

УТВЕРЖДАЮ:
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Омский научно-исследовательский институт
природно-очаговых инфекций» Федеральной службы
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
д.м.н., профессор Н.В.Рудаков

«09» февраля 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

**Федерального бюджетного учреждения науки
«Омский научно-исследовательский институт
природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора
на диссертационную работу Охотиной Юлии Сергеевны
«Комплексная характеристика вируса клещевого энцефалита
европейского субтипа, циркулирующего на территории Сибири»,
представленную к защите на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
1.5.10 – вирусология**

Актуальность исследования. Диссертационная работа Охотиной (Савиновой) Юлии Сергеевны посвящена изучению актуальной научной проблемы – филогенетических отношений в группе близкородственных вирусов, а именно – филогенетических отношений географических изолятов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа. С широким внедрением молекулярно-генетических методов исследования появилась возможность развития данного направления, поиск и апробирование различных подходов к оценке филогении вирусов, что и определяет актуальность данной работы.

Основным направлением диссертации являлось изучение генетических и биологических особенностей вируса клещевого энцефалита европейского субтипа (ВКЭ-Евр), циркулирующего на территории Сибири, относительно аналогичных характеристик возбудителей данного субтипа в пределах основного ареала.

Диссертация состоит из введения, семи глав, заключения, выводов и списка литературы из 196 источников. Объем диссертации составляет 153 стр.

Основными результатами диссертации следует считать:

1. Определение генетической гетерогенности ВКЭ-Евр на территории Сибири по географическому принципу с формированием двух кластеров – восточно- и западносибирского.

2. Описание формирования групп (кластеров) изолятов, полученных в различных точках ареала возбудителя, в соответствии с территорией, а не временем или источником изоляции вируса.
3. Определение локализации делеций в геноме данного субтипа вируса, прежде всего – в 3'-концевой области, и указание на отсутствие связи вирулентности сибирских штаммов ВКЭ-Евр. с наличием делеций.
4. Описание фенотипических характеристик сибирских изолятов ВКЭ-Евр. Показано, что штаммы ВКЭ-Евр, циркулирующие в Восточной Сибири, неоднородны по комплексу фенотипических и генетических признаков; циркулирующие в Западной Сибири – неоднородны по критериям нейровирулентности. Это согласуется с неоднородностью фенотипических и генетических характеристик вируса данного субтипа в пределах основного ареала.
5. Характеристику ландшафтных и биологических отличий очаговых экосистем Сибири, в которых циркулирует ВКЭ-Евр, от основного ареала данного субтипа вируса.
6. Предложенный вариант оценки эволюционной истории дивергенции сибирских вариантов ВКЭ-Евр. и вирусов в границах основного ареала данного субтипа, с указанием возможных сроков дивергенции.

Итогом исследования можно считать заключение о существовании природных очагов КЭ в Сибири, в которых циркулирует ВКЭ-Евр., как правило - в форме минорного варианта возбудителя. Подобные очаги вероятно имеют «реликтовый» характер и не связаны с регулярным заносом вируса восточнее Урала, как это имеет место с псевдоочагами или эфемерными очагами лихорадки Западного Нила в Западной Сибири.

Во введении обосновывается актуальность выбранной темы, цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, основные методические приемы для решения поставленных задач, достоверность полученных результатов.

В первой главе изложены вопросы таксономии флавивирусов; особенности структуры вириона вируса клещевого энцефалита; функциональные особенности вирусных белков; имеющаяся в научной литературе характеристика объекта исследования диссертанта - вируса клещевого энцефалита европейского субтипа; проблемы дивергенции в пределах группы вирусов млекопитающих, передаваемых клещами. В разделе таксономии флавивирусов приведена общая информация о структуре семейства. В разделе, характеризующем особенности структуры вириона вируса клещевого энцефалита, акцент сделан на концевые области генома, входящие в круг исследовательских интересов диссертанта, а также приводится достаточно детальная

характеристика вирусных белков с акцентом на их функциональное значение. В разделе «Характеристика Европейского субтипа вируса клещевого энцефалита» изложена информация о распространении четырех основных субтипов ВКЭ на севере Евразии с акцентом на ВКЭ-Евр.; о нозоареале КЭ в границах стран ЕС с общей характеристикой особенностей клинического течения ВКЭ-Евр.; о составе переносчиков и хозяев ВКЭ-Евр. в европейских природных очагах КЭ. В разделе «Вопросы дивергенции и эволюции вируса клещевого энцефалита» изложены доминирующие на данный момент взгляды на вопросы эволюции ВКЭ, с акцентом на происхождение и формирование ареала ВКЭ-Евр.

Во второй главе изложена информация, характеризующая объемы и происхождение использованных в исследовании материалов, а также методическую и методологическую базу исследований. Методическая часть изложена достаточно подробно и дает представление об адекватности поставленным задачам выбранных для исследования методов.

В третьей главе изложены результаты сравнительного анализа структуры геномов ВКЭ-Евр, доступных в базах данных, с наиболее близкими видами вирусов группы вирусов млекопитающих (Louping ill TBEV), передаваемых клещами, а также внутригрупповой вариабельности ВКЭ-Евр. Полученные результаты позволяют автору утверждать о наличии связи уровня гетерогенности штаммов с местом (территорией) изоляции, а не временем или источником изоляции. Так в абсолютном большинстве проанализированных случаев величина различий в структуре геномов штаммов ВКЭ-Евр., изолированных от источников одного вида или (и) в разное время на одной или близко расположенных территориях существенно превышала различия между изолятами, полученными от разных видов источников или в разное время, но с одной территории, для которых уровень гомологии превышает 99%. Следует признать обоснованным обсуждение полученных результатов с привлечением литературных данных по анализируемым вопросам непосредственно в тексте главы. Результаты исследований, изложенные в главе 3, отражены в монографии «Клещевой энцефалит в 21 в.» (2021).

В главе четвертой изложена информация по структуре геномов изолятов ВКЭ-Евр с территории Сибири. Подтверждена принадлежность сибирских изолятов ВКЭ-Евр; показана их гетерогенность по географическому критерию (западный и восточный варианты) на основании структуры 3'-концевых участков и полипротеина; показана высокая степень консервативности структуры генома сибирских ВКЭ-Евр. Важным результатом является установленное отсутствие аминокислотных замен в белке NS2B, функционально связанным с процессом репликации вирусной РНК. Результаты

исследований, изложенные в главе 4, отражены в монографии «Клещевой энцефалит в 21 в.» (2021), а также в 12 научных публикациях, в том числе в пяти, рекомендованных ВАК.

Пятая глава посвящена результатам изучения фенотипических характеристик штаммов ВКЭ-Евр, изолированных на территории Сибири. Полученные данные по гетерогенности фенотипических и генетических признаков, таких, как нейровирулентность, инвазивность, терморезистентность и термолабильность, указывают на подобие со штаммами из основного ареала вируса данного субтипа. Наличие делеции в 3'-концевой области у всех сибирских изолятов представляет интерес с позиций дальнейшего эволюционного анализа, в частности – с позиций анализа коррелированных нуклеотидных замен в структуре генома ВКЭ. Результаты исследований, изложенные в главе 5, отражены в монографии «Клещевой энцефалит в 21 в.» (2021), а также в пяти научных публикациях, в том числе в двух, рекомендованных ВАК.

В шестой главе предпринята попытка описания ландшафтно-биотопических условий в местах циркуляции ВКЭ-Евр в Сибири. Применен описательный подход с привлечением литературных и оригинальных данных. Разнообразие ландшафтно-климатических условий территорий Сибири, на которых установлена циркуляция ВКЭ-Евр., а также состав переносчиков данного субтипа ВКЭ и их прокормителей, существенно отличаются от условий существования и структуры природных очагов в границах основного ареала ВКЭ-Евр., что расширяет представление о его адаптивных возможностях. Результаты исследований, изложенные в главе 6, отражены в монографии «Клещевой энцефалит в 21 в.» (2021), а также в пяти научных публикациях, в том числе в двух, рекомендованных ВАК.

Глава седьмая посвящена вопросам эволюции ВКЭ-Евр. Изложены причины выбора использованной модели анализа эволюционных событий; описательная часть применяемых методов, не отраженная в подразделе «Методы»; результаты оценки сроков дивергенции внутри субтипа ВКЭ-Евр, в том числе – сроки формирования кластеров западно - и восточносибирского вариантов. Сроки дивергенции двух сибирских вариантов ВКЭ-Евр., полученные в результате применения предлагаемой автором модели типа эволюционной реконструкции, указывают на вероятность независимого характера их происхождения в историческом прошлом. Не исключена связь формирования очагов ВКЭ в Сибири с периодичностью хозяйственного освоения территории региона. Результаты исследований, изложенные в главе 7, отражены в одной научной публикации, а также частично - в монографии «Клещевой энцефалит в 21 в.» (2021).

В целом стиль диссертации позволяет легко воспринимать излагаемую информацию. Результаты диссертации изложены последовательно и логично связаны.

Степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждается применением как традиционных вирусологических и молекулярно-биологических методов, так и современных методов исследования и специальных методов анализа структуры геномов: полногеномного секвенирования и метода Байесовских Марковских цепей Монте-Карло. В анализе, вместе с сибирскими изолятами, использованы практически все, находящиеся в свободном доступе, последовательности геномов ВКЭ-Евр., что обеспечило достоверность и полноту исследований структуры геномов и последующих заключений по результатам исследований. Каждый из использованных методов применялся в соответствии с его функциональными возможностями, с целью обеспечения доказательности положений диссертационной работы, аргументированности и обоснованности выводов.

Замечания по работе:

1. При изоляции штаммов методом биопробы происходят определенные селективные изменения в геноме вируса, что может влиять на выявляемость хозяин-зависимых мутаций, то есть не следовало говорить об их отсутствии. Автор, отмечая наличие двух характерных аминокислотных замен у разных субтипов ВКЭ, фактически отмечает наличие вероятной связи с определенными группами хозяев (стр. 81 – 82).
2. Имеют место редакционные недоработки, в частности – не все методы анализа последовательностей генома, а также статистические (стр. 96) и биологические методы (стр. 88) отражены в подразделе «Методы»; в то же время - в тексте (напр. глава 3) не следовало дублировать информацию о применяемом методе, уже подробно изложенную в подразделе «Методы»; у некоторых рисунков не все условные обозначения отражены в примечаниях к рисункам (напр., рис. 3 автореферата, рис. 3.2 и 6.1 диссертации); в некоторых случаях (напр., табл. 3.1) название таблицы не отражает её содержание; не всегда имеет место соответствие ссылки на рисунок (напр., ссылка на рис. 4.2 на стр. 75).
3. Обращает на себя внимание, что в главе 5 при определении бляшечного фенотипа и типа генетических маркеров использованы только штаммы, изолированные от животных, и не включены штаммы (при их наличии в коллекции в ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ и использовании в других исследованиях) от иксодовых клещей. Так как изоляты от переносчиков как правило формируют мелкобляшечный фенотип, способный – при дальнейших пассажах – диссоциировать с образованием бляшек разного размера, заключение о наличии или отсутствии связи нейровирулентности с бляшечным фенотипом в случае использования таких изолятов был бы более определенным.
4. Считаю необходимым высказать ряд комментариев по результатам, изложенным в главе 7. Первое касается выбора точки отсчета для калибровки – 2019 г. Критерием

выбора диссертантом этой точки обусловлен наличием последних (по времени) в выборке изолятов, что с нашей точки зрения не вполне оправдано, так как является случайным событием. Второе – в научных публикациях (в том числе и в тех, на которые ссылается диссертант) отмечается неравноценность темпов (или скорости) эволюционных изменений в пределах субтипов ВКЭ, что следует учитывать при интерпретации результатов. Третье – результаты оценки в значительной степени могут зависеть от выбранной модели. В этой связи сопоставление результатов, полученных при применении разных моделей, могут иметь существенные различия, не обязательно связанные с тем, использованы ли фрагменты генома или полный геном. То есть результаты, изложенные в главе 7, при их ценности и научной новизне, дискуссионны.

5. Обращает на себя внимание, что фактически, из заявленных 14 штаммов из рабочей коллекции ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, всем комплексом исследований фенотипических признаков охвачены пять штаммов из Восточной Сибири, два западносибирских изолята использованы только при оценке вирулентности и инвазивности, тогда как заключение автора по результатам данных исследований распространяется на весь регион Сибири.

6. В выводе 5 понятие «...хорошие адаптивные особенности...» автором не определено, что вызывает вопрос. Следовало бы кратко конкретизировать, что автор вложил в данное понятие.

На основании вышеизложенного можно сделать следующие заключения:

1. Тема диссертации Ю.С.Охотиной актуальна; работа соответствует специальности 1.5.10 – вирусология.
2. В целом диссертация является завершенным научным исследованием, вносящим значительный вклад в решение проблем вирусологии и генетики вирусов.
3. По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 7 статей в изданиях, рекомендованных ВАК, главы в коллективной монографии и публикация в зарубежном издании (WEB of Science). Публикации в достаточной степени отражают информацию, изложенную в главах диссертации.
4. Основные результаты работы характеризуются научной новизной, заключающейся в следующем:
 - (1) Сибирские изоляты ВКЭ-Евр. формируют два кластера по географическому принципу, различающиеся составом аминокислотных замен во всех белках, кроме NS2B;
 - (2) Два сибирских варианта ВКЭ-Евр. различаются временем дивергенции с общим предком;

- (3) Сибирские изоляты ВКЭ-Евр. гетерогенны по фенотипическим признакам, что соответствует неоднородности признаков у изолятов из основного ареала возбудителя;
 - (4) Ландшафтно-климатические условия и состав переносчиков и их прокормителей в Сибири значительно отличаются от условий в очаговых экосистемах в пределах основного ареала, что характеризует высокую экологическую пластичность ВКЭ данного субтипа при сохранении высокой консервативности структуры генома вируса;
 - (5) Определены вероятные сроки дивергенции двух вариантов сибирских изолятов ВКЭ-Евр.
5. Прикладное значение исследования определяется возможностью применения информации, приведенной в базе 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.), для совершенствования подходов к мониторингу и профилактике КЭ, а также в научных исследованиях по вопросам биологии и эволюции ВКЭ.
 6. Автореферат диссертации соответствует структуре диссертации, включает все основные разделы и правильно отражает её содержание.
 7. По мере расширения базы данных (штаммов, последовательностей геномов вирусов) примененные методические подходы могут быть использованы в профильных НИИ Роспотребнадзора и РАН для проведения дальнейших исследований по филогении вирусов разных видов и групп, а результаты диссертации - в дальнейших исследованиях эволюции флавивирусов млекопитающих, передаваемых членистоногими.

Высказанные замечания не снижают достоинств диссертации, и в значительной степени имеют дискуссионный характер. Замечания по главе 5 принципиально не влияют на сделанные диссертантом по результатам исследования заключения. Основные положения работы в достаточной степени раскрыты в автореферате и опубликованных работах.

На основании вышеизложенного можно заключить, что диссертация Охотиной Юлии Сергеевны соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по действующему «Положению о порядке присуждения ученых степеней», а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология.

Отзыв на диссертацию заслушан и утвержден на заседании Ученого совета ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (протокол № 1 от 08 февраля 2024 г.).

Отзыв составил:

Д.б.н., зав. лабораторией арбовирусных инфекций отдела ПОВИ ФБУН «Омский

НИИ природно-очаговых инфекций»

Роспотребнадзора  Якименко Валерий Викторович

Подпись Якименко В.В. заверяю:

 Ученый секретарь, к.м.н., Решетникова Т.А.

 февраля 2024 г.



Федеральное бюджетное учреждение науки «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Федеральной службы в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Адрес: Мира пр., д. 7, Омск, 644080, тел. +7 (3812) 65-16-33, факс +7 (3812) 65-16-33, e-mail: mail@oniipi.org, адрес в сети интернет: www.oniipi.org