

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Рябчиковой Елены Ивановны на диссертацию 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», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

Актуальность диссертационного исследования Максима Анатольевича Хаснатинова обусловлена, прежде всего, высокой опасностью переносимых клещами инфекций, распространенных по всему миру и, главное, на всей территории России, а также отсутствием надежных высокоэффективных средств профилактики и лечения этих инфекций. Клещевой энцефалит и болезнь Лайма (клещевой боррелиоз), клещевой риккетсиоз, моноцитарный эрлихиоз человека и гранулоцитарный анаплазмоз человека – основные трансмиссивные инфекции, переносимые клещами, явились предметом диссертационного исследования М.А. Хаснатинова.

Диссертационная работа Хаснатинова М.А. демонстрирует **новые теоретически значимые** результаты, прежде всего, касающиеся роли генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита в поддержании его стабильно существующих природных популяций и связи высокой адаптации комплекса вирусных структурных белков к организму специфичного клеща-переносчика. Автором выдвинут теоретический постулат о том, что направленное блокирование взаимодействия поверхностных белков вируса с клетками хозяина в естественных популяциях клещей с высокой вероятностью нарушит процесс невиремической трансмиссии клещевых микроорганизмов и приведет к существенному снижению зараженности клещей ВКЭ в природе, который обоснован экспериментально и не вызывает критики. **Достоверность полученных результатов** и выводов диссертационной работы М.А. Хаснатинова не вызывает сомнений, она основана на комплексном анализе биологических характеристик возбудителей клещевых инфекций, использовании спектра всех возможных методов исследования и большом объеме экспериментального материала. **Практическая значимость работы** определяется возможностью использования полученных в работе данных

для разработки современных способов контроля возбудителей и профилактики вызываемых ими заболеваний. Разработанные на основе результатов диссертационного исследования базы данных, информационные материалы, программы и патенты свидетельствуют о глубокой проработке автором экспериментального материала и стремлении довести данные фундаментальных исследований до применения в эпидемиологических и медицинских учреждениях. Несомненно, высокой оценки заслуживает вклад автора в разработку системы контроля клещевых инфекций в Монголии.

Характеристика диссертации. Диссертационная работа Хаснатинова Максима Анатольевича представляет собой законченное исследование, оформление которого отвечает всем требованиям, предъявляемым к оформлению докторских диссертаций. Работа включает введение, обзор литературы, 5 глав собственных исследований, заключение и выводы, список литературы, содержащий 411 источников, в том числе 106 – на русском, и 305 – на иностранных языках.

Во введении убедительно показана актуальность темы диссертационной работы и степень её разработанности, приведены сведения о практической и теоретической значимости работы. В этом разделе автор четко формулирует цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, приводит характеристики диссертационной работы, сведения о публикациях и личном вкладе в работу.

Обзор литературы в целом обосновывает постановку задач диссертационного исследования и представляет собой компактное изложение известных сведений о биологических характеристиках возбудителей клещевых инфекций. Описаны как сами возбудители, так и их хозяева, приведены особенности их взаимодействия. Несомненно, положительным моментом являются сведения о времени публикации тех или иных представлений о биологии возбудителей, их классификации и молекулярных особенностях, а также анализ этих представлений в свете последних научных данных. Текст «Обзора» хорошо структурирован, изложение материала конкретно и понятно, однако, для наглядности было бы неплохо включить схему формирования частиц вируса клещевого энцефалита в клетке и другие иллюстрации. Считаю, что «Обзор» целесообразно издать в качестве справочного пособия для исследователей, врачей и эпидемиологов, дополнив иллюстративным материалом.

Глава «**Материалы и методы**» содержит подробные сведения об использованных в работе экспериментальных объектах (2839 клещей вида *I. persulcatus* и 815 клещей рода *Dermacentor*; 15 природных штаммов вируса клещевого энцефалита; 13 искусственно созданных штаммов и 4 образца РНК, выделенных из клещей *I. persulcatus* и мозга погибшего больного). В работе также использовано 6 изолятов *B. burgdorferi sensu lato* от клещей *I. persulcatus* из Монголии и 15 образцов ДНК боррелий из Монголии и Иркутской области; 40 микроорганизмов пор. *Rickettsiales*, инфицирующих клещей *I. persulcatus*, *D. nuttalli* и *D. Silvarum* (в виде образцов ДНК, полученных из суммарной ДНК клещей).

Для решения поставленных задач Хаснатиновым М.А. был применен комплекс взаимодополняющих методов: зоолого-паразитологических (учет численности, отлов, определение видовой принадлежности иксодовых клещей и мелких млекопитающих); молекулярно-генетических (обратная транскрипция, ПЦР, секвенирование, молекулярное клонирование фрагментов генома микроорганизмов в плазмидных бактериальных векторах, технология инфекционного клонирования флавивирусов, модификация вируса с помощью направленного мутагенеза), вирусологических и микробиологических методов (прямая микроскопия, РНИФ, РГА, РТГА, реакция нейтрализации, оценка вирулентности и эффективности репродукции ВКЭ в животных моделях, оценка трансмиссии при экспериментальной инфекции клещей *I. ricinus*) а также статистических методов. Для введения точечных мутаций в геном Vs IC автором разработана методика мегапраймер-опосредованной химеризации вирусов.

Все использованные методы подробно описаны, текст дает исчерпывающее представление о сути исследований, как на молекулярном, так и на организменном уровне. В целом использованный комплекс методов позволил автору в полной мере проанализировать биологические особенности возбудителей клещевых инфекций и получить релевантную базу экспериментальных данных для построения выводов и заключений.

Изложение **результатов** диссертационной работы Максима Анатольевича начинается с исследования генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, и альфа-1-проектобактерий в Прибайкалье и Монголии и обоснования роли генетического разнообразия как фактора

формирования стабильных популяций микроорганизмов в специфических эколого-географических условиях. Генетическое разнообразие вируса клещевого энцефалита было проанализировано с использованием фрагмента гена E длиной 339 н.о. кодирующего позиции 108–220 белка E и захватывающего основные аминокислотные маркеры субтипов вируса клещевого энцефалита. Выбор данного фрагмента позволил автору проанализировать генетическое разнообразие большого количества изолятов вируса. Полученные данные представляют интерес, как для вирусологии, так и для разработки вакцин и диагностических препаратов.

Видовое разнообразие и генетическая вариабельность возбудителей клещевого боррелиоза *B. burgdorferi sensu lato* в Прибайкалье и Монголии оценивались с использованием четырех хромосомных и плазмидных локусов. Ген 16S rRNA был выбран как наиболее консервативный фрагмент генома, позволяющий однозначно определить вид *B. burgdorferi sensu lato*. Гены p83/100 и OspA кодируют соответствующие мембранные белки, экспонированные на поверхности клеток боррелий, которые являются их иммунодоминантными антигенами, что обуславливает практическую значимость оценки их разнообразия для диагностики клещевого боррелиоза. В работе приводятся данные исследований полиморфизма *B. garinii* и *B. afzelii* на основе анализа структуры межгенного спейсера 5S-23S rRNA и структуры гена p83/100. Наличие внутривидового полиморфизма в гидрофильном участке p83/100 важно учитывать при его использовании в диагностических системах.

Большое значение для микробиологии и эпидемиологии имеют исследования разнообразия микроорганизмов порядка *Rickettsiales* в Прибайкалье и Монголии, проведенные Максимом Анатольевичем. Использование современных методов молекулярно-генетического анализа позволило установить присутствие в клещах видов *R. sibirica*, *R. raoultii*, *E. muris*, "*Montezuma*" и *Candidatus R. tarasevichiae*. Высокие показатели инфицированности клещей (до 70 % клещей рода *Dermacentor* sp. и 30-40 % клещей *I. persulcatus*) указывают на необходимость дальнейшего изучения этих микроорганизмов в связи с клещами и выяснения их реальной опасности для людей.

На основе данных о генетическом разнообразии и молекулярно-биологических особенностях возбудителей клещевых инфекций М.А.

Хаснатиновым проведена оценка возможностей экспериментального изучения влияния генетического разнообразия на циркуляцию клещевых патогенов в природе, показавшая необходимость высокоспецифичной экосистемы, включающей определенный набор видов позвоночных и беспозвоночных хозяев для устойчивой циркуляции клещевых инфекций.

На модели вируса клещевого энцефалита автором установлено, что ряд биологических свойств вируса (гемагглютинирующая активность, способность к репродукции в клетках млекопитающих и иксодовых клещей, эффективность неvirемической трансмиссии) зависит от свойств белка Е и могут изменяться вследствие несистематических, спонтанных мутаций. Важно отметить, что эти мутации локализованы в локусах белка Е, экспонированных на поверхности вириона, и приводят к увеличению гидрофобности его поверхности, а главное - не совпадают с систематическими маркерными аминокислотными заменами, отражающими адаптацию вируса клещевого энцефалита к специфическому спектру хозяев.

Полученные Хаснатиновым результаты убедительно свидетельствуют о высокой степени адаптации вируса клещевого энцефалита к определенному виду клещей и о краеугольной роли этого фактора в циркуляции вируса и, соответственно, в степени его опасности для человека. Установленная роль белка Е вируса также важна для понимания его биологических свойств. Проведенные автором эксперименты с рекомбинантными штаммами вируса клещевого энцефалита показали принципиальную возможность направленно влиять на его биологические свойства и, в конечном счете, на степень зараженности клещей. Несомненно, эти результаты далеки от практического применения, однако, установленная возможность влиять на эволюционно сложившуюся пару клещ-вирус, позволяет вести дальнейшие исследования и поиск способов снижения заболеваемости клещевым энцефалитом.

Иллюстрации и таблицы, приведенные в главе «Результаты», соответствуют и дополняют изложенный в тексте материал.

В «**Заключении**» М.А. Хаснатинов обобщает полученные данные, текст «Заключения», как всей диссертации, написан четко, понятным языком.

Выводы, сделанные в диссертационной работе, адекватны полученным результатам, а их формулировки конкретны.

Материалы автореферата диссертационной работы и 31 опубликованных в журналах из перечня ВАК РФ работ адекватно отражают содержание диссертационной работы М.А. Хаснатинова. Работа прошла успешную апробацию на всероссийских и международных конференциях.

В целом следует заключить, что Максимом Анатольевичем проделана огромная экспериментальная и теоретическая работа, в результате которой сформированы четкие представления о биологических свойствах возбудителей клещевых инфекций и их связи с параметрами генома, взаимодействии микроорганизмов с естественными хозяевами – клещами. Следует отметить глубокую проработанность экспериментального материала, его теоретический анализ и очень четкое изложение каждого раздела работы, что свидетельствует о высокой квалификации соискателя.

К диссертационной работе Хаснатинова М.А. нет замечаний по её сути, однако приходится отметить большое количество опечаток-ошибок. Также следует отметить неправильное оформление подписей к ряду рисунков: рисунки в отечественной литературе сопровождаются подписями, использование слова «легенда» - неправильно. Ошибочно также приводимое на стр. 21 название «перинуклеарный эндоплазматический ретикулум».

Заключение: диссертация 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 законченной научно-исследовательской работой, в которой автором получены новые оригинальные данные о генетическом разнообразии возбудителей клещевых инфекций, их биологических свойствах и взаимоотношениях с природными хозяевами, а также сделаны глубокие теоретические обобщения. Представленные в диссертационной работе данные имеют важное значение для вирусологии, микробиологии и эпидемиологии. По актуальности, новизне, теоретической и

практической значимости, методологическому и методическому уровню диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора биологических наук, согласно пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., а её автор, Хаснатинов Максим Анатольевич, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Рябчикова Елена Ивановна,

профессор, доктор биологических наук,

заведующая группой микроскопических исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

Для телеграмм: Новосибирск 90, ИХБФМ

Телефон: (383) 363-51-50 Факс: (383) 363-51-53

E-mail: lenryab@niboch.nsc.ru

Сайт группы: <http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/structure/labs/microscop>

Согласна на включение в аттестационное дело и дальнейшую обработку моих персональных данных.

Подпись Рябчиковой Е.И. заверяю

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН

К.х.н.



П.Е. Пестряков