

ОТЗЫВ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения
Российской академии наук»
630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 100

официального оппонента кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника сектора «Молекулярно – генетических механизмов регенерации» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» Блинова А.Г. на диссертационную работу Пономаревой Евгении Павловны на тему **«Вирус клещевого энцефалита в региональных природных очагах и его изменчивость при адаптации к новому хозяину»**, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология

Актуальность темы диссертационного исследования

Диссертация Пономаревой Е. П. посвящена сравнению генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита в различных природных очагах и изучению изменчивости вируса при смене хозяев. Клещевой энцефалит является опасным заболеванием, угрожающим жизни людей, и проявляющимся от простой лихорадки, до тяжелого энцефалита. В зависимости от генотипа вируса, клиническое течение и исход болезни могут значительно различаться. Так, заражение дальневосточным генотипом обычно вызывает более тяжелое течение заболевания, с летальностью 20 – 40% и более, с высокой вероятностью тяжелых неврологических осложнений. Тогда как заболевание, вызываемое европейским генотипом, часто имеет двухфазное течение и уровень смертности от 0,5 до 2% и более, в основном без осложнений. Сибирский генотип может индуцировать хроническую прогрессирующую форму энцефалита и смертность с показателем ниже 6-8%. Несмотря на то, что в различных исследованиях представлена обширная информация о специфичности вектора вируса клещевого энцефалита, диапазоне хозяев и клинических проявлениях, причина генетического разнообразия остается невыясненной. Эпидемические и патогенетические особенности возбудителя могут быть отражением результата его адаптации при распространении в новые экологические ниши. Обнаруживая генетические изменения вируса при адаптации к новому хозяину, делается важный шаг в картировании и понимании роли тех генетических детерминант, которые участвуют в эпидемических и патогенетических различиях. Таким образом, выявление генетических различий между разными вариантами вируса, в том числе различий, возникающих при адаптации к новым хозяевам, могут являться важным шагом для совершенствования профилактики и лечения клещевого энцефалита.

Научная новизна

Ряд важных результатов был получен автором впервые:

1. Впервые, в регионе Юго-Восточной Европы на территории Республики Молдова, у клещей *Ixodes ricinus*, *Dermacentor spp.* и *Haemaphysalis spp.* обнаружен вирус клещевого энцефалита дальневосточного генотипа.
2. Были получены новые данные по определению структурного разнообразия нетранслируемых областей природных вариантов вируса в иксодовых клещах, в некоторых природных очагах в Западной Сибири, Дальневосточном регионе России и приграничной к России Восточной Европе.

3. Были картированы наиболее значимые аминокислотные замены в вирусных белках вируса клещевого энцефалита изолята С11-13 при смене хозяина - при пассировании на различных культурах клеток.
4. Была проведена оценка скорости изменчивости структурных и не структурных генов изолята С11-13, при пассировании на различных культурах клеток.
5. Были получены новые данные по изменчивости генетических детерминант вариантов вируса клещевого энцефалита в модельном эксперименте по адаптации вируса к новому хозяину – мелким млекопитающим.

Структура и объем диссертации

Диссертация имеет традиционную структуру: оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы, который включает 265 источника. Работа изложена на 155 страницах, содержит 17 рисунков, 11 таблиц и 1 приложение.

Введение посвящено обоснованию актуальности проблемы, даны краткая характеристика генотипов вируса, их эффект на смертность, и географическое распространение генотипов вируса. В данном разделе поставлена цель и определены задачи работы. Приведены основные характеристики работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, основные положения выносимые на защиту, а также личный вклад автора.

В **Обзоре литературы** описана общая характеристика флавивирусов, цикл репродукции, эволюция и их морфологические признаки. Подробнейшим образом рассмотрены функции и строение белков вируса и нетранслируемых областей генома вируса. Также подробно рассмотрены особенности взаимодействия вируса с различными хозяевами, и изменения его генома при смене хозяев.

В разделе **Материалы и методы** подробно и исчерпывающе описаны используемые молекулярно-генетические методики, реагенты, программы и штаммы вирусов. В работе используется стандартный набор молекулярно-генетических методов синтеза и секвенирования нуклеотидных последовательностей, а также построения филогенетических деревьев. Выбор используемых методов исследования полностью соответствует поставленным в диссертации задачам. Полученные результаты прекрасно иллюстрированы, их достоверность не вызывает сомнений, а выводы полностью соответствуют полученным результатам.

В главе **Результаты и обсуждение** представлены результаты анализа генетического разнообразия вируса на основе последовательностей нетранслируемых областей, а также результаты пассажей вируса при заражении разных клеток. В ходе работы были получены нуклеотидные последовательности вируса клещевого энцефалита в природных очагах Западной Сибири, Дальневосточном регионе России и приграничной к России Восточной Европе. Анализ этих данных впервые показал наличие вируса дальневосточного генотипа в регионе Юго-Восточной Европы на территории Республики Молдова, у клещей собранных с домашних животных. Интересным результатом работы является полноценный анализ геномов вируса изолята С11-13 при пассажах на различных хозяевах для вируса. В

ходе работы было выявлено, что в геноме вируса происходят значительные изменения, даже при небольшом количестве пассажей, которые приводят к повышенной скорости репликации вируса и лучшей адаптации к новому хозяину.

В **Заключении** подробно рассматриваются различные гипотезы и предположения касательно адаптации вируса клещевого энцефалита к новым хозяевам, а также подведены итоги результатов работы. В разделе подчеркивается значимость полученных в ходе работы результатов, как для улучшения диагностики трансмиссивных инфекций, так и для совершенствования профилактики и лечения клещевого энцефалита.

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 4 статьи в российских и зарубежных журналах из перечня ВАК. Полученные результаты были апробированы на ряде российских и международных конференций и конгрессах:

1. **Пономарева Е.П.**, Терновой В.А., Микрюкова Т.П., Протопопова Е.В., Гладышева А.В., Чаусов Е.В., Локтев В.Б. Обнаружение множественных аминокислотных замен в белках вируса клещевого энцефалита при адаптации высокопатогенного для человека изолята к культурам клеток / Материалы IX Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. Москва, 27–29 марта 2017 г. // Инфекционные Болезни. – 2017. – Т. 15. Приложение 1. – С. 222

2. Гладышева А.В., **Пономарева Е.П.**, Терновой В.А., Микрюкова Т.П., Протопопова Е.В., Швалов А.Н., Коновалова С.Н., Чаусов Е.В., Локтев В.Б. Адаптация вируса клещевого энцефалита, выделенного из человеческого мозга, к различным клеточным культурам./ В книге: Сборник тезисов IV Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов Сборник тезисов. – 2017. – С. 136-140

3. Гладышева А.В., Терновой В.А., **Пономарева Е.П.**, Микрюкова Т.П., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Чаусов Е.В., Швалов А.Н., Локтев В.Б. Варибельность 3'-UTR геномной РНК вируса клещевого энцефалита и изменчивость 3'-UTR при культивировании в различных типах клеток / В книге: МНСК-2018: Физические методы в естественных науках Материалы 56-й Международной научной студенческой конференции. – 2018. – С. 6

4. Гладышева А.В., Терновой В.А., **Пономарева Е.П.**, Протопопова Е.В., Локтев В.Б. Множественные аминокислотные замены в кодирующей части и изменение 3'-UTR вируса клещевого энцефалита при адаптации к различным типам клеток / В книге: Биология – наука XXI века. Сборник тезисов 23-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. – 2019. – С. 207

5. **Пономарева Е.П.**, Терновой В.А., Микрюкова Т.П., Протопопова Е.В., Тупота Н.Л., Локтев В.Б. Генетические варианты 5'-нетранслируемой области РНК вируса клещевого энцефалита / В книге: Сборник тезисов VI Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания». – 2019. – С. 169- 170

6. **Пономарева Е.П.**, Терновой В.А., Микрюкова Т.П., Протопопова Е.В., Швалов А.Н., Тупота Н.Л., Трегубчак Т.В., Локтев В.Б., Агафонов А.П. Оценка популяционной гетерогенности вирусов клещевого энцефалита и лихорадки западного нила при ассоциированной инфекции. / В книге: Сборник тезисов VII Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания». – 2020. – С. 159-160.

Диссертационная работа соответствует опубликованным результатам.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность результатов диссертационного исследования Пономаревой Е.П., обоснованность основных положений, выводов и практических рекомендаций обеспечивается как современным уровнем исходных теоретических положений, так и разумной и адекватной задачам логикой плана исследования, использованием современных методов, соответствующих поставленной цели и задачам, корректной статистической обработкой и интерпретацией полученных результатов.

Необходимо отметить личный вклад соискателя. Все результаты, представленные в работе, получены лично автором или при его непосредственном участии.

Таким образом, рассмотрение работы показывает, что диссертационная работа Пономаревой Евгении Павловны является самостоятельным законченным исследованием, посвященным сравнению генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита в отдаленных друг от друга природных очагах, а также выделению и характеристике генома штамма С11-13 вируса клещевого энцефалита, оценке его скорости и диапазона изменчивости при смене хозяина.

Полученные генетические данные могут стать основой для создания новых диагностических, профилактических и лечебных препаратов. С этой целью в GenBank были депонированы нуклеотидные последовательности ВКЭ, адаптированного на различных культурах клеток.

Полученная диссертантом новая генетическая информация может помочь разобраться в молекулярных факторах, лежащих в основе процессов адаптации вируса клещевого энцефалита к различным хозяевам, а также закрыть пробелы в наших знаниях о роли тех генетических детерминант, которые участвуют в эпидемических и патогенетических различиях.

Высокая практическая значимость выполненной работы связана с развитием на этой базе генетической диагностики, а накопление информации о патогенности флавивирусов для домашних животных и человека делает крайне значимой необходимость развития методов диагностики, профилактики и возможно лечения этой вирусной инфекции. На мой взгляд, вся совокупность полученных результатов обязательно станет основой для дальнейших эпидемиологических исследований этой инфекций и его санитарному надзору на территории РФ.

Замечания

Небольшим недостатком работы можно назвать достаточно устаревшую программу построения филогенетических деревьев – MEGA7, в настоящее время существует 11 версия данной программы, а также множество других, более современных опций, с более точными способами построения деревьев. Однако, использованный в работе метод адекватно оценивает положение изолятов вирусов на древе для целей работы.

Основные положения автореферата полноценно отражают материалы диссертационной работы. Опубликованные научные труды, исчерпывающие отражают содержание диссертационной работы. Научные положения, выносимые на защиту, достаточно полно отражены в опубликованных работах.

Заключение

Диссертационная работа Пономаревой Евгении Павловны является законченным исследованием, выполненным автором самостоятельно, на высоком научном и методическом уровне. Основные результаты диссертационной работы были представлены на различных конференциях, и опубликованы в рецензируемых журналах из списка ВАК. Заключение и выводы, сделанные по результатам работы, обоснованы и полностью соответствуют задачам, поставленным в исследовании. Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации. Исходя из вышеизложенного, считаю, что диссертационная работа «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», полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 20 марта 2021 г. №426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Пономарева Евгения Павловна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.10 – вирусология».

В.н.с. Сектора молекулярно-генетических
механизмов регенерации, к.б.н.

Блинов А.Г.

ФГБНУ «ФИЦ, Институт цитологии и генетики» СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева 10,

Эл. почта: blinov@bionet.nsc.ru

Мужиков А.Г. Блесенкова завершено
Ученый секретарь

