

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Мануховой Татьяны Ивановны
на тему: «Вирус мозаики альтернантеры: вирионы, вирусоподобные и
структурно модифицированные частицы, структура и свойства» по
специальности 1.5.10. Вирусология**

Работа Татьяны Ивановны Мануховой посвящена изучению структурных свойств вирионов, вирусоподобных и структурно модифицированных частиц вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт). Изучение и сравнительный анализ структуры морфологически схожих вирусных и вирусоподобных частиц вируса мозаики альтернантеры позволяют расширить наши знания о строении вирионов и вирусоподобных частиц (ВПЧ). Также эта работа открывает новую полезную информацию о морфологии и стабильности данных частиц, обеспечиваемые через РНК-белковые взаимодействия. Анализ условий термической перестройки для образования этих частиц позволяет получить дополнительную информацию о структурных особенностях вирионов ВМАльт. Исследование физико-химических свойств этих частиц, выполненное в данной работе, приводит к пониманию их потенциала для практического применения.

Растительные вирусы представляют собой перспективную цель для развития биотехнологий и медицины. Они могут быть использованы для создания вакцин, так как они не вызывают болезней у млекопитающих, распознаются иммунной системой и способны вызывать значительный иммунный ответ. Кроме того, растительные вирусы могут быть использованы для доставки лекарств к опухолевым клеткам, что позволяет снизить дозировку лекарств и улучшить их эффективность. Они также находят применение в области молекулярно-контрастной визуализации биологических процессов *in vivo*. Однако для использования вирусов и вирусоподобных частиц в биотехнологии и медицине необходимо изучить их структуру и стабильность в физиологических условиях и разработать

методику для получения и очистки вирусов в больших количествах. Таким образом, вышеизложенные факты обуславливают актуальность темы диссертационной работы.

Представленная диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из следующих основных глав: Введение, Обзор литературы, Материалы и Методы, Результаты и Обсуждение, Заключение, Выводы, Список Литературы.

Работа изложена на 149 страницах текста, содержит 8 таблиц, 34 рисунка и 1 приложение, а также список из 112 литературных источников. Работа написана хорошим языком, материал изложен логично и последовательно. В тексте практически отсутствуют ошибки и опечатки, что свидетельствует о внимательном отношении автора к своей работе.

В разделе «Введение» раскрывает следующие проблемы: Актуальность темы исследования и степень ее разработанности, Цель и задачи исследования, Объект исследования, Научная новизна, Теоретическая и практическая значимость, Личный вклад автора, Методология и методы исследования, Положения, выносимые на защиту, Степень достоверности и апробация результатов. Раздел в целом написан подробно, кроме методологии и методов работы, которые можно было бы изложить более детально.

Раздел «Обзор Литературы» занимает 39 страниц. В данном разделе автор подробно описывает объект исследования и рассматривает имеющиеся в литературе данные по структуре вирионов потексвирусов и свойств их ВПЧ. Помимо этого, в обзоре обсуждаются свойства структурно модифицированных частиц ряда вирусов растений. Раздел написан понятно и логично, важные для работы сведения обобщены в таблицы и рисунки. Обращает на себя внимание особая тщательность автора в анализе имеющихся литературных данных.

Раздел «Материалы и Методы» написан чрезвычайно подробно. Из данного раздела следует, что автор использовал широкий арсенал

молекулярно-биологических, вирусологических, биохимических и микроскопических методов. Замечаний к данному разделу практически нет, разве что в описании сред инкубации указано, что ВПЧ ВМАльт они были проинкубированы в сыворотке лабораторных животных без указания вида животного.

Раздел «Результаты и Обсуждение» занимает основной объем диссертационной работы. Раздел оформлен тщательно и аккуратно. Автором была проведена большая экспериментальная работа, требующая глубокого понимания устройства вирусных капсидов и ВПЧ. Следует отметить, что в диссертации практически все фотографий гелей и электронные микрофотографии имеют высокое качество, что свидетельствует о высоких технических навыках автора. Полученные результаты достаточно подробно критически обсуждаются в тексте, а также тщательно сравниваются с ранее полученными результатами других научных групп. В целом, все полученные результаты сомнений не вызывают. Имеются лишь минорные замечания к этому разделу:

- В разделе «1.2 Сравнение структуры ВПЧ и вирионов ВМАльт методом трипсинового теста» автор анализирует различия в структуре белковой спирали вирионов и ВПЧ ВМАльт с помощью протеолиза трипсином и обнаруживает, что ВПЧ ВМАльт менее устойчивы к протеолизу (Рис. 4). При этом не очень понятно, содержатся ли в препарате ВПЧ ВМАльт отдельные субъединицы белка оболочки. Потому что, если они там присутствуют в заметных количествах, то, конечно, они в первую очередь будут подвергаться этому протеолизу. Также было бы желательно дополнить этот эксперимент дорожкой с переваренным трипсином мономером белка оболочки ВМАльт;
- По результатам опытов по изучению стабильности белка оболочки в составе вирионов, ВПЧ и СЧ ВМАльт после лиофилизации, был сделан вывод, что «...белок оболочки ... не

деградирует после лиофилизации – дополнительных полос с более низкой молекулярной массой для лиофилизированных частиц выявлено не было.». Следует отметить, что анализ был осуществлен с помощью покраски гелей с помощью Кумасси (Рис. 26). Чувствительность этого метода не очень высока, и, строго говоря, не исключено, что белок оболочки частично деградирует, просто количество продуктов деградации не столь велико, чтобы их было видно на геле. Для повышения чувствительности можно было бы применить другие варианты окраски гелей, например, серебром. Однако, указанное замечание не является принципиальным, тем более что данный результат не был внесён в положения или выводы диссертационной работы.

- На электрофорезе (Рис.16) не указаны номера дорожек;
- В разделе «2.3 Характеристика биохимического состава СЧ, образующихся при термической перестройке вирионов ВМАльт» автор делает вывод, что «...СЧвир ВМАльт, так же, как и СЧ ВТМ и ХВК образованы исключительно БО и не содержат вирусной РНК.». Этот вывод делается на основании данных электрофореза, покрашенного бромистым этидием (Рис.16), где в соответствующей дорожке не обнаруживается полосы с РНК. На мой взгляд, следовало бы подтвердить эти данные более чувствительными методами, например, можно было бы сделать обратную транскрипцию и ПЦР в реальном времени.

Разделы «Заключение» и «Выводы» написаны лаконично и корректно, замечаний к ним нет.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова, к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.10 Вирусология (по биологическим наукам),

а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Манухова Татьяна Ивановна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,
заведующий лабораторией электронного транспорта
НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского
ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова»

Зиновкин Роман Алексеевич

Контактные данные:

тел.: +7(916)643-40-07,
e-mail: roman.zinovkin@gmail.com
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.00.06 – Вирусология

Адрес места работы:

119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40. ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
Тел.: +7(916)643-40-07; e-mail: roman.zinovkin@gmail.com

Подпись сотрудника
НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского
ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова»
Р.А. Зиновкина удостоверяю:
Заведующая канцелярии

Н.Н. Сидорова
дата