р., №1159 від 30.12.2015 р. та №567 від 27.07.2016 р.), які пред'являються до кандидатських дисертацій, а Мельничук Наталія Сергіївна заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

### **Офіційний опонент –**

кандидат біологічних наук  
старший науковий співробітник відділу онкогематології  
Інституту експериментальної  
патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького  
НАН України

Завелевич Михайло Петрович

