

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Марии Юрьевны Пахаруковой на диссертацию **Ляпуновой Натальи Андреевны «Особенности репродукции вируса клещевого энцефалита в перевиваемых линиях клеток диких млекопитающих – резервуарных и случайных хозяев вируса»,** представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

### **Актуальность темы диссертационной работы**

Высокая актуальность исследования клещевых инфекций подчеркивается в первую очередь их высокой распространенностью и стабильно высокой заболеваемостью клещевыми инфекциями среди населения.

Направление исследований по созданию новых модельных систем на основе клеток позвоночных резервуарных хозяев, отражающих естественный ход инфекции и адаптацию зоонозных вирусов к их хозяевам, является важным и современным. Сама идея сравнения природных и случайных хозяев вируса ВКЭ и выяснения механизмов, которые стоят за особенностями репродукции и адаптации подчеркивает актуальность темы диссертационной работы и придает исследованию, как фундаментальный, так и прикладной характер. Таким образом, диссертационная работа Ляпуновой Н.А. представляется весьма актуальной и востребованной работой.

Основное внимание в своей работе Наталья Андреевна сосредоточила на исследовании особенностей и сравнении динамики основных стадий репродукции

ВКЭ в клетках почек, полученных от резервуарных и случайных хозяев (на моделях восточноазиатской лесной мыши и сибирской ночницы).

Для достижения поставленной цели автором был проведен большой объем исследований, направленных на оценку цитопатического действия ВКЭ, динамику репликации РНК, синтеза вирусного полипротеина и репродукции вируса в условиях различной множественности заражения в культурах клеток почки случайных и резервуарных хозяев.

### **Основные результаты выполненной работы, их достоверность и научная новизна**

Автору удалось продемонстрировать, что изучаемые культуры клеток почки случайного (*Myotis sibiricus*) и резервуарного хозяина (*Apodemus peninsulae*) обладают стабильными культуральными характеристиками, и могут быть использованы для наработки вируса клещевого энцефалита.

Автором также впервые продемонстрировано, что культуры клеток различаются степенью цитопатического ответа на вирусную инфекцию и чувствительностью к заражению при средней множественности инфекции вирусом клещевого энцефалита. Кроме того, автор показала, что при низкой множественности инфекции при сопоставимости динамики синтеза +РНК ВКЭ и динамики продукции инфекционного вируса, наблюдается значимые различия в продукции вирусного антигена и цитопатическом действии вируса.

Автором также впервые показано, что при наработке вируса в культуре клеток почки *Apodemus peninsulae* наблюдались мутации в генах белков NS4A и NS4B4.

При наработке вируса в культуре клеток почки *Myotis sibiricus* были найдены мутации в генах других белков – E и NS4A.

Все вышесказанное указывает на новизну и научную ценность полученных результатов.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа Ляпуновой Н.А. построена по классической схеме. Она состоит из введения, одной главы обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения и выводов, списка литературы. Работа изложена на 134 страницах, иллюстрирована 8 рисунками и 10 таблицами. Список использованной литературы содержит 272 источника.

Раздел «Введение» содержит все необходимые подразделы: «Актуальность темы исследования», «Степень разработанности», «Цели и задачи», «Научная новизна», «Теоретическая и практическая значимость работы», «Методология и методы исследования», «Положения, выносимые на защиту», «Степень достоверности и апробация работы», «Личный вклад автора». В целом, глава «Введение» написана убедительно, все положения хорошо обоснованы.

Обзор литературы посвящен современному состоянию исследований разнообразия клещевых инфекций, их эпидемиологической значимости. Кроме того, в обзоре литературы освещены основные вопросы и представления о циркуляции ВКЭ между позвоночными и беспозвоночными резервуарными хозяевами, обилию видов хозяев. Отдельное внимание автор уделил описанию *in vitro* моделей для

культивирования и изучения вируса клещевого энцефалита, включая клеточные линии диких грызунов, рукокрылых, а также клеточные линии клещей.

Глава «Материалы и методы» содержит описание большого перечня разнообразных методов исследований: цитологические, молекулярно-генетические, вирусологические. Нужно отметить, что при выполнении работы Наталья Андреевна продемонстрировала умение комбинировать различные методические подходы, что позволило ей получить большой объем взаимно дополняющих данных.

Глава «Результаты» хорошо иллюстрирована, все рисунки и таблицы понятны и полностью соответствуют полученным результатам.

Тем не менее к работе есть несколько замечаний:

1. Во Введении (стр. 13) автор указывает метод изучения фенотипических проявлений в культурах клеток как молекулярно-генетический метод, хотя это не является молекулярно-генетическим методом.
2. В диссертации отсутствуют следующие характеристики клеточных моделей: из какого именно клеточного типа (эпителиальный, мезенхимальный, эндотелиальный типы) были получены культуры клеток, отсутствует информация о том, как именно получали перевиваемые культуры. Кроме того, неизвестно, какие критерии были использованы для доказательства, что клетки были получены от одного и того же типа клеток изначально. В частности, отсутствуют такие характеристики, как белковые маркеры, кариотип, скорость удвоения клеток, число митозов, плоидность и т.д.

3. В тексте диссертации встречаются опечатки и неудачные выражения. Отдельно стоит отметить наличие выражений, как «Клеточная линия красной полевки» Или «Покрытие элайнмента».

Тем не менее, обозначенные выше недостатки изложения диссертации не портят общее впечатление о выполненной работе и не влияют на ее окончательную оценку.

### **Заключение**

Следует отметить многообразие методов проведенного исследования. Совокупность представленных экспериментальных данных и теоретических положений позволяет квалифицировать работу Ляпуновой Н.А. как добротное и качественное исследование, выполненное на достаточном по объему материале. Направление выполненного исследования и его содержание соответствует выбранной специальности. Содержание автореферата соответствует материалам, представленным в диссертации, и полностью отражает суть проведенного исследования.

Ляпунова Н. А. представила материалы, изложенные в работе, на 2 российских конференциях, список опубликованных работ по теме диссертации состоит из 5 пунктов. Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов диссертации не вызывают сомнений. Автор хорошо владеет современной литературой по тематике, задачи исследования были полностью решены.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная работа

соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, критериям пунктов 9-11, 13 и 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года № 842, с изменениями постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а ее автор, Ляпунова Наталья Андреевна, заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.02 – вирусология».

Официальный оппонент: Пахарукова Мария Юрьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), +7 (383) 363-49-63 (дополнительный 2210); +7-913-394-66-69;

E-mail: pmaria@yandex.ru;

Адрес института: Новосибирск, 630090, проспект Лаврентьева 10

Домашний адрес: Новосибирск, 630090, улица Ильича, д. 3, кв. 8

*Подпись*  
*Заверено*

*М. Ю. Пахарукова*

*Ученый*

*секретарь*

*Ивет СО РАН*

*Галина*

*Владимирова*

