

ОТЗЫВ

официального оппонента,
кандидата биологических наук Шаршова Кирилла Александровича на диссертацию
Охотиной Юлии Сергеевны «Комплексная характеристика вируса клещевого энцефалита европейского субтипа, циркулирующего на территории Сибири»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – Вирусология.

Актуальность темы диссертационной работы

Клещевой энцефалит (КЭ) - одна из наиболее распространенных природно-очаговых нейроинфекций, передающихся через укус иксодовых клещей. Объектом исследования является возбудитель инфекции – вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), относящийся к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*.

Автором проанализирована основная доступная информация о современных представлениях о генетической variability вируса: существует три основных субтипа (генотипа) ВКЭ: 1) дальневосточный; 2) европейский или западный (в диссертации обозначаемый как ВКЭ-ЕС); 3) сибирский. В последние годы описано еще два предполагаемых субтипа ВКЭ – Байкальский и Гималайский. Каждый из субтипов вируса, за исключением Гималайского, обладает собственным ареалом, ассоциирован с определенным видом клеща-переносчика и кругом позвоночных хозяев, обладает разным патогенным потенциалом для человека.

Актуальность подчеркивается тем, что зоной доминирования ВКЭ-ЕС являются Центральная и Северная Европа. Циркуляция этого варианта вируса также выявлена на территории европейской части России, в Южной Корее и Северной Африке (Тунис). В настоящее время в Европе наблюдается расширение ареала ВКЭ-ЕС, увеличение уровня заболеваемости, рост числа стран, в которых регистрируются случаи КЭ, многие из которых приводят к тяжелым случаям заболевания. При этом ранее считалось, что штаммы ВКЭ-ЕС обладают меньшей вирулентностью и нейроинвазивностью по сравнению со штаммами других субтипов вируса, и с ним ассоциированы заболевания человека с более мягким течением и благоприятным исходом.

Данные, полученные рядом авторов, свидетельствуют о стабильности генома ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Европы, и его более древнем происхождении. Однако, автор справедливо обнаружил противоречия в отношении получаемых данных о variability ВКЭ-ЕС и реконструкции эволюционной истории ВКЭ-ЕС разными авторами. Автор приводит сведения о новых дивергентных вариантах ВКЭ-ЕС в Нидерландах и Великобритании, расширяющих установленные ранее границы

вариабельности внутри данного субтипа вируса. Все эти факты свидетельствуют об актуальности продолжения филогенетических и филогеографических исследований.

В целом, актуальность молекулярно-биологических и вирусологических исследований ВКЭ, и, в частности, вируса европейского субтипа для дальнейших прикладных разработок сомнений не вызывает.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Автором впервые дана комплексная характеристика ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Сибири, реконструирована его эволюционная история. С помощью филогенетического анализа показано, что уровень различий между нуклеотидными последовательностями кодирующей части генома у ВКЭ-ЕС и другими субтипами вируса сопоставим или даже превышает таковой между штаммами ВКЭ-ЕС и вирусами группы *Louping ill*. Впервые в ходе сравнительного геномного и биоинформационного анализа штаммов ВКЭ-ЕС установлено, что штаммы из Сибири формируют две отдельные клады в составе самого обширного кластера, образованного штаммами из Восточной, Западной, Северной Европы и штаммами из Южной Кореи. В результате сравнительного анализа геномов штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных из различных источников, высказано предположение о том, что кластеризация штаммов на дендрограммах в большей степени зависит от места их изоляции, нежели от источника и года их выделения. Впервые охарактеризованы генетические особенности штаммов ВКЭ-ЕС из Западной и Восточной Сибири. Показано, что сибирская популяция ВКЭ-ЕС на обследованных территориях представлена двумя генетическими линиями (восточносибирский и западносибирский варианты), которые отличаются друг от друга по сочетаниям аминокислотных замен во всех белках, кроме NS2B. Обнаружены делеции в вариабельной части 3'-нетранслируемой области генома у штаммов ВКЭ-ЕС из Сибири, сопоставимые по длине со штаммом *Huyp* (U39292) из Чешской Республики. Не установлено связи между наличием делеций в геноме и вирулентностью штаммов ВКЭ-ЕС из Сибири.

Автор впервые показал, что ВКЭ-ЕС успешно интродуцировался в экосистемы Западной и Восточной Сибири, при этом основной переносчик и спектр мелких млекопитающих, поддерживающих циркуляцию данного варианта вируса на территории региона, имеют отличия от таковых на территории Европы. Установлено, что основным переносчиком ВКЭ-ЕС в Сибири является клещ *I. persulcatus*, а циркуляция ВКЭ-ЕС на территории региона поддерживается несколькими видами грызунов, преимущественно полевками, а также сусликами, насекомоядными, зайцеобразными и некоторыми видами птиц. При этом ВКЭ-ЕС в азиатской части России существует в условиях климата от умеренно до резко континентального.

Установлено, что популяция ВКЭ-ЕС на территории Сибири гетерогенна по различным фенотипическим свойствам (S-признак, gst42 и T50 признаки, вирулентность и нейроинвазивность).

Практическая значимость исследования

Полученные автором данные имеют важное прикладное значение, так как данные об особенностях генетической организации и фенотипической изменчивости ВКЭ являются научной базой для дальнейшего совершенствования методов диагностики и профилактики этой инфекции. Автором создана база данных «Генетические и фенотипические свойства штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа, изолированных на территории Евразии» (свидетельство о государственной регистрации № 2017620500 от 3.05.2017 г.), которая позволяет: проводить сравнительный анализ геномов и фенотипических свойств штаммов ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Европы и Азии, осуществлять целенаправленный скрининг штаммов по отдельным категориям (источник, страна, год изоляции, наличие информации о биологических свойствах), использовать эти данные для эволюционных построений, поиска сайтов рекомбинации, а также для дальнейшего совершенствования методов диагностики и профилактики этой инфекции.

Большим вкладом является расшифровка полного генома восьми штаммов ВКЭ-ЕС из Сибири, нуклеотидные последовательности которых депонированы в международную электронную базу данных GenBank.

Теоретическая значимость же работы заключается в расширении имеющихся на сегодняшний день фундаментальных знаний о генетике, генетической изменчивости, экологии и эволюции ВКЭ.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов (пять глав, хотя автор указал в автореферате шесть), заключения, выводов и списка литературы. Раздела обсуждения не присутствует, обсуждение представлено в каждом соответствующем разделе. Работа изложена на 156 страницах, содержит 19 таблиц и 23 рисунка. Библиографический список включает 193 источника, в том числе 24 – работы отечественных и 166 – зарубежных авторов.

Автором подробно обоснована актуальность темы исследования, определены цель, задачи диссертационной работы, методология исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, описана апробация результатов исследования и личный вклад автора.

Глава «Обзор литературы» написана грамотным языком и соответствует тематике данной работы: она включает 4 больших раздела с подразделами («Таксономия флавивирусов», «Строение вириона и организация генома вируса клещевого энцефалита», «Характеристика Европейского субтипа вируса клещевого энцефалита» и «Вопросы дивергенции и эволюции вируса клещевого энцефалита»). К сожалению, в конце этой главы не имеется заключения.

Глава «Материалы и методы» полно представляет использованные методики и свидетельствует о большом объеме проделанной автором работы. Глава «Результаты и обсуждение» имеет 5 основных структурированных раздела, в которых представлены результаты исследований. В части, касающейся обсуждения результатов, в данной главе соискатель приводит глубоко осмысленный и подробный анализ полученных результатов исследования.

В разделах «Заключение» и «Выводы» представлены все полученные автором результаты. Выводы диссертации четко сформулированы, обоснованы, закономерно вытекают из полученных результатов и соответствуют поставленным задачам.

В целом, диссертация соответствует специальности, по которой она представлена к защите, написана ясно и логично, а ее оформление отвечает существующим требованиям. В автореферате отражены основные результаты диссертационной работы.

Достоверность результатов, обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций обеспечивается комплексным подходом к их достижению с привлечением современных вирусологических, молекулярно-биологических и биоинформатических методов, а также научно обоснованными выводами и наличием научных публикаций в высокорейтинговых журналах. Достоверность поддерживается также большим объемом экспериментальных данных по изучению вирусологических и молекулярно-биологических свойств ВКЭ с использованием методов, адекватных целям и задачам исследования, а также методов статистической обработки полученных результатов.

Научные положения, выводы и заключение, сформулированные в диссертации, обоснованы объемом проведённых исследований, методическими подходами, использованием современных методов исследования. Основные положения, выносимые на защиту, и выводы логично вытекают из полученных результатов. Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений и выводов не вызывают сомнений.

Публикации и апробация результатов представлены в диссертации.

Результаты работы отражены в 16 публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 8 – статьи в ведущих рецензируемых научных журналах,

рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций, две коллективные монографии.

Результаты работы неоднократно устно представлены автором на различных международных конференциях.

Вопросы и замечания к диссертационной работе

Работа однозначно оценивается положительно. Некоторые замечания в оформлении не являются критическими для этого хорошего исследования. Присутствуют некоторые опечатки и несогласованные предложения в тексте диссертации (например: на странице 7, строки 4-5 и строка 18, или на странице 38 – примечание к таблице 1.4).

Ниже некоторые комментарии, на которые хотелось бы получить ответы и мнение автора в отношении самой сути исследования.

1. Самый первый и логичный возникающий вопрос - вопрос об антигенных характеристиках выявленных штаммов ВКЭ-ЕС, их отличиях от других штаммов и субтипов. Этот очень важный для практики аспект, конечно, относится к разработкам и применению вакцин от КЭ. Несомненно, автор изучил очень важные биологические характеристики вируса, однако по какой причине не рассмотрены антигенные свойства (на мой взгляд, важнейшие для многих аспектов!) не совсем понятно. К тому же антигенные характеристики важны в применяемых в настоящее время тест-системах ИФА (например НПО «Микроген»).
2. Очень интересен вопрос об дополнительных/альтернативных хозяевах, которые могут являться и основными, кто знает. Например, авторы располагали в коллекции несколькими штаммами ВКЭ от диких птиц.
3. Жаль, что в исследование не вошли самые современные штаммы, а только коллекционные. В связи с этим вопрос – по каким критериям выбирались штаммы из коллекции? Были ли это все имеющиеся в коллекции? Ведутся ли сейчас работы по сбору и секвенированию, и каково по мнению автора соотношение субтипов ВКЭ в основных регионах Западной и Восточной Сибири? Это как раз наиболее интересный вопрос с точки зрения динамики географического распространения субтипов в этой зоне ареала. Ведь второе положение, выносимое на защиту, утверждает, что ВКЭ-ЕС на территории Сибири представлен двумя генетическими вариантами – восточносибирским и западносибирским. (т.е. сделано ли это по материалам архивной коллекции и насколько может отражать современную картину?). Вывод номер шесть также гласит о составе основных переносчиков и резервуарных хозяев ВКЭ-ЕС в Сибири – тот же вопрос.

В целом, работа оценивается положительно, вопросы и комментарии не являются принципиальными, нисколько не умоляют ценности и качества работы.

Заключение

Диссертационная работа Охотиной Юлии Сергеевны «Комплексная характеристика вируса клещевого энцефалита европейского субтипа, циркулирующего на территории Сибири», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология биология является завершенной научно-квалификационной работой, в которой, на основе выполненных автором исследований, описаны основные генетические и экологические характеристики вируса клещевого энцефалита европейского субтипа, циркулирующего на территории Сибири.

Диссертация и автореферат полностью соответствуют критериям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сама автор, Охотина Юлия Сергеевна, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Официальный оппонент: руководитель лаборатории молекулярной эпидемиологии и биоразнообразия вирусов НИИ вирусологии ФГБУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Научно-исследовательский институт вирусологии,
e-mail: sharshov@yandex.ru
Тел. +7 960-794-21-36
к.б.н. Кирилл Александрович Шаршов



Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»,
г. Новосибирск, 630117, ул. Тимакова, д. 2
телефон/факс приемной: +7(383)333-64-56.

Личную подпись К.А. Шаршова заверяю
Вед. специалист отдела кадров ФИЦ ФТМ
"29" февраля 2024 г. подпись Е.С.В. Венедиктова

