

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию

Гладышевой Анастасии Витальевны

**«Изменчивость вирусных белков и геномной ssRNA(+) флавивирусов и
энтеровирусов при культивировании in vitro»,**

представленную к защите в диссертационный совет 64.1.001.01

на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 1.5.3 - молекулярная биология

Актуальность темы диссертационной работы

Несмотря на значительный прогресс в секвенировании вирусных геномов до сих пор остаются вопросы о функционировании механизмов репликации и трансляции вирусного генома. Для данных процессов особую важность представляют нетранслируемые регионы вирусных геномов. Во многих случаях исследователи ограничиваются секвенированием кодирующих районов генома и в базах данных содержится небольшое количество последовательностей действительно полных вирусных геномов. Изучение структуры 5' и 3' нетранслируемых областей оцРНК(+) флавивирусов и энтеровирусов важно для выяснения детального механизма жизненного цикла этих вирусов.

Гладышева А.В. в ходе данной работы исследовала изменчивость вирусных белков и геномной оцРНК(+) флавивирусов и энтеровирусов в процессе адаптации к клеткам различных типов. Для анализа были выбраны флавивирусы (вирус клещевого энцефалита и вирус Зика), энтеровирус ЕСНО 3 и новый флавиподобный вирус Kindia tick virus. Автор в работе поставил своей целью исследование вариабельности геномной вирусной оцРНК(+), а также изменчивости пространственной структуры нетранслируемых регионов оцРНК(+), белков флавивирусов и энтеровирусов при их адаптации к различным культурам клеток.

Актуальность данной работы не вызывает сомнений, так как несмотря на большое количество секвенированных вирусных геномов до сих пор мало что известно о вариациях функциональных вторичных структур нетранслируемых регионов РНК во время адаптации вирусов к клетке хозяина.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Авторами совокупно было получено и депонировано в международную базу GenBank 12 полногеномных нуклеотидных последовательностей различных штаммов вируса клещевого энцефалита, вируса Зика, энтеровируса ЕСНО 3 и нового вируса Kindia tick virus.

В представленной работе получены новые данные о вариабельности геномов флавивирусов и энтеровирусов в процессе их адаптации к различным типам клеток. Получены новые данные об особенностях организации регуляторных элементов нетранслируемых областей генома.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Фундаментальная значимость полученных А.В. Гладышевой результатов заключается в том, что в результате исследования получены знания о геномных изменениях ряда вирусов в процессе их адаптации к различным типам клеток. Это может пролить свет роль нетранслируемых районов при репликации и трансляции вирусного генома.

Практическая значимость результатов, представленных в данной диссертационной работе, не вызывает сомнений. Атенуация вирусов при проведении последовательных пассажей на культурах клеток – это широко распространенный метод получения вакцинных штаммов вирусов. Данная работа может помочь в понимании механизмов этого процесса.

Данные о последовательностях геномов флавивирусов и энтеровирусов могут быть использованы для разработки и совершенствования молекулярно-генетических тестов для мониторинга и диагностики вирусных инфекций. Сконструированные А.В. Гладышевой пространственные модели вирусных

белков и регуляторных элементов нетранслируемых областей вирусных геномов могут быть полезны для создания новых противовирусных препаратов.

Общая характеристика диссертационной работы

Текст диссертации А.В. Гладышевой изложен на 143 страницах, включая список использованной литературы. Диссертация написана в традиционном стиле. Представленная диссертационная работа написана по классической схеме и включает "Введение"; "Обзор литературы"; «Материалы и методы»; "Результаты и обсуждение"; а также "Заключение" и "Выводы". Введение содержит разделы «Цель исследования», «Задачи исследования», «Научная новизна работы», «Теоретическая и практическая значимость работы», «Методология и методы исследования», «Положения, выносимые на защиту», «Степень достоверности и апробация результатов», «Публикации по теме диссертации», «Структура и объем диссертации», «Личный вклад автора» и «Благодарности». Список литературы состоит из 192 источников.

"Обзор литературы" написан грамотно и соответствует тематике данной работы. В обзоре литературы описаны современные данные о флавивирусах и энтеровирусах. Приведена информация об организации их геномов и строении вирионов. Особое внимание уделено 5' и 3' нетранслируемым районам вирусных геномов. Литературные данные свидетельствуют о решающем значении этих районов для репликации, трансляции, иммунной регуляции и патогенеза оцРНК(+) вирусов.

Раздел «Материалы и методы» полно представляет использованные методики и свидетельствует о большом объеме проделанной автором работы. Можно отметить широкий диапазон использованных методов, которые включают вирусологические (культивирование и титрование вирусов *in vitro*), молекулярно-биологические (выделение нуклеиновых кислот, обратная транскрипция, ПЦР, полногеномное секвенирование методом Сэнгера и NGS) и биоинформационные (сборка и анализ полногеномных последовательностей, филогенетический и эволюционный анализ, моделирование пространственных структур белков и вторичной структуры РНК) методы.

В разделе "Результаты и обсуждение" автор излагает основные достижения. Выводы соответствуют полученным результатам. По теме диссертации опубликованы 3 научные статьи в зарубежных изданиях. Результаты работы неоднократно представлялись на российских и международных конференциях, что отражено в 12 тезисах материалов конференций.

В целом, диссертация написана ясно и логично, содержит все необходимые рисунки и таблицы, иллюстрирующие полученные результаты.

Замечания к диссертационной работе

Замечания к данной работе незначительны и имеют технический или дискуссионный характер. В качестве замечаний можно отметить наличие небольшого количества грамматических ошибок и опечаток, автор по тексту диссертации и в автореферате употребляет термин «комплиментарный», также к опечаткам можно отнести фразы: мутации (в геноме вирусов) изменяют тропизм клеток (с. 46), с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле при напряжении 5 В и токе 400 А (с. 58.), ящур рук (с. 39) и т.д.

Автор приводит «Современную таксономию энтеровирусов» по работе Lugo & Krogstad, 2016 (с.40.) Однако согласно данным Международного комитета по таксономии вирусов от 2022 года (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>) род Enterovirus включает не 4 группы, а 15 видов вирусов. Из этой неточности происходят такие ошибки, как «Вторичная структура 5' UTR РНК домена V у поливирусов и энтеровирусов имеет схожую топологию (с.49)», но полиовирус (а не «полиовирус») это энтеровирус С. Нужно отметить, что таксономия энтеровирусов постоянно изменяется и, возможно, в ближайшем будущем эти вирусы будут именоваться иначе.

Имеются замечания к рисунку 16 на с. 83. Генетическое расстояние между последовательностями YFV и висами Зика составляет 1,7 замен на сайт. Данное значение не имеет смысла (произошло насыщение заменами) и данный вид нельзя использовать в анализе нуклеотидных последовательностей. Ближайший к изучаемому штамму Faganah/18 вируса Зика штамм из Сенегала

изолирован в 1984 году, а не в 2018, как отметил автор. Данные замечания не влияют на основные выводы работы.

Приведенные замечания не умаляют высокую значимость полученных результатов.

Достоверность полученных результатов, степень обоснованности научных положений и выводов диссертационной работы

Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современного сертифицированного оборудования и современных методов исследования.

Научные положения, выводы и заключение, сформулированные в диссертации, обоснованы проведенными исследованиями, 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 вызывает сомнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Гладышевой Анастасии Витальевны «Изменчивость вирусных белков и геномной ssRNA(+) флавивирусов и энтеровирусов при культивировании *in vitro*» является хорошей квалификационной научно-исследовательской работой. Все замечания не являются принципиальными с точки зрения полученных результатов и не снижают ценности проделанной работы

Актуальность поставленных и решенных в ходе диссертационной работы задач, большой объем и качество проведенных научных исследований, новизна и высокая научно-практическая значимость полученных результатов, обоснованность приводимых выводов позволяют заключить, что представленная диссертационная работа полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук,

перечисленным в п. 9 "Положения о присуждении ученых степеней" от 24.09.2013 №842 с изменениями от 21.04.2016 №335, а ее автор, Гладышева Анастасия Витальевна, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.3 - молекулярная биология.

В.н.с лаборатории молекулярной микробиологии
ФГБУН ИХБФМ СО РАН,
e-mail: babkin@niboch.nsc.ru
Тел. +7 (383)363-51-57
к.б.н. Игорь Викторович Бабкин

И.В. Бабкин

Подпись И. В. Бабкина заверяю
Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН к.х.н.



Д.С. Новопашина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН),
Новосибирск, 630090, пр-т академика Лаврентьева, д.8.
Тел. +7(383)363-51-50; e-mail: niboch@niboch.nsc.ru; www.niboch.nsc.ru