

«УТВЕРЖДАЮ»



Генеральный директор ФГАНУ  
«Федеральный научный центр  
исследований и разработки  
иммунобиологических препаратов  
РАН» (Институт полиомиелита)  
Академик РАН, профессор, д.м.н.

А.А. Ишмухаметов

«*Иш*» *август* 2022 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Гладышевой Анастасии Витальевны на тему: «Изменчивость вирусных белков и геномной ssRNA(+) флавивирусов и энтеровирусов при культивировании *in vitro*» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология».

#### Актуальность темы диссертационной работы:

Одной из самых актуальных проблем, стоящих перед современной наукой, является изучение генетической изменчивости вирусов. Это важно как с точки зрения наших фундаментальных представлений о механизмах эволюции, структурной и функциональной организации РНК, так и с точки зрения разработки подходов к оценке рисков появления новых эпидемически важных вариантов вирусов, в первую очередь, РНК-содержащих вирусов.

Нетранслируемые области (НТО) в вирусных геномах играют важную роль на основных этапах репродукции вирусов: репликации, трансляции, подавления иммунного ответа клетки-хозяина, включая взаимодействие с клеточными белками. Можно предположить, что многие аспекты взаимодействия НТО с клетками будут открыты в ближайшее время. Особенностью функционирования НТО вирусных геномов является то, что большинство взаимодействий определяются вторичной или третичной структурой РНК, которая зависит от первичной последовательности, однако, обладает достаточной вариабельностью, может изменяться при различных условиях и, может быть, в большей степени, чем другие участки геномов РНК-содержащих вирусов

зависят от клеток беспозвоночных и млекопитающих, в которых происходит репродукция вируса.

Определение НТО вирусных геномов и построение структуры РНК требует специальных подходов и знаний и представляет отдельную задачу при изучении полных геномов вирусов. С этим связано недостаточное количество правильно определенных НТО в базах генетических данных, и любое пополнение этих баз имеет большое значение.

Диссертация Гладышевой Анастасии Витальевны, главным образом, посвящена изучению НТО ряда (+) РНК содержащих вирусов, значительно различающихся по структуре генома и механизмам трансляции вирусных белков. Данная диссертация актуальна как в теоретическом аспекте, с точки зрения расширения представлений о структуре и изменчивости НТО (+) РНК содержащих вирусов, так и с точки зрения получения информации, в том числе и для новых потенциально опасных для человека вирусов, полезной при разработке противовирусных препаратов.

**Связь с планами соответствующей отрасли науки:**

Диссертационная работа Гладышевой А.В. выполнена в соответствии с основными направлениями современных научных исследований.

**Новизна полученных результатов исследования, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации:**

впервые с использованием оригинальных штаммов вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) и данных ГенБанка показана вариабельность НТО у представителей основных подтипов ВКЭ. Впервые прослежена изменчивость ВКЭ из мозга умершего пациента при адаптации к культурам клеток разного происхождения. Впервые получена полная последовательность геномов набора (+)РНК содержащих вирусов и проведено моделирование вторичной структуры НТО РНК неклассифицированного флавиподобного вируса Kindia tick с сегментированным геномом, входящим в группу неклассифицированного флавиподобного вируса Kindia tick с сегментированным геномом. Впервые, описан уникальный геном штамма Faranah/18 вируса Зика. Впервые, проведен анализ наличия и расположения потенциальных сайтов взаимодействия НТО штамма вируса Зика и флавиподобного вируса Kindia tick с белком MSI1, который высоко экспрессируется в нейрональных клетках-предшественниках и необходим для



нормального развития головного мозга ребенка человека.

### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов:**

Полученные полные геномы уникальных штаммов вирусов, представляющих особый интерес с точки зрения возможности проследить эволюционные процессы и механизмы, лежащие в основе вирулентности вируса для человека, будут крайне полезны для исследований в этих направлениях. Описание и моделирование вторичной структуры НТО целого набора (+) РНК содержащих вирусов вносит большой вклад в наше понимание, какие элементы вторичной структуры принимают непосредственное участие во взаимодействии с белками хозяев при репродукции вируса в клетках разного происхождения. При обсуждении полученных результатов автор высказывает ряд интересных предположений, которые заслуживают внимания с точки зрения дальнейшего выбора направлений для развития научных исследований в этой области.

Полученные данные являются основой для дальнейших исследований по поиску маркеров для предсказания инфекционности и вирулентности при мониторинге циркулирующих вариантов вирусов и разработке противовирусных препаратов.

### **Личный вклад автора:**

участие в выполнении всех разделов данного исследования, а также в проведении анализа полученных данных и представлении результатов на конференциях и при подготовке статей к публикации.

### **Степень достоверности и обоснованности представленных данных:**

Обоснованность представленных в диссертационной работе данных обусловлена применением автором различных современных методических подходов для проверки полученных результатов. Однако некоторые методы исследований следовало бы описать более подробно. Интерпретация полученных данных представляется интересной и в большинстве случаев обоснованной.

Все это позволяет отметить, что проведенное исследование является оригинальным, завершённым в рамках, поставленных цели и задач, а также завершённым научно-квалификационным трудом. Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечивается комплексным подходом к их достижению с привлечением современных вирусологических, молекулярно-биологических и биоинформатических методов, а также наличием научных публикаций

в высокорейтинговых журналах. Результаты работы неоднократно устно представлены автором на различных международных конференциях молодых ученых, где дополнительно прошли независимое рецензирование и удостоены призовых мест.

По материалам диссертационной работы опубликовано 15 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах и 12 тезисов в рецензируемых сборниках трудов научных конференций. Также опубликовано 12 полногеномных вирусных последовательностей в международной базе данных GenBank.

Материалы диссертационной работы представлены на 9 международных и всероссийских научных конференциях-конкурсах: «VIII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio – 2021» (Кольцово, 2021, 1-е место)», «VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio – 2020» (Кольцово, 2020, 1-е место)», «23-я Международная школа-конференция молодых ученых «Биология-наука 21 века» (Пушино, 2019, 1-е место)», «V Международная научная конференция молодых ученых: биотехнологов, вирусологов, молекулярных биологов «OpenBio-2018» (Кольцово, 2018, 1-е место)», «56-я Международная научная студенческая конференция МНСК-2018 (Новосибирск, 2018)», «II Школа молодых учёных «Компьютерное моделирование структуры и динамики биомолекул» (Новосибирск, 2018)», «IV Международная научная конференция молодых ученых: биотехнологов, вирусологов, молекулярных биологов «OpenBio-2017» (Кольцово, 2017, 2-е место)», «Всероссийская конференция, посвящённая 80-летию со дня открытия вируса клещевого энцефалита «Клещевой энцефалит и другие переносимые клещами инфекции» (Москва, 2017)», «55-я Международная научная студенческая конференция МНСК-2017 (Новосибирск, 2017, 2-е место)».

#### **Достоинства и недостатки содержания и оформления диссертации:**

Диссертация написана в традиционном стиле, изложена на 143 страницах компьютерного текста, состоит из списка сокращений и условных обозначений, введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов, результатов исследований и обсуждения, общего заключения, выводов и списка литературы, включающего 192 источника зарубежной литературы. Работа иллюстрирована 12



таблицами и 26 рисунками.

Во введении сформулирована цель исследования: «Целью данной работы являлось исследование вариабельности геномной вирусной ssRNA(+), а также изменчивости пространственной структуры вирусных белков и нетранслируемых регионов ssRNA(+) флавивирусов и энтеровирусов при их адаптации к различным культурам клеток». Поставленные задачи диссертационной работы значительно шире цели. В работе представлены данные для вирусов, не являющихся ни флави-, ни энтеровирусами. В формулировке цели обращает на себя внимание слово «адаптация». Реально адаптация запланирована и описана только для штамма ВКЭ, изолированного из мозга. Замена слова «адаптация» на «репродукция» или хотя бы на «начальные этапы адаптации» сделало бы формулировку цели более соответствующей содержанию работы.

В обзоре литературы приведено общее описание классических флавивирусов и энтеровирусов, а также подробное описание структурных и функциональных характеристик НТО данных вирусов, что указывает на понимание роли НТО в жизненном цикле вирусов и значения информации о вторичной структуре НТО. В этом разделе было бы целесообразным представить описание флавиподобных вирусов с сегментированным геномом, изучение одного из представителей которых было бы существенной и важной частью работы.

Раздел «Материалы и методы» дает достаточное представление о технической стороне работы. Исследование выполнено с использованием современных реактивов и оборудования. В этом разделе не хватает детального описания некоторых стадий эксперимента и описания используемых в работе вирусов.

Глава «Результаты» состоит из четырех разделов, соответствующих изучаемым вирусам. Все результаты сопровождаются информативным иллюстративным материалом в графическом или табличном формате и обсуждением.

В главе «Заключение» автор обобщает и анализирует результаты исследования. В этом разделе было бы уместно изложить общее обсуждение, объясняющее выбор исследуемых вирусов, более обобщенного взгляда на полученные результаты для каждого отдельного вируса и связи между полученными результатами данной работы. К основным достижениям диссертационной работы следует отнести:

1. Определены полногеномные нуклеотидные последовательности, предсказаны модели пространственных структур белков NS3, NS5, вторичной структуры 3' UTR сибирского генотипа вируса клещевого энцефалита и получены новые данные об их вариабельности в процессе адаптации вируса к различным типам клеток.

2. Охарактеризована новая полногеномная последовательность африканского генотипа вируса Зика. Получены новые результаты о мутациях и расположении сайтов связывания белка Musashi-1 (MSI1) в 3' НТО вируса Зика.

3. На основе анализа секвенированных полногеномных последовательностей проведено исследование изменчивости региона IRES в 5' UTR и выявлены множественные мутации в кодирующей части генома вируса ECHO 3 на начальных этапах адаптации к различным культурам клеток.

4. Выделено два новых штамма KITV/2018/1 и KITV/2018/2. Получены две полногеномные последовательности нового многокомпонентного KITV. Впервые предсказаны вторичные структуры 5' и 3' UTR для данного вируса и проведен их анализ.

5. Впервые проведено сравнение предполагаемой пространственной топологии 5' и 3' UTR сегментированной ssRNA(+) многокомпонентного флавиподобного KITV с ssRNA(+) флавивирусов и энтеровирусов. Получены уникальные данные об особенностях организации регуляторных элементов 5' и 3' UTR KITV и сформулированы гипотезы об их роли в процессе репликации флавиподобных вирусов с сегментированным геномом с новым механизмом реализации генетической информации РНК-содержащих вирусов.

Диссертация завершается выводами, которые указывают на достижение соискателем цели и поставленных задач (если убрать слово адаптация).

Работа написана логично и ясно. Имеются смысловые и стилистические недочеты.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология».

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

По теме диссертационной работы опубликовано 4 научные работы (1 препринт) в зарубежных изданиях, рекомендованных ВАК, и в виде материалов большого числа



международных конференций. Материалы работы представлены и обсуждены на научно-практических конференциях, в большинстве случаев автором диссертационной работы на, 9 международных и всероссийских научных конференциях - конкурсах, где многократно были отмечены, как лучшие научные доклады конференции.

Приведенные выше замечания не снижают большую научную ценность диссертационного исследования, результаты которого послужат основой для продолжения работ по изучению НТО РНК содержащих вирусов как для автора, так и для других исследователей в этой области, и не умаляют высокий уровень диссертанта в области изучения вторичной структуры РНК.

#### **Заключение:**

Диссертационная работа Анастасии Витальевны Гладышевой на тему: «Изменчивость вирусных белков и геномной ssRNA(+) флавивирусов и энтеровирусов при культивировании *in vitro*», выполненная под руководством кандидата биологических наук Владимира Александровича Тернового и представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология», является законченным научно-квалификационным исследованием, содержащим решение актуальной научной задачи – изучение роли НТО (+)РНК содержащих вирусов в изменчивости вирусов на начальных этапах их адаптации к новому хозяину, что имеет большое теоретическое значение и может способствовать значительному продвижению в данной области.


Отзыв обсужден и одобрен на заседании Научной экспертной комиссии ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), на заседании присутствовало 14 членов комиссии, из них имеющих ученую степень доктора наук 9 членов, кандидата наук 5 членов, из 21 списочного состава Научной экспертной комиссии. Протокол № 5 от «15» августа 2022 года.

#### **Соответствие диссертации требованиям ВАК:**

По своей актуальности, научной значимости, объему выполненных исследований, новизне полученных результатов и научных положений диссертация Анастасии Витальевны Гладышевой на тему: «Изменчивость вирусных белков и геномной ssRNA(+) флавивирусов и энтеровирусов при культивировании *in vitro*» полностью соответствует требованиям пп. 9-14, установленным Положением «О порядке

присуждения ученых степеней», утверждено Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в ред. Постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г.; №650 от 29.05.2017 г.; №1024 от 28.08.2017 г.; №1168 от 01.01.2018 г.; № 426 от 20.03.2021 г.; №1539 от 11.09.2021 г.), предъявляемым к кандидатским и докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

**Отзыв подготовил:**

Заведующий лабораторией биологии арбовирусов  
ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита),  
профессор, доктор биологических наук (1.5.10 – «Вирусология»)  
e-mail: karganova\_gg@chumakovs.su  
тел. 8 (495) 841-90-96 (3260)  Карганова Галина Григорьевна

Подпись проф., д.б.н. Каргановой Г.Г. удостоверяю:

Ученый секретарь ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»  
(Институт полиомиелита)  
кандидат биологических наук

 2022 года

А.В. Белякова



Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), тел./факс 8 (495) 841-90-02; 8 (495) 549-67-60; 8 (495) 841-93-21. e-mail: sue\_polio@chumakovs.su, <http://www.chumakovs.ru>  
Адрес: 108819, город Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1.