

Отзыв

официального оппонента на диссертационное исследование Хаснатинова Максима Анатольевича на тему: « Роль генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита и других клещевых патогенов в обеспечении устойчивого существования их эпидемиологически значимых природных очагов в Восточной Сибири и Монголии» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

Актуальность избранной темы.

Диссертация Хаснатинова М.А. посвящена актуальной биологической и медицинской проблеме - трансмиссивным «клещевым» инфекциям, выяснению роли генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) и других патогенов, паразитирующих, в иксодовых клещах, на устойчивость их эпидемически значимых природных очагов в Восточной Сибири и прилежащих регионах Монголии. В работе представлены результаты исследования влияния природных факторов на процессы адаптации ВКЭ к ним, которые могут влиять на генетическое разнообразие и стабильность популяции патогенных для человека микроорганизмов – классических паразитов с несколькими хозяевами - клещ, человек и ряд других, обитающих в разных экологических условиях. Поскольку автор кроме исследования выше перечисленных факторов, ставил целью использование полученных результатов для разработки эффективных мер по снижению популяции инфицированных клещей и клещевых микроорганизмов, создания эффективных средств профилактики и лечения человека актуальность избранной темы исследования несомненна.

Структура и содержание диссертации.

Структура диссертации монографического плана, традиционна по построению. Исключением является наличие двух глав литературного обзора. Кроме того она содержит 5 глав с результатами собственных исследований, их обсуждения и заключение.

Первая глава обзора посвящена биологии и циркуляции в природе вируса клещевого энцефалита, вторая – биологии и разнообразию

«основных» клещевых патогенов бактериальной природы. Не вижу особой необходимости в двух литературных обзорах, поскольку это литературный обзор к исследованию, имеющему логическое, проблемное и структурное единство. В целом литературный обзор написан таким образом, что обосновывает необходимость проведенной автором работы, в нем привлечена современная литература по теме исследования, всего более четырехсот источников, из которых зарубежных две трети. Литературный обзор завершается своеобразным резюме, в котором критически сформулированы плохо изученные современные проблемы вирусологии т.н. клещевых инфекций и их «привязки» к специфичным экологическим условиям мест обитания клещей и их прокормителей. Таким образом, обосновывается необходимость в выполненных автором исследованиях, представленных в диссертации.

В третьей главе «Материалы и методы» излагается информация о регионах сбора материала для исследования (результаты полевых экспедиций, в которых автор принимал участие), представлен материал о вероятных филогенетических взаимосвязях изолятов микроорганизмов с определенными ареалами их обитания. Представлен внушительный перечень использованных в работе образцов вирусов клещевого энцефалита и других микроорганизмов (боррелий, риккетсий и других). В этой главе представлен перечень использованных методов современных и традиционных: вирусологии, бактериологии, генетике вирусов и бактерий, при культивировании клеток, инфицированных бактериями и вирусами. Приведены описания использованных методов: создания клонов типовых штаммов ВКЭ, введения точечных мутаций в геном вирусов, создания рекомбинантных и восстановления мутированных и рекомбинантных штаммов ВКЭ, выделения ДНК и РНК, амплификации фрагментов генома с помощью ОТ-ПЦР и ПЦР, секвенирования и филогенетического анализа. Кроме того приведены описание методов титрования ВКЭ по бляшкообразующим единицам и морфологии бляшек, оценки цитопатического действия ВКЭ в культуре клеток СПЭВ, оценки стабильности вирионов, репродукции ВКЭ в клещах, репродукции ВКЭ и эффективности неvirемической трансмиссии, на которой прослеживается особый акцент в работе. Применение этих методов оправдано целью и логикой исследования, продемонстрировано в

описании результатов исследований в других главах диссертации, обсуждении и выводах и характеризует представленную работу как фундаментальное исследование по заявленной теме.

В четвертой главе приведены результаты исследования генетического разнообразия ВКЭ, боррелий и альфа-1-протеобактерий в Прибайкалье и Монголии. Следует отметить, что в этой главе уточнен регион сбора микроорганизмов (Восточная Сибирь и конкретно Прибайкалье и Иркутская область, но в Монголии – стране с огромной территорией и различными экосистемами тоже нужно было бы уточнить регион экспедиционной работы по сбору объектов исследования, тем более, что одной из задач было выявить, возможно, новые формы микроорганизмов потенциально опасных для человека.

В Прибайкалье и сопредельных территориях Монголии был выявлен широкий спектр возбудителей, переносимых клещами и их большой внутривидовой полиморфизм. Это подтверждено данными об особенностях нуклеотидных последовательностей ВКЭ в Иркутской области, Монголии и сопредельных территориях. Автор отмечает очевидную ассоциацию формирования эволюционных линий ВКЭ с географическим местом изоляции ВКЭ и представляет результаты аналитических сопоставлений геномов определенных изолятов. Автор оперирует термином «адаптированность» определенных изолятов вирусов к определенным экосистемам как фактора их изменчивости и в тоже время устойчивости, позволяющей формировать и поддерживать устойчивое существование эпидемически значимых природных очагов ВКЭ. Насколько обосновано использование этого термина, в работе по вирусологии, принимая во внимание его трактовку автором - Г. Селье применительно к животным и человеку? Это не указание на недостаток работы, а предмет возможной дискуссии. Это замечание касается и использованного автором термина - «глубоко адаптировавшийся» в данном случае в отношении вируса ВКЭ линии «886-84», опасного для здоровья человека, но крайне редко встречающегося. Какова роль этого феномена «адаптированности» или «изменчивости» в формировании устойчивого существования эпидемически значимых природных очагов ВКЭ и для чего делается особый акцент на феномене устойчивости в отношении эпидемически значимых очагов ВКЭ ?

В этой же главе приведены данные по исследованию «клещевых» боррелий, был выявлен небольшой внутривидовой полиморфизм на юге Монголии. При этом не было обнаружено взаимосвязи между геновариантами боррелий и видом хозяина. Это подчеркивает сложность понимания влияния внешних факторов на микроорганизмы, паразитирующие в иксодовых клещах особенно с учетом особенностей их трансмиссии. Согласно приведенным данным в этой главе автором было установлено, что на территориях Восточной Сибири и Монголии циркулируют три вида боррелий определенного комплекса и дана их биологическая характеристика с «привязкой» к локальным экосистемам. В этой же главе приведены данные по исследованию возбудителей «клещевых» риккетсиозов и близкородственных микроорганизмов и их эпидемической значимости. Для этого были проанализированы 45 образцов ДНК из сывороток людей, заболевших лихорадкой неясной этиологии после укуса клеща. Было выяснено, что все исследованные фрагменты геномов эволюционно близки протеобактериям. Было выяснено, что иксодовые клещи на территории Монголии заражены 5 видами микроорганизмов и зараженность клещей ими высока. В этой же главе содержатся результаты, условия и критический анализ возможностей экспериментального изучения влияния генетического разнообразия на циркуляцию клещевых патогенов в природе. Показано, что такая возможность реальна и необходима в связи с достаточно высоким в Российской Федерации уровнем заболеваемости ВКЭ.

Пятая глава диссертации посвящена изучению генетических детерминант ВКЭ и их возможной ассоциации с изменениями биологических свойств вирусов ВКЭ. Возможно, что результаты исследований в этой главе, с моей точки зрения, наиболее ценные, поскольку автор, подытоживая результаты исследований последних 20 лет, установивших значительный полиморфизм биологических свойств ВКЭ задался целью исследовать генетические механизмы их детерминации. В качестве объектов были выбраны 4 новых штамма данной группы, изолированной в Ярославской области. Было выявлено, что в основе лежат три неконсервативные мутации, каждая из которых уникальна для одного из «ярославских» ВКЭ. В основе лежат определенные замены аминокислот белка Е. Интересно, что каждая из замен сопряжена со сходными проявлениями – повышением заряда и

гидрофобности белка E. Это означает, что, возможно, открываются возможности прямых воздействий на ВКЭ с учетом этих свойств. Была выявлена относительно низкая «нейроинвазивность» этих вирусов. Кроме того было обнаружено, что все три мутации существенно повышали способность ВКЭ к невероятической трансмиссии в клещах *I. ricinus*. Продемонстрирована очевидная связь генетического разнообразия ВКЭ с географическими местами обитания клещей их различными характеристиками, температурными режимами, влажностью, наличием тех или иных «прокормителей» и пр. Возможно, что эти факторы влияют на возможность реализации того или иного вида трансмиссии, «увязанной» с характеристиками гена белка E и иных генов белков ВКЭ. Однако как в литературном обзоре, так и по ходу изложения материала не обсуждаются какие - либо механизмы влияния экосистем на геном ВКЭ в том числе и механизмы, приводящие к упомянутым заменам аминокислот в белке E. Это не только проблема вирусологии, но и общебиологическая проблема адаптации и приспособления, сохранения и образования видов, влияния разнообразных природных факторов, реализующихся неспецифическими преобразованиями генома вирусов без изменения их видовой принадлежности. Это не недостаток диссертационного исследования, а повод для дискуссии.

В главе 6 изложены результаты, продолжающие исследования, представленные в главе 5, сосредоточенные на изучении роли генетического разнообразия ВКЭ на циркуляцию вируса в условиях контролируемого эксперимента. В этой главе приведены результаты исследования влияния генетических особенностей ВКЭ на эффективность его циркуляции между зараженными и не зараженными клещами, способность рекомбинантных штаммов ВКЭ к репродукции в культурах клеток млекопитающих. Полученные результаты позволили автору заключить, что все рекомбинантные штаммы одинаково эффективно размножались в клетках млекопитающих. В этой же главе приведены данные исследований цитопатического действия рекомбинантных штаммов ВКЭ. Показано, что внедрение дополнительного гена капсидного белка С приводило к снижению способности вируса передаваться между соседними клетками, но при этом деструктивный потенциал в клеточных культурах оставался на прежнем низком уровне, что свидетельствовало о важной роли

неструктурной части генома вируса, не исключаяющей модифицирующего влияния и структурных генов. В этой же главе содержатся данные о физической стабильности рекомбинантных вирионов к таким факторам внешней среды, которые характерны для Сибири и прилегающих регионов Монголии. Речь идет о влиянии низких температур окружающей среды. Обнаружен интересный феномен. Одократный цикл замораживания-оттаивания никак не повлиял на инфекционность ВКЭ вне зависимости от генетической структуры вируса. Только после шестикратной заморозки и последующего оттаивания инфекционность вирусов снижалась на 90% после последующей 48-часовой инкубации при 37 градусах С. Это наблюдали у всех вирусов вне зависимости от генетической структуры. Напротив все вирусы вне зависимости от генетической структуры полностью сохраняли инфекционность при + 37-40 градусах С в течение 40 мин и последующей инкубации еще 40 мин. Кроме того в этой главе приведены данные исследования эффективности неvirемической трансмиссии рекомбинантных штаммов ВКЭ между клещами *I. ricinus*. В итоге автор пришел к заключению, что в процессе неvirемической трансмиссии важную регуляторную роль играет белок E. Однако по эффективности она несравнима с эффектами замены структурных генов полностью. Показано также, что репродукция клеща возможна как в зрелых клещах так и в нимфах, но в последних некоторые штаммы демонстрировали худшую эффективность. Автор исследовал способность созданных им рекомбинантных штаммов ВКЭ инфицировать лабораторных мышей и их патогенные свойства. Выяснилось, что все они обладают выраженными патогенными свойствами, но они значительно варьировали. Это обуславливало разную величину СПЖ мышей. Было выяснено, что структурные гены играют важную роль в формировании патогенных свойств ВКЭ. Обнаружено, что патогенетические свойства ВКЭ детерминированы совокупными свойствами вириона, включая оболочечный белок, премебранный белок и капсид.

В главе 7 представлены результаты изучения роли генетического разнообразия ВКЭ в обеспечении устойчивой циркуляции вируса в природе – одной из главных составляющих цели работы, судя по названию диссертационного исследования, которую можно рассматривать и как главный фактор сохранения биологического

разнообразия в природе, в данном случае ВКЭ. Она содержит своего рода критический микроозор работ предшественников, касающихся решения той же проблемы, важной с эпидемиологической точки зрения. В модельных условиях была установлена важная роль эффективности неvirемической трансмиссии ВКЭ в устойчивой циркуляции вируса в экосистеме и показаны ее пороговые значения. Но с практической точки зрения автор рассматривает полученные результаты как теоретическое подтверждение потенциальной возможности контроля популяции ВКЭ вплоть до полной элиминации ВКЭ без его физического уничтожения и позвоночных хозяев. Ценными в этой главе представляются мысли автора о тех мероприятиях, с помощью которых могла бы быть достигнута цель уменьшения, или уничтожения ВКЭ с позиций четкого понимания их биологии, процессов его взаимодействия с организмами прокормителями и всех их со средой обитания.

В заключении автор делает важные выводы о том, что практически любой штамм ВКЭ может стать высоко патогенным для человека за очень короткий промежуток времени. Он сформулировал актуальные направления работ по контролю заболеваний, передающихся через укус клещей. В частности указывает на необходимость разработки новых методов снижения зараженности клещей в экосистемах. Он указывает на важную роль неvirемической трансмиссии в процессах циркуляции «клещевых» патогенов и важной роли белка оболочки Е во взаимодействии ВКЭ с клетками потенциального хозяина. Сделан акцент на возможности направленного блокирования взаимодействия структурных белков ВКЭ с клетками хозяина равно также как и других патогенов, паразитирующих в иксодовых клещах.

«Научная новизна исследований»

Автор проделал объем работы, значительно больший запланированного особенно в первой задаче в связи с обнаружением большего разнообразия микроорганизмов – паразитов в клещах ранее не описанных. Автором обнаружено, что на территориях Восточной Сибири и Монголии циркулируют единые популяции двух патогенов. Автором в Монголии выявлены вирусы клещевого энцефалита - его изоляты, опасные для человека. Обнаружено, что при адаптации ВКЭ к новому хозяину возникают мутации в критических аминокислотных

позициях белка E на поверхности вириона, вызывающий сдвиг заряда (куда конкретно? или гидрофобности (что с ней?) поверхности вириона (представляют интерес вероятные механизмы). Впервые созданы рекомбинантные штаммы ВКЭ Сибирского и Европейского субтипов. Впервые выявлены условия возможности устойчивой неvirемической трансмиссии ВКЭ и условия, блокирующие передачу ВКЭ между зараженными и незараженными клещами. Это представляется чрезвычайно интересным и важным с точки зрения разработки принципов и средств борьбы с ВКЭ. Впервые созданы рекомбинантные штаммы ВКЭ Сибирского и Европейского субтипов. Показано, что снижение неvirемической трансмиссии до 27% и ниже снижает у ВКЭ европейского субтипа устойчивую циркуляцию в определенной популяции. Впервые доказано, что ВКЭ линии «886-84» опасен для человека. Впервые в эксперименте доказано, что возникшие при адаптации ВКЭ точечные мутации в критических аминокислотах белка E ВКЭ экспонированы на поверхности вириона и вызывают сдвиг заряда и/или гидрофобность поверхности вириона, что сопряжено с повышением эффективности продукции и неvirемической трансмиссии ВКЭ в клещах. Это свойство препятствует формированию способности к формированию устойчивых природных популяций. Впервые установлено, что устойчивая неvirемическая трансмиссия ВКЭ возможна только при точном соответствии целого региона генома кодирующего 5'НТР, капсидный белок С, некоторые мембранные и оболочечные белки. Впервые проведен теоретический анализ влияния генетического разнообразия ВКЭ на устойчивость циркуляции вируса в природе.

«Теоретическая и практическая значимость результатов»

Диссертационное исследование содержит целый ряд новых данных, имеющих большую ценность для практики научных исследований в областях: вирусологии, методологии научных исследований, паразитологии молекулярной генетики, биологии, паразитологии, эпидемиологии и медицины. Работа имеет безусловно большое теоретическое и практическое значение для вирусологии, паразитологии, эпидемиологии, разработки средств борьбы с ВКЭ и другими микроорганизмами, паразитирующими в клещах, для систематологии ВКЭ. Автором разработано и внедрено в практику Центра профилактики клещевых инфекций ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ 10 баз

данных и несколько программ для ЭВМ «WEB-сервис импорта данных из реляционных таблиц в CSV», получен патент на изобретение РФ и три патента Монгольской республики. Результаты совместных исследований внедрены в государственные стандарты эпидемиологического надзора, диагностики и лечения клещевого энцефалита и клещевого боррелиоза в Монголии. Наработки автора в этой области включены в ряд баз данных и защищены патентами России и Монголии. Расшифровано и проанализировано более 100 нуклеотидных последовательностей ВКЭ и других клещевых микроорганизмов, сведения о 91 из которых депонированы в международную базу данных GenBank. Полученные материалы автора используют в процессе обучения студентов в Иркутском государственном университете и Иркутской государственной сельскохозяйственной академии.

Материалы диссертации широко опубликованы – в 31 журнальной статье из перечня изданий, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ и 9 в зарубежных, рецензируемых журналах, имеются свидетельства на 1 патент РФ и 7 зарегистрированных удостоверений ФС по интеллектуальной собственности РФ, а также 3 патента на изобретения Республики Монголии. Работа выполнялась при широком межинститутском сотрудничестве в РФ и с зарубежными коллегами в Азии и в Европе, монгократно опробирована на различных научных форумах в РФ и за рубежом. Работа поддержана несколькими грантами в РФ и за рубежом.

«Основные положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации».

Основные положения это «укрупненные» выводы их 6, выводов 9. Их несколько больше, чем задач, что логично, поскольку в процессе выполнения исследований появились новые данные, по поводу которых были проведены аналитические исследования и сформулированы выводы и научные положения, которые, безусловно, основаны на материалах собственных исследований автора. В целом они не вызывают возражений, или сомнений. Но «положение» 5 сформулировано таким образом, что значимым фактором формирования (может быть сохранения?) генетического разнообразия ВКЭ, является адаптация (что это такое в данном случае?) вируса к процессу, происходящему с его участием («невременической передачи»

чего-то?) между доминирующими в данном регионе клещами. Необходимо редакционное уточнение. В «Положении» 6 написано, что устойчивость природных очагов КЭ зависит от эффективности неvirемической трансмиссии местных популяций клещей (зависимость абсолютная ли и касается это только местных популяций клещей?). Хотелось бы по этому вопросу получить пояснение. Не ясно из «Положений» и выводов какими механизмами экологическая среда обитания клещей детерминирует генетическое разнообразие ВКЭ у разных субтипов клещей и если это адаптивный процесс, то как это влияет на устойчивость существования эпидемиологически значимых природных очагов ВКЭ и других патогенов. Это необходимо обсудить в дискуссии, возможно, это редакционный недостаток или стремление к краткому изложению.

В автореферате представлены основные материалы диссертации, на которых основаны ее научные «положения» и выводы. Достоверность материалов, изложенных в диссертации и автореферате не вызывает вопросов и сомнений.

Работа выполнена при широком сотрудничестве с рядом научных учреждений в России и других странах, широко апробирована на разных научных форумах в России и за ее пределами, где автор также хорошо известен. Материалы диссертации опубликованы в 31 журнальной статье в изданиях, рекомендованы ВАК для публикации материалов докторских диссертаций. Из них 9 статей опубликовано в зарубежных журналах, издана одна методическая рекомендация.

Таким образом, основываясь на изложенном, можно заключить, что диссертационное исследование Хаснатинова Максима Анатольевича на тему: «Роль генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита и других клещевых патогенов в обеспечении устойчивого существования их эпидемиологически значимых природных очагов в Восточной Сибири и Монголии», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, является законченным научным исследованием, обладающим очевидными признаками проблемной и логической целостности, выполненным лично автором и соответствующим по содержанию выбранной специальности 03.02.02. – вирусология.

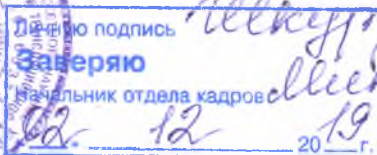
Представленная работа является крупным международного масштаба научным исследованием, совокупность фундаментальных результатов которого вносит большой вклад в понимание феномена генетического разнообразия вирусов т.н. клещевого энцефалита и ряда других микроорганизмов, паразитирующих в них и связи этого феномена с характеристиками экосистем – мест обитания клещей и вирусов, влияющих на их генетическую изменчивость. В связи с широкой географической распространенностью клещей и микроорганизмов, паразитирующих в них, человеке и других организмах различного вида результаты, полученные автором могут быть использованы для международных научных исследований в борьбе с этими паразитами с использованием результатов и идей автора по регуляции численности клещей и других патогенов, паразитирующих в них, а также для разработки средств лечения людей, укушенных клещами с этими патогенами.

Все изложенное позволяет заключить, что диссертационное исследование Хаснатинова М. А. является крупным научным достижением, в котором совокупность фундаментальных теоретических положений, результатов и перспектив их приложения в практике вирусологических исследований позволяет квалифицировать его как научное достижение, внесшее большой вклад в теоретическую и практическую вирусологию «клещевых» энцефалита и других инфектов, опасных для человека, соответствующим требованиям, предъявляемым к диссертационным исследованиям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор заслуживает этой искомой им ученой степени.

Официальный оппонент - заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, научный руководитель ФИЦ ФТМ, главный научный сотрудник - руководитель отдела общей патологии НИИ ЭКМ ФИЦ ФТМ, профессор

Шкурупий Вячеслав Алексеевич.

02.12.19.



Шкурупий В.А.
Начальник отдела кадров
12 20 19 г.