

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Пономаревой Евгении Павловны «Вирус клещевого энцефалита в региональных природных очагах и его изменчивость при адаптации к новому хозяину», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология

Представленная к защите работа актуальна как в прикладном, так и фундаментальном аспектах. Многочисленные природные очаги клещевого энцефалита на территории Российской Федерации, рост зон распространения заболевания, вероятность летального исхода или тяжелых неврологических осложнений, делают значимой любую новую информацию, в первую очередь с целью оптимизации подходов к вакцинации. В то же время способность вируса клещевого энцефалита адаптироваться к различным хозяевам, занимая новые экологические ниши и преодолевая видовые барьеры, может в определенной степени отождествляться с тем, что мы наблюдаем у ортомиксовирусов, коронавирусов, вируса оспы обезьян. Понимание генетических изменений, происходящих при адаптации к новому хозяину, может приблизить нас к пониманию причин этого неблагоприятного для человечества процесса.

Целью выполненного исследования явилось сравнение генетического разнообразия изолятов вируса клещевого энцефалита, выделенных в отдаленных друг от друга природных очагах, а также изучение генетических характеристик высокопатогенного варианта вируса клещевого энцефалита при адаптации его к новым хозяевам.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

- исследование структурного разнообразия нетранслируемой области геномной РНК у вариантов вируса из природных очагов клещевого энцефалита Западной Сибири, Дальневосточного региона РФ, приграничной к России Восточной Европы;

- изучение генетических характеристик изолята С11-13 вируса клещевого энцефалита, вызвавшего быстротекущую форму заболевания с летальным исходом, с целью оценки скорости и диапазона изменчивости геномной РНК и картирования аминокислотных замен при пассажах вируса в различных культурах клеток;
- определение ключевых генетических детерминант вариантов вируса клещевого энцефалита С11-13 при адаптации к новому хозяину (культура клеток – мелкие млекопитающие);
- изучение генетической изменчивости 3' – нетранслируемой области геномной РНК вируса клещевого энцефалита при смене хозяина в модельном эксперименте в культурах клеток и на лабораторных животных.

Представленная к защите диссертация изложена на 155 страницах и состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов», «Заключение и выводы», «Список литературы».

В литературном обзоре представлены современная классификация семейства Flaviviridae, таксономические и экологические характеристики вируса клещевого энцефалита. Подробно охарактеризованы его строение, геном, функции структурных и неструктурных белков, цикл репродукции. Особое внимание уделено 5' и 3'- нетранслируемым областям РНК вируса клещевого энцефалита, их регуляторным функциям процесса вирусной репликации, значению в качестве хозяин-специфических генетических детерминант флавивирусов. Представлены современные сведения о генетическом разнообразии вируса клещевого энцефалита, его дивергенции и эволюции, молекулярных основах вирулентности, способности к смене хозяев.

Глава «Материалы и методы» содержит характеристику использованных в работе природных изолятов вируса клещевого энцефалита и штаммов из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», культур клеток и лабораторных животных. Дано подробное описание методик выделения суммарной РНК и

синтеза кДНК, полимеразной цепной реакции, определения нуклеотидной последовательности, филогенетического анализа и др.

Анализ нуклеотидной последовательности 5'-нетранслируемой области вирусного генома изолятов из различных регионов Северной Евразии показал принадлежность большинства из них к дальневосточному генотипу вируса клещевого энцефалита и только образцы из Республики Коми и г. Томска могли быть отнесены к геновариантам сибирского генотипа вируса клещевого энцефалита. При этом автором выявлена выраженная изменчивость нуклеотидной последовательности 5'-нетранслируемой неравномерно распределенная по основным элементам 5'-нетранслируемой области вируса клещевого энцефалита. Элементы В2, С1, С2 содержали множественные нуклеотидные замены (от 4 до 10 у природных вариантов и от 3 до 12 у лабораторных штаммов), на основании чего были отнесены к вариабельным элементам 5'-нетранслируемой области. Элементы А2, СS А, СS В и район стартового кодона, напротив, не содержали либо содержали единичные нуклеотидные замены и были отнесены к консервативным элементам. Диссертант осторожно связывает генетическую вариабельность 5'-нетранслируемой области вируса клещевого энцефалита с его потенциальной способностью эффективно реплицироваться в клетках различных хозяев (иксодовые клещи, птицы, млекопитающие). Интересен впервые установленный на территории Республики Молдова факт присутствия в клещах трех видов РНК вируса клещевого энцефалита дальневосточного генотипа.

Несомненным достоинством работы является раздел, посвященный выделению, генетическому анализу и изучению динамики адаптационных изменений изолята вируса клещевого энцефалита западносибирского субтипа С11-13, полученного из мозговой суспензии пациентки, погибшей от этого заболевания. Схема эксперимента предусматривала изучение изменений генома изолята (уже преодолевшего видовой барьер от клеща к человеку) в процессе его пассирования в различных культурах клеток (SPEV,

НЕК 293, Neuro-2a) с последующим заражением вариантами из пассажей беспородных мышей-сосунков. Секвенирование геномов варианта С11-13 после 1, 3, 5, 6 и 8 пассажей выявило аминокислотные и нуклеотидные замены в NS1, NS2a и NS3, общие для всех использованных в эксперименте культур клеток. Причем эти изменения коррелировали с ростом инфекционного титра вируса, что позволяет связать их с адаптацией природного изолята к различным культурам клеток. Уже после третьего пассажа на животных у двух изолятов вируса клещевого энцефалита С11-13 был установлен ряд нуклеотидных и аминокислотных замен, отличных от вариантов, адаптированных к культуре клеток SPEV. Все замены локализовались в кодирующей части генома вируса. Очень значим факт выявления при пассажах на мышах 6 аминокислотных замен, характерных для исходного изолята, но замещенных при пассажах в культуре клеток SPEV. Эти реверсные замены в белках E, NS1, NS3 и NS5 можно, на наш взгляд, считать строгим подтверждением адаптационных способностей вируса клещевого энцефалита.

Выполненная работа позволила получить ряд приоритетных данных. В их числе впервые обнаруженный на территории Республики Молдова дальневосточный генотип вируса клещевого энцефалита, картирование наиболее значимых аминокислотных замен в вирусных белках при смене хозяина, оценка скорости изменчивости структурных и неструктурных белков при пассировании изолята вируса клещевого энцефалита в различных культурах клеток. В этом несомненная научная новизна работы. Выводы соответствуют поставленным задачам. По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 4 статьи в российских и зарубежных журналах из перечня ВАК, а также 6 тезисов в материалах отечественных и зарубежных конференций. Содержание автореферата соответствует положениям и выводам диссертации. Принципиальных замечаний и вопросов при рецензировании диссертации не возникло.

Заключение: диссертационная работа Пономаревой Евгении Павловны на тему: «Вирус клещевого энцефалита в региональных природных очагах и его изменчивость при адаптации к новому хозяину», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненного автором исследования содержится решение актуальной научной задачи – изучения генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита и оценки его изменчивости при смене хозяина, что имеет существенное значение для развития вирусологии.

Работа Пономаревой Евгении Павловны по актуальности, научной новизне, практической значимости, полноте изложения и обоснованности выводов соответствует требованиям пункта 9 Положения о присуждении ученых степеней (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 года № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология.

Официальный оппонент:

заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заслуженный работник высшей школы РФ, доктор медицинских наук (1.5.10- вирусология), профессор

Евстропов Александр Николаевич

08.09.2022.

Подпись профессора Евстропова А.Н. заверяю

Начальник отдела кадров

ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

телефон +7 (383) 222-13-80, microbiongmu@yandex.ru,

сайт <http://www.ngmu.ru>