

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Вангели Сергея Валерьевича «Сравнительная ультраструктурная характеристика культур клеток, хронически инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота», представленную на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Актуальность темы диссертационного исследования Вангели Сергея Валерьевича обусловлена прежде всего тем, что до сих пор недостаточно исследованным остается клеточный уровень ретровирусных инфекций, в частности, клеточный ответ на инфицирование лимфоцитов вирусом бычьего лейкоза. Важность изучения этого этапа инфекционного процесса очевидна, поскольку хорошо известно, что только у 5 – 7 процентов животных с интегрированной в геном провирусной ДНК развиваются признаки лимфолейкоза. Актуальность таких исследований усиливается еще и тем, что изучение механизмов индукции вирусом бычьего лейкоза лимфолейкоза у крупного рогатого скота широко рассматривается как модель таких ретровирусных заболеваний у человека, как Т-лимфолейкоз, синдром приобретенного иммунодефицита.

В связи с этим важное значение имеет детальное исследование клеточного ответа на внедрение провирусной ДНК в геном хозяина и последствия для популяции клеток воспроизводства ретровирусов. Детальный анализ этих событий может позволить выделить ключевые этапы изменений структуры и функции клеток и в перспективе способствовать увеличению точности прогноза развития патологического процесса, а также разработкам, направленным на его прерывание.

В качестве цели диссертационной работы автором выделяется необходимость получения новой информации о культурально-морфофункциональных, цитогенетических и ультраструктурных особенностях клеток перевиваемых линий FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90, хронически инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Необходимо подчеркнуть, что выбранная автором модель хорошо соответствует цели исследований, поскольку принадлежность клеточных линий к разным видам, FLK-BLV - клеточные популяции почки овцы, ЛЭК-ВИЭВ-90 – клетки легкого крупного рогатого скота, потенциально может позволить выявить изменения, собственно связанные с ретровирусной инфицированностью, вне зависимости от

видовой и тканевой
Вх. № 38
12 марта 2015 г.

специфичности. Именно адекватность подобранной модели исследований обеспечивает новизну и практическую значимость полученных автором данных.

Научная новизна и теоретическая значимость выполненной работы обусловлена тем, что впервые получены сравнительные данные об ультраструктурных изменениях в клетках - продуцентах ретровирусных частиц в таких клеточных популяциях, как легочная линия крупного рогатого скота ЛЭК-ВИЭВ-90 и линия почки овцы FLK-BLV. В этих клеточных линиях впервые оценена и обнаружена выраженная кариотипическая нестабильность по анеуплоидии, описаны особенности морфогенеза вируса лейкоза крупного рогатого скота в клетках естественно восприимчивого (ЛЭК-ВИЭВ-90) и гетерологичного (FLK-BLV) видов животных, причем показано, что гетерологичная клеточная линия продуцирует в 2,5 раза больше белка gp51, чем собственно клеточная линия крупного рогатого скота ЛЭК-ВИЭВ-90, а также впервые выявлено инфицирование этих линий одновременно двумя разными РНК - содержащими вирусами, не только вирусом бычьего лейкоза, но и вирусом диареи крупного рогатого скота. Последнее обстоятельство вызывает особый интерес, поскольку свидетельствует о сниженной защищенности клеток от атак разными РНК - содержащими вирусами.

Практическая значимость результатов, полученных в диссертационной работе, затрагивает ряд аспектов и первый из них - это то, что благодаря исследованиям автора создана модель для изучения этапов продукции зрелых ретровирусов в клеточных популяциях не только разных тканей, но и видов, что позволяет получать данные, наиболее приближенные к внутриклеточным событиям, связанным с формированием собственно ретровирусов. Второй аспект практического применения полученных данных связан с возможностью получения на исследованных клеточных культурах прогнозируемого количества оболочечного гликопротеина вируса бычьего лейкоза gp51, собственно взаимодействующего с рецепторными системами клеток инфицируемого хозяина и, кроме того, на этих же культурах возможно накопление и белков вируса диареи крупного рогатого скота, контаминированность которым линий ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV выявлена автором впервые.

Таким образом, автору удалось создать модель для исследований последовательности внутриклеточных событий формирования ретровирусных зрелых частиц и их выделения, доказать возможность использования исследованных клеточных популяций для накопления белков вирусных оболочек, необходимых для получения тест-систем по выявлению животных,

несущих в периферической крови соответствующие антитела, а также для разработок соответствующих вакцин.

Диссертационное исследование соответствует паспорту специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

При подготовке диссертационной работы были использованы **современные методы** научных исследований – технологии работы с клеточными культурами, электронно-микроскопический анализ клеток со всеми этапами подготовки материала, цитогенетические методы, иммунноферментный анализ, полимеразная цепная реакция. Полученные данные соответствуют сделанным в работе выводам и не вызывают сомнений.

В диссертационной работе широко использованы современные литературные данные, опубликованные в отечественных и зарубежных научных изданиях, в которых представлены накопленные результаты исследований закономерностей инфицированности крупного рогатого скота вирусом бычьего лейкоза, методы диагностики инфицированности животных, таксономия, морфология и геномная структура самого вируса.

Результаты исследований проходили **апробацию** на научной сессии Дальневосточного отделения РАН, Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных» ФГБНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко Россельхозакадемии (г. Москва, 2006 г.), на заседаниях Ученого совета ФГБНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко в 2005г., 2014 г.

По результатам работы опубликованы 4 научные работы, в том числе 2 в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ. Автореферат и публикации соискателя отражают основное содержание диссертационной работы.

Структура и объем диссертации. Структура диссертационной работы является логичной и обоснованной. Диссертация состоит из введения, двух глав, выводов, практических предложений и списка цитируемой литературы.

Во введении обоснован выбор темы, ее актуальность, определены цель и задачи, обоснована научная новизна, практическая значимость работы, сформулированы выносимые на защиту основные положения диссертации.

В первой главе «Обзор литературы» представлена общая характеристика лейкоза крупного рогатого скота, индуцируемая вирусом бычьего лейкоза, таксономия ретровирусов и особенности структурно-функциональной организации вируса бычьего лейкоза. Последний раздел подразделен на три подраздела, в которых последовательно изложены современные литературные

данные о морфологии, геномике, репликации вируса, его культивировании и взаимодействии с клетками-мишенями, а также об имеющихся методах диагностики инфицированных вирусом бычьего лейкоза животных. Обзор литературы составлен логично, последовательно, основан на современных данных и представляет раздел, имеющий самостоятельное значение. Полагаю, что в сокращенном варианте он мог бы быть опубликован в научном издании в качестве полезной сводки информации по вопросам, связанным с особенностями вируса бычьего лейкоза.

Вторая глава «Собственные исследования» подразделена на три крупных подраздела, первый – «Материалы и методы исследований», второй – «Результаты исследований», и третий – «Обсуждение полученных результатов».

В подразделе «Материалы и методы исследований» представлены данные о методах, используемых автором в процессе исследований. Они включают методы культивирования клеток, работы с перевиваемыми клеточными линиями ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV, цитогенетического анализа, реакции иммунодиффузии выделяемого клетками антигена по отношению к стандартным антителам, подготовку исходного материала и электронную микроскопию клеток, постановку полимеразной цепной реакции для выявления провируса бычьего лейкоза с использованием стандартной коммерческой системы «ЛЕЙКОЗ» и полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием тест-системы «BD» для оценки присутствия вируса диареи крупного рогатого скота в культуральной жидкости.

Во втором подразделе, «Результаты исследований», представлены полученные автором данные при применении перечисленных методов. Подробно излагаются выявленные автором отличия по культурально-морфологическим свойствам линий ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV, результаты исследований размаха изменчивости этих линий по цитогенетическим характеристикам, по присутствию гликопротеина gp51 и провирусной ДНК вируса бычьего лейкоза. Следующая часть работы представлена электронно-микроскопическими исследованиями структур клеток, вирионов и зрелых вирусов, иллюстрированная соответствующими фотографиями, отражающими особенности клеточных органелл, кластеров и одиночных вирусов. Представлены данные использования полимеразной цепной реакции в реальном времени, позволившие автору установить присутствие в обеих клеточных линиях вируса диареи крупного рогатого скота.

Третий подраздел «Обсуждение полученных результатов» включает обсуждение полученных автором данных в сравнении с опубликованными

ранее и в современных научных публикациях. По своей сути, этот подраздел соответствует традиционному заключению по выполненной работе.

Выводы и раздел «Практические предложения» соответствуют полученным данным и логично изложены.

Диссертационная работа включает 4 таблицы, 35 рисунков, список цитируемой литературы состоит из 261 источника, в том числе 177 зарубежных авторов. Диссертация изложена на 114 страницах компьютерного текста.

Суммируя вышеизложенное, необходимо отметить, что выполненная автором работа несомненно вносит определенный вклад в развитие представлений о закономерностях формирования зрелых ретровирусных частиц на клеточном уровне, о совместимости инфицированности клеток одновременно разными ретровирусами, о цитогенетической гетерогенности клеточных линий, инфицированных вирусом бычьего лейкоза, о возможностях использования исследованных клеточных линий в качестве продуцентов оболочечных белков ретровирусов.

Тем не менее, в работе имеется ряд спорных моментов и недостатков, к основным из которых относятся следующие.

1. К сожалению, в работе отсутствует описание особенностей вируса диареи крупного рогатого скота, принадлежащего к другому семейству РНК – содержащих вирусов, чем вирус бычьего лейкоза, хотя выявление его в исследованных автором клеточных линиях является важным результатом рассматриваемой работы, который трудно недооценивать.

2. Не ясно, с какой целью автором выполнялся цитогенетический анализ клеток. Из результатов непонятно, с чем может быть связано разнообразие клеток по числу хромосом и отклонение модального числа от диплоидного набора хромосом крупного рогатого скота и овец. На фотографии метафазной пластинки (рис. 14, с.53) видно, что сама метафаза не имеет круглой формы, при наличии 52 хромосом 10 из них представлены двуплечими. В обычном кариотипе крупного рогатого скота двуплечие хромосомы типичны только для половых хромосом, следовательно, 8 хромосом этой метафазной пластинки являются результатом центрических слияний (робертсоновских транслокаций). На метафазной пластинке овцы (рис. 16, с. 54) также наблюдается избыточное количество двуплечих хромосом – должно быть не более 8-ми (три пары аутомом и одна пара половых хромосом), а на метафазной пластинке – 12. Следует ли из этого, что инфицированность клеток ретровирусами способствует центрическим слияниям хромосом?

3. Нетрадиционно представлены результаты полимеразной цепной реакции по определению присутствия провирусной ДНК в геномах обеих леточных линий. На фотографиях продуктов амплификации (рис. 18, с. 56) отсутствуют маркеры молекулярных масс, что не позволяет оценить, на каком основании рассчитывалось количество нуклеотидов в амплифицируемых фрагментах ДНК; обычно фореграммы располагаются от тартом вверх, а не вниз; в работе отсутствует расшифровка – какой именно фрагмент провирусной ДНК используется для идентификации присутствия провируса; отсутствует информация о межвидовой консервативности внутреннего контроля – участка гена альфа-актина – у крупного рогатого скота и овец.

4. Гетеро- и эухроатин имеют отношение к упаковке собственно ДНК и вряд ли уместно использовать эти термины для обозначения участков с разной плотностью в ядрышке, органелле, главным компонентом которого является рибосомальная РНК, ассоциированная с белковыми структурами, причем на препарате, неокрашенном ДНК красителями.

5. По-видимому, не следует отмечать, что: «...клеточный центр в обеих культурах встречался редко...» (с.59), поскольку это количественная оценка, при выполнении которой необходимо учитывать плоскости срезов при получении препаратов в связи с тем, что обычно centrosома в интерфазных клетках локализуется в апикальной части распластанной клетки.

6. На некоторых фотографиях в подписях наблюдаются очевидные неточности. Например, на рисунке 23 (с.59) указываются «...Мк – межклеточный контакт, Кк – клеточный контакт...», что не соответствует классификации межклеточных контактов. Или в подписи к рис.24 указано – «...Цо – цитоплазматическая оболочка...» (с.60), а на самом деле речь идет о ядерной оболочке.

7. В оглавлении и тексте встречается ряд ошибок и неточностей. Так, например, в названии подраздела 3.2.4 – « Определение наличия антигена и генома в изучаемых....» не указывается, наличие какого именно антигена и генома определяется.

Следует отметить, однако, что высказанные замечания не влияют на общую положительную и высокую оценку работы. Необходимо подчеркнуть, что рассматриваемая диссертационная работа является самостоятельным, интересным и завершенным научным исследованием.

Заключение.

Таким образом, на основании вышеизложенного анализа рукописи диссертации, представленного автореферата, публикаций автора полагаю, что рассматриваемая диссертационная работа Вангели Сергея Валерьевича

является самостоятельным и завершенным исследованием, по своей актуальности, уровням и масштабам экспериментальных исследований, теоретического анализа полученных данных, научной новизне и прикладной значимости соответствует всем требованиям ВАК России, предъявляемым к диссертационным работам, представляемым на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология и, соответственно, ее автор заслуживает присуждения ему искомой ученой степени.

Официальный оппонент,
Директор ФГБ НУ «Центр экспериментальной эмбриологии
и репродуктивных биотехнологий»
доктор биологических наук



/Г. Ю. Косовский /
10.03.2015

ФГБ НУ «Центр экспериментальной эмбриологии
и репродуктивных биотехнологий»

эл. адрес kosovsky@ceerb.ru

телефон (985) 761-45-11

127422 г. Москва, ул. Костякова, д. 12 стр.4