

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы ШЕКУНОВА Егора Вячеславовича на тему «Ингибиторы слияния бета-коронавирусов, обладающие липидопосредованным действием», представленной к защите в диссертационном совете 24.1.151.01 на базе Института цитологии РАН на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология»

Представленный Шекуновым Егором Вячеславовичем автореферат по диссертационной работе «Ингибиторы слияния бета-коронавирусов, обладающие липидопосредованным действием» посвящена обнаружению и характеристике механизмов действия ингибиторов слияния мембран с липид-ассоциированным механизмом действия. Существующие противовирусные препараты, большинство из которых нацелены на специфичные белковые компоненты вириона, неэффективны в отношении новых вирусных штаммов, а также обладают прочими недостатками, среди которых важнейшим является появление резистентности. Исследования по поиску новых или перепрофилированию существующих противовирусных препаратов ведутся во всем мире, однако в данной работе автор впервые осуществил комплексный анализ способности широкого спектра вторичных метаболитов растений и микроорганизмов, в частности, алкалоидов, растительных полифенолов и циклических липопептидов, подавлять слияние мембран, что позволило провести ряд оригинальных действий, направленных на выявление молекулярных механизмов, лежащих в основе их ингибирующей активности.

Автором диссертационного исследования поставлена цель – найти среди вторичных метаболитов растений и микроорганизмов соединения, обладающие способностью ингибировать слияние мембран и выявить молекулярные механизмы их действия. Для решения поставленных задач в работе автор использовал различные современные методы клеточной биологии, биохимии, молекулярной биологии и подходы с применением классических методов вирусологии. Методы и подходы являются адекватными и позволяющими получить достоверные результаты.

Шекунов Е.В. методом конфокальной микроскопии изучил способность фрагментов пептидов слияния FP инициировать слияние липосом, методом флуориметрии утечки кальцеина из липосом оценил влияние 20 видов алкалоидов, 18 полифенолов и 11 циклических липопептидов на кальций- и пептид-индуцированное слияние мембран и под действием различных индукторов. Автор также описал изменения физических и химических параметров липидного слоя под действием различных метаболитов и вероятный молекулярный механизм ингибирующего действия исследуемых метаболитов

на способность слияния мембран.

Большое значение имеет разработанная автором тест-система, имитирующая слияние β -коронавирусов с клеткой, позволяющая осуществить быстрое выявление соединений с высокой ингибирующей активностью. Среди протестированных соединений автором обнаружены агенты, подавляющие слияние везикул, индуцированное различными индукторами. Показано, что некоторые алкалоиды, полифенолы и циклические липопептиды изменяют физико-химические свойства мембран, в том числе сформированных из нейтрально и отрицательно заряженных липидов. Получены данные, свидетельствующие о взаимосвязи между способностью вторичными метаболитами модифицировать плотность упаковки липидов и их ингибирующей активностью. Кроме того, автором впервые установлено, что способность растительных полифенолов подавлять слияние мембран зависит от степени гидроксирования их фенольных колец, фланкирующих молекулу. В свою очередь, структурной особенностью циклических липопептидов, определяющих их ингибирующее действие, является длина углеводородного участка.

Обнаруженные автором агенты: пиперин, акулеацин А, анидулафунгин, итурин А и микосубтилин, демонстрирующие эффективность против SARS-CoV-2, могут быть рассмотрены для терапии COVID-19. Большой интерес представляет исследование влияния циклических липопептидов на фазовую сегрегацию бислоя, позволяющее понять антифузогенный механизм действия этих агентов.

Работа Шекунова Егора Вячеславовича подготовлена на высоком современном экспериментальном и теоретическом уровне. Текст автореферата написан информативным языком, содержит понятные таблицы, графики и фотографии, подтверждающие объективность экспериментов и показывает, что диссертационная работа Шекунова Е.В. является целостной, а исследование продуманным и выполненным досконально. Полученные Шекуновым Е.В. результаты могут быть использованы при разработке противовирусных препаратов.

Материалы диссертации отражены в достаточном количестве публикаций, как в ведущих отечественных, так и в престижных зарубежных изданиях. Апробация диссертации проводилась в ряде международных конференций, обладающих высоким уровнем компетенции в соответствующей области исследований. Выводы диссертационного исследования являются обоснованными и соответствуют экспериментальным данным.

Вместе с тем, анализируя данные работы, возникает ряд вопросов, носящие в большей степени дискуссионный характер, а также нужны уточнения и комментарии

автора:

1. Проводилась ли работа по оценке изменений исследуемых параметров – в частности изменение граничных потенциалов и анализ цитопатического действия вируса в присутствии метаболитов в динамике эксперимента? Этих данных нет в работе, а между тем динамические изменения могли бы продемонстрировать наглядно молекулярные механизмы действия метаболитов и подтвердить наличие противовирусной активности. Например, в случае с оценкой титров вируса на клеточной культуре Vero большую роль играет временная точка, выбранная для анализа – в данной работе это 72 часа – действительно среднее время после инфицирования, необходимое для реализации цитотоксического действия многих типов вирусов. Однако картина может очень сильно меняться в зависимости от суток наблюдения, вирусной нагрузки – результаты динамика вирусного титра и жизнеспособности клеток с первых до (как минимум) шестых суток после инфицирования была бы более информативной.

2. Для анализа противовирусной активности тестируемых соединений на перевиваемой клеточной культуре Vero использовали изолят 17612 SARS-CoV-2. В тексте автореферата не уточняется, откуда получен этот изолят и охарактеризован ли он по вирусологическим параметрам. Депонирован ли как штамм (в таком случае указывается номер и местодепонирования)?

3. К вопросу из пункта 2 – к какому варианту относится изолят (Альфа, Бета, Гамма, Дельта и Омикрон)? Было бы интересным и наглядным, если бы анализ противовирусной активности исследуемых метаболитов был поведен с инфицированием клеток Vero (или даже разных клеточных линий) разными вариантами штаммов SARS-CoV-2, чтобы продемонстрировать универсальность исследуемой антифузогенной активности метаболитов.

4. Титр вируса в тексте автореферата в материалах и методах указан некорректно – нужно уточнить на какой объем приходится 10^3 ТЦД₅₀. Возможно в тексте автореферата это опечатка, так как в результатах титр указан с уточнением объема.

5. Как по мнению автора возможно применять лекарственный препарат на основе растительных метаболитов для использования в медицинских целях. Если опираться на результаты анализа противовирусной активности – то имеет место исключительно профилактический эффект применения метаболитов. Как правило, оболочечные белки коронавирусов активно связываются с рецептором (ACE2 для штаммов новой коронавирусной инфекции) на поверхности клетки-хозяина, которые присутствуют не только в легких, но и ЖКТ, почках, печени, опосредуя слияние вирусной капсулы и клеточной мембраны для завершения инфильтрации. Применение метаболитов может

помешать слиянию мембран на этой стадии. Однако как только SARS-CoV-2 проникает в клетки, он может вызвать иммунную каскадную реакцию. В ответ на инфицирование вирусом развивается иммунный ответ организма, во время которого происходит активация различных клеточных сигналов, высвобождение большого количества факторов воспаления, и, затем, цитокиновый шторм. Однако неконтролируемая воспалительная реакция и иммунные нарушения могут вызвать мультиорганный иммунный патологический повреждение. Собственно многочисленные осложнения в таком случае связаны уже не с проникновением вируса в клетки - насколько препарат уже на стадии развития инфекции может быть эффективен?

Диссертационная работа «Ингибиторы слияния бета-коронавирусов, обладающие липидопосредованным действием» выполнена на актуальную тему, содержит новые и интересные данные биологов вирусологов, биохимиков, молекулярных биологов и в перспективе для медицинских работников. По значимости результатов работа соответствует требованиям, предъявленным к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 №842 в действующей редакции от 11.09.2021), а ее автор Шекунов Егор Вячеславович, несомненно, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология».

Зав. лабораторией экспериментальной онкологии
и испытания фармакологических средств
НИИ Вирусологии Федерального исследовательского
центра фундаментальной и трансляционной медицины,
старший научный сотрудник,
кандидат биологических наук

Юрченко Ксения Сергеевна

Специальность – 03.02.02. – Вирусология

Сведение об организации: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»
(ФИЦ ФТМ), 630117, г. Новосибирск, улица Тимакова, д. 2, +7(383)-274-95-80,
e-mail: xenia7yurchenko@gmail.com
тел. + 7 (913) 90865-71

«29» мая 2023 г.

