

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата биологических наук Чичериной Галины Сергеевны на диссертацию Ляпуновой Натальи Андреевны «Особенности репродукции вируса клещевого энцефалита в перевиваемых линиях клеток диких млекопитающих – резервуарных и случайных хозяев вируса», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

Актуальность.

Клещевой энцефалит остается серьезной угрозой для здоровья населения Российской Федерации – ежегодно регистрируется порядка 2000 случаев КЭ, при этом заболеваемость остается стабильной на протяжении последних 20 лет, несмотря на предпринимаемые меры профилактики. Высокая эпидемическая значимость КЭ обуславливает интенсивное изучение эпидемиологических, клинических и эколого-вирусологических исследований этой инфекции. Поученные ранее многими исследователями данные свидетельствуют о существенных изменениях как в эпидемиологии КЭ, так и в экологической структуре природных очагов инфекции. Отмечается растущее вовлечение в эпидемический процесс городского населения, расширение ареала обитания вируса, его переносчиков и резервуарных позвоночных хозяев, изменение патоморфоза клиники заболевания, увеличение распространенности антропоургических очагов. Существенно возросли знания о генетическом разнообразии вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) – в настоящее время описано, по меньшей мере, 3 субтипа ВКЭ, при этом разные авторы выделяют до 8 генотипов вируса. Однако сих пор не в полной мере исследованы взаимовлияние между эпидемиологическими и клиническими проявлениями инфекции, структурой вирусных популяций и ландшафтно-экологическими особенностями природных очагов КЭ. Недостаточно изучены процессы естественной циркуляции вируса и роль разных видов позвоночных и беспозвоночных хозяев в формировании вируса. С учетом этих пробелов в современных знаниях об этом опасном заболевании, работа Н.А. Ляпуновой обладает несомненной актуальностью.

Научная новизна и практическая значимость

Научная новизна исследования Н.А. Ляпуновой не вызывает сомнений. Впервые проведено сравнительное исследование репродукции клещевых флавивирусов в перевиваемых клеточных линиях восточноазиатской лесной мыши (ApnK) и сибирской ночницы (MdbK). Показано, что изучаемые клеточные линии могут быть использованы как стабильные *in vitro* модели репродукции ВКЭ в клетках млекопитающих – резервуарного и случайного хозяев вируса. Также впервые получены сравнительные

данные о персистентной инфекции ВКЭ в перевиваемых клеточных линиях разных видов и экологических групп млекопитающих. Кроме этого, на примере культуры клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ показано, что сильное цитопатическое действие (ЦПД) вируса либо уничтожает популяцию клеток-хозяев, либо приводит к освобождению клеточной линии от вирусной инфекции. В работе также была показана устойчивая циркуляция неинфекционной вирусной +РНК в клетках млекопитающих, не вырабатывающих инфекционный ВКЭ. Получена новая информация об изменении генома ВКЭ в процессе адаптации к клеткам животных разных видов. Выявлены видоспецифичные аминокислотные замены белках М, Е, NS1, NS3, NS4A, NS4B и NS5. Впервые получены данные о специфической роли белков NS4A и NS4B в процессах адаптации ВКЭ к клеткам резервуарных и случайных хозяев. Показано, что белки С, NS2A и NS2B остаются неизменными на протяжении по меньшей мере 6 месяцев при адаптации вируса к новым хозяевам. Работа обладает определенной **практической значимостью**, поскольку изученные клеточные линии могут быть использованы в качестве субстратов для производства вирусных антигенов. Эта возможность практического применения подтверждается получением автором патента на производство антигена ВКЭ с помощью клеточной линии восточноазиатской лесной мыши. Полученные данные о структуре генома ВКЭ и млекопитающих могут быть использованы в научных и прикладных исследованиях в биологии и биомедицине.

Достоверность результатов исследований.

Достоверность результатов исследований Н.А. Ляпуновой не вызывает сомнений. Достоверность обеспечивается продуманным дизайном исследования, большим объемом экспериментальных данных, многократным воспроизведением экспериментов, использованием корректных контрольных образцов, а также обоснованным использованием надлежащих методов статистической обработки результатов.

Результаты исследований Н.А. Ляпуновой опубликованы в 5 статьях в журналах, рекомендованных ВАК РФ, из которых 2 реферируются в базе данных Web of Science. Материалы диссертации представлены на 8 специализированных международных и всероссийских научных конференциях.

Общая характеристика работы.

Диссертационная работа Ляпуновой Н.А. имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, а также трех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 134 страницах, содержит 10 таблиц и проиллюстрирована 8 рисунками.

Список использованной литературы включает 272 источника, из которых 71 - на русском, 197 - на английском и четыре - на других иностранных языках.

Во **введении** автор обосновывает актуальность проведенного исследования, четко определяет цель и ставит задачи исследования и публикует положения, выносимые на защиту. Присутствуют необходимые разделы, описывающие степень разработанности темы, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, методологию и методы исследования, степень достоверности и апробацию результатов, личный вклад автора, структуру диссертации.

Обзор литературы является компактным анализом известной к настоящему времени информации и в целом хорошо обосновывает как актуальность исследования, так и адекватность выбранных методов. Автор кратко раскрывает эпидемиологическую значимость исследуемого патогена, дает развернутую биологическую характеристику вируса, на современном уровне знаний описывает основные экологические особенности циркуляции ВКЭ в природе, включая спектр позвоночных и беспозвоночных хозяев и основные пути передачи вируса, анализирует роль различных элементов природного очага в циркуляции вируса. Отмечены пробелы в современных знаниях экологии вируса. Далее автором проводится углубленный анализ современных подходов к изучению биологии ВКЭ с особым вниманием к моделированию инфекции в клеточных культурах. Большая часть использованной для анализа литературы современна и содержит актуальные данные, при этом автор не упускает из внимания и ранние основополагающие работы по эпидемиологии и биологии ВКЭ.

Глава **Материалы и методы** изложена подробно и свидетельствует о корректности проведенных экспериментов. В работе исследован низкопассажный изолят ВКЭ Сибирского субтипа, полученный из природных сообществ Восточной Сибири. Это хорошо согласуется с выбранными модельными системами – обе модельные клеточные линии получены от животных, отловленных в том же самом регионе и являющихся фоновыми видами в своих биотопах. Клеточные линии также использованы на ранних пассажах с минимальным количеством культуральных манипуляций. Данный состав объектов исследования позволяет ожидать, что полученные результаты будут более полно отражать естественные процессы взаимодействия ВКЭ с клетками позвоночных хозяев разных видов. В качестве модели сравнения выбрана классическая лабораторная модель КЭ – клетки почки эмбриона свиньи СПЭВ, что позволяет адекватно оценить общий ход экспериментов и обеспечивает своеобразный «контроль качества» работы. Н.А. Ляпуновой использован широкий спектр цитологических (культивирование клеток млекопитающих, изучение морфологии клеток с помощью световой микроскопии

окрашенных препаратов), молекулярно-генетических (изучение фенотипических проявлений в культурах клеток млекопитающих, обратная транскрипция, количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР), NGS-секвенирование, молекулярное клонирование фрагментов вирусного генома в плазмидных бактериальных векторах, T7-транскрипция) и вирусологических (прямая микроскопия, оценка вирулентности и эффективности репродукции ВКЭ в клеточных моделях; иммуноферментный анализ) методов. Эксперименты выполнены в 3-4 независимых биологических повторах, что достаточно для достоверной оценки различий между сравниваемыми клеточными линиями. Для анализа полученных результатов автором применены общепринятые статистические методы. Для оценки вариабельности признаков рассчитывалось стандартное отклонение средних значений, выпадающие значения исключались с помощью квартильного метода, статистическая значимость различий оценивалась по U-критерию Манна – Уитни или t-критерию Стьюдента в зависимости от свойств анализируемых выборок, наличие и направление взаимосвязей оценивалось с помощью корреляционного анализа Спирмена.

Глава 3 содержит результаты собственных исследований автора, направленных, с одной стороны, на характеристику использованных клеточных линий, а с другой стороны – на сравнительную характеристику протекания острой инфекции ВКЭ с множественностью инфекции 10 БОЕ на клетку. С помощью анализа фрагментов генома верифицирована видовая идентичность клеточных линий, сформированы рабочие стоки клеток. Установлено, что культура клеток случайного хозяина менее чувствительна к заражению ВКЭ, цитопатическое действие вируса не выражено, гибели клеток вследствие заражения ВКЭ не происходит. Культура клеток резервуарного хозяина проявляет выраженный цитопатический ответ на вирусную инфекцию, однако отличается высоким уровнем выживаемости клеток. Показано, что ВКЭ способен репродуцироваться в линиях клеток резервуарного и случайного хозяев при высокой множественности заражения. При этом обнаружено, что и репликации РНК ВКЭ, и синтез инфекционного ВКЭ эффективнее протекает в клеточной линии резервуарного хозяина.

Глава 4 посвящена сравнительному изучению протекания персистентной инфекции. В рамках этого исследования Н.А. Ляпуновой в каждой из исследуемых клеточных линий было сформировано по 4 независимых популяции ВКЭ, фактически претерпевших эволюцию *in vitro* в течение 6 месяцев. Автором установлено, что клеточные линии резервуарного и случайного хозяев поддерживают персистенцию ВКЭ на протяжении по меньшей мере 6 месяцев при низкой множественности заражения (1 БОЕ на клетку). Эффективность процессов репликации РНК ВКЭ и продукции инфекционного ВКЭ была сопоставима в этих клеточных линиях, однако линия клеток

летучей мыши продемонстрировала неспособность, как и при высокой множественности заражения, к накоплению антигена ВКЭ. Линия клеток СПЭВ не поддерживает продукцию жизнеспособного вируса при персистентной инфекции. Далее Н.А. Ляпунова проводит обобщение результатов острой и персистентной инфекции с помощью статистического анализа и вводит понятие «индекс репродуктивного баланса» как способа сравнения согласованности разных стадий репликативного цикла ВКЭ в различных клеточных культурах. В результате автор приходит к выводу, что в клеточной линии восточноазиатской лесной мыши процессы репликации РНК ВКЭ, трансляции вирусного полипротеина и продукции инфекционного вируса в наибольшей степени согласованы между собой. Также показано, что линия клеток СПЭВ не поддерживает продукцию жизнеспособного вируса при персистентной инфекции, при этом внутриклеточная +РНК ВКЭ обнаруживалась до 20-й недели после заражения.

В **Главе 5** проводится анализ изменений в геноме ВКЭ, ассоциированных с адаптацией к культурам клеток восточноазиатской лесной мыши и сибирской ночницы в ходе персистентной инфекции. На основе данных высокопроизводительного секвенирования автором установлено, что скорость эволюции ВКЭ в течение 6 месяцев в обеих культурах клеток была одинаковой, однако изменения затрагивали разные локусы генома в зависимости от видовой принадлежности клеточной линии. Установлено, что для клеточной линии восточноазиатской лесной мыши видоспецифичные мутации выявляются только в неструктурной части (белки NS4A и NS4B) тогда как в линии клеток сибирской ночницы видоспецифичные мутации затрагивают как структурные (белок Е), так и неструктурные (белок NS4A) части вирусного генома.

Таблицы и иллюстрации в разделе **Результаты** соответствуют приведенному материалу и дополняют текстовые данные. В **Заключении** Н.А. Ляпунова обобщает и интерпретирует полученные результаты. **Выводы** соответствуют полученным результатам и корректно сформулированы. Автореферат и опубликованные работы достаточно полно отражают основное содержание диссертации, характеризуют результаты проведенных исследований.

К диссертационной работе Н.А. Ляпуновой имеются следующие замечания:

1. Депонированы или планируется депонировать полученные вами линии культур клеток восточноазиатской мыши и сибирской ночницы во Всероссийскую коллекцию культур клеток?
2. Не описана формула, или ссылка на методику, расчета бляшкообразующих единиц.
3. Четко указаны сроки острой инфекции с делением на ранний этап 0 – 24 часа и поздний 24 – 16 суток, но почему то не обозначен период персистентной инфекции.

4. В работе автором указывается две множественности инфекции в 10 и в 0,1 БОЕ на клетку. Почему использовали именно эти значения?
5. На странице 67 диссертационного исследования появляется значение МИ равное 1 БОЕ на клетку. Это опечатка?

На странице 67 диссертационного исследования: «Хотя на третий день инфекции отмечалось некоторое снижение количества жизнеспособных клеток (80–90 %), через неделю после заражения монослой полностью восстанавливался и даже отмечалась тенденция к увеличению количества жизнеспособных клеток в заражённых культурах по сравнению с контрольными (Рисунок 2).» В скобках указано 80-90% разве это некоторое снижение количества жизнеспособных клеток?

Указанные замечания не снижают значимости полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования Н. А. Ляпуновой.

Заключение.

Диссертационное исследование Н.А. Ляпуновой «Особенности репродукции вируса клещевого энцефалита в перевиваемых линиях клеток диких млекопитающих – резервуарных и случайных хозяев вируса» является завершённой научно-квалификационной работой. Автором получены и должным образом опубликованы новые данные о биологии вируса клещевого энцефалита и его взаимодействии с клетками естественных позвоночных хозяев. Работа выполнена на современном и высоком методическом уровне, результаты отличаются научной достоверностью, выводы сформулированы корректно и соответствуют полученным результатам. По актуальности, научному уровню, новизне, теоретической и практической значимости диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Содержание диссертации соответствует специальности 03.02.02 – вирусология.

Диссертационная работа Натальи Андреевны Ляпуновой «Особенности репродукции вируса клещевого энцефалита в перевиваемых линиях клеток диких млекопитающих – резервуарных и случайных хозяев вируса» является завершённой научно-квалификационной работой, которая по критериям актуальности, научной новизны, обоснованности и достоверности выводов соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842.

Диссертант, Ляпунова Наталья Андреевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Официальный оппонент, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории патологии насекомых ФГБУН Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук.

Адрес: 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе 11

Тел./факс: 7(3832)-170973

e-mail: chicherinagalina@bk.ru

Г. С. Чичерина

Подпись Чичериной Г.С. удостоверяю

*Подписание руководителем
Курмаева Л.В. 14.05.2021*

