



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В
СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Тюменский научно-исследовательский
институт красной инфекционной
патологии»

Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

(ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора)

ОКПО 01966928, ОГРН 1027200837751, ИНН

7203001034, КПП 720301001

625026, Российская Федерация, Тюменская

область, г. Тюмень, ул. Республики, 147

Тел: (3452) 28-99-92, 28-99-93,

факс (3452) 28-99-92, доб. 1900

E-mail: info@tniikip.rospotrebnadzor.ru

Сайт: tniikip.rospotrebnadzor.ru



Т.Ф. Степанова

«1» июня 2021 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального бюджетного учреждения науки «Тюменский научно-исследовательский институт красной инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора) на диссертационную работу **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

Диссертация Ляпуновой Н.А. выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ). Диссертация представлена в форме машинописного труда объемом 134 страницы и автореферата объемом 23 страницы. Это исследование обладает новизной, теоретическим и прикладным значением и посвящено сравнению динамики основных стадий репродукции вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в клетках восточноазиатской лесной мыши и сибирской ночницы, являющихся резервуарными и случайными хозяевами. В диссертации представлена совокупность результатов исследований, проведенных лично автором или при его непосредственном участии. По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 5 – в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, из которых 2 – в журналах, индексируемых в БД Web of Science.

Актуальность диссертационного исследования обусловлена, прежде всего, тем, что природные очаги клещевого энцефалита широко распространены в России. Благодаря мерам специфической и неспецифической профилактики, текущий уровень заболеваемости

снижается, однако проблема остается актуальной до настоящего времени. Не снимаются с повестки дня вопросы изучения механизмов существования паразитарных систем природных очагов инфекций, взаимодействия вируса, переносчиков и прокормителей, выполняющих роль хозяев вируса, в также совершенствования диагностических тест систем и отечественных вакцин. В связи с этим выявление особенностей репродукции ВКЭ в полученных перевиваемых клетках восточноазиатской мыши, являющейся одним из эффективных прокормителей иксодовых клещей в Восточной Сибири, и сибирской ночницы – случайного прокормителя, может объяснить устойчивость резервуарных хозяев к вирусной инфекции. Такая постановка проблемы, цель и задачи ее решения свидетельствуют о бесспорной актуальности настоящего диссертационного исследования. До настоящего времени российскими и иностранными учеными проводились исследования массовых прокормителей, которые устойчивы к вирусу, а роль случайных хозяев (например, рукокрылых, пресмыкающихся) и человека, у которых вирус может вызывать тяжелое заболевание и даже гибель хозяина, изучена недостаточно. Впервые проведенные сравнительные исследования взаимодействия вируса со специфичными и случайными хозяевами дали ценную информацию об особенностях и закономерностях репродукции ВКЭ, чем значительно обогатили вирусологическую науку.

Связь работы с планами отраслей науки и народного хозяйства

Для выполнения исследования были исследованы клеточные модели вирусной инфекции, смоделированные в лабораторном эксперименте у мышевидных грызунов и рукокрылых, оценены особенности взаимодействия ВКЭ и разных видов млекопитающих на клеточном уровне, выявлены видоспецифичные изменения в геноме вируса, возникающие при адаптации к резервуарным и случайным хозяевам вируса. Было известно о способности животных, имеющих низкую вероятность контакта с ВКЭ в природе, поддерживать репродукцию клещевых флавивирусов *in vivo* и *in vitro*. Это дало возможность использовать случайных прокормителей в качестве полезных моделей для исследований способности вируса репродуцироваться в хозяевах, эволюционно далеких друг от друга и выявить неизвестные ранее закономерности их циркуляции в природе. Выявление адаптивных функций вируса к млекопитающим, различающимся по образу жизни и поведению, позволяет воссоздать картину адаптации клещевых флавивирусов к различным хозяевам и лучше понять функционирование природно-очаговых инфекций.

Результаты, полученные экспериментальным путем, будут применены в фундаментальной биологии для выявления механизмов, влияющих на эффективность репродукции и трансмиссии ВКЭ в природе, а также в вирусологии для разработки новых подходов к подавлению вируса.

Кроме этого патент, полученный по результатам исследований на способ получения монослойной перевиваемой линии клеток почки восточноазиатской мыши для репродукции ВКЭ, может быть применен в иммунобиологическом производстве для создания вирусного антигена к вакцинным и диагностическим препаратам.

Научная новизна

Научная новизна диссертационного исследования не вызывает сомнений, поскольку она определяется не только постановкой исследуемой проблемы и выбором темы, но и предлагаемыми авторскими решениями и содержанием предложенных подходов. Новизной отличаются предложения и выводы, сделанные диссертантом, которые также представляют несомненный научный и практический интерес. Так, практически все выявленные в работе особенности имеют мировой приоритет, так как установлены впервые в мире:

1. на примере ВКЭ проведено сравнительное исследование репродукции клещевых флавивирусов в перевиваемых клеточных линиях восточноазиатской лесной мыши и сибирской почницы и показано, что изучаемые клеточные линии могут быть использованы как стабильные *in vitro* модели репродукции ВКЭ в клетках млекопитающих – резервуарного и случайного хозяев вируса;

2. на примере перевиваемых клеточных линий разных видов и экологических групп млекопитающих (АpnК и MdbК) показано, что персистенция вируса возможна практически в любых клеточных культурах при условии умеренного цитопатического действия вируса;

3. на примере клеточной линии СПЭВ описано, что сильное цитопатическое действие вируса или уничтожает популяцию клеток-хозяев, или приводит к освобождению клеточной линии от вирусной инфекции. Впервые установлена устойчивая циркуляция неинфекционной вирусной +РНК в клетках млекопитающих, не вырабатывающих инфекционный ВКЭ;

4. на примере перевиваемой линии клеток резервуарных хозяев (*A. peninsulae*) доказано, что в процессе персистентной инфекции в клетках млекопитающих в геноме ВКЭ появляются аминокислотные замены в белках Е (D67N, E122Q, T175I, D203Y и T279K), NS1 (A157V), NS3 (V559L), NS4A (E33G), NS4B (T15K и E20K) и NS5 (A445V, L463R и D635A), а в перевиваемой линии клеток случайных хозяев (*M. sibiricus*) аминокислотные замены появляются в белках М (H28Y), Е (E155V, E155A, G159R, E201R, D203G, G278R H282R), NS1 (G191S), NS3 (L487I), NS4A (N103I) и NS5 (H651N и L892V).

5. получены данные о специфической роли белков NS4A и NS4B в процессах адаптации ВКЭ к клеткам резервуарных и случайных хозяев, а при адаптации вируса к новым хозяевам белки С, NS2A и NS2B остаются неизменными не менее 6 месяцев.

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты диссертационного исследования Н.А. Ляпуновой обладают несомненной теоретической и прикладной значимостью, о чем было упомянуто ранее. Совокупность сформулированных в диссертации положений и выводов развивает учение о взаимодействии ВКЭ и разных видов млекопитающих на клеточном уровне, что в дальнейшем можно будет применить при изучении механизмов, влияющих на эффективность репродукции и трансмиссии ВКЭ в природе, и эти элементы клеточной биологии использовать для разработки новых подходов к подавлению вируса.

Результаты исследования теоретически обосновывают важность репродукции ВКЭ в полученных линиях клеток резервуарного и случайного хозяев при высокой множественности заражения и доказывают реальное значение персистенции ВКЭ среди млекопитающих в естественных условиях, роль этого явления в формировании природных очагов КЭ и а также необходимость совершенствования подходов к изучению персистентной инфекции у млекопитающих.

Практическую значимость работы подтверждает разработка способа получения монослойной перевиваемой линии клеток почки *A. peninsulae* для репродукции ВКЭ и производства вирусного антигена для вакцин и диагностических препаратов (получен патент RU 2017117772) и депонирование нуклеотидных последовательностей (KT983422.1, KT983423.1, MT984208.1, MT974474) в международную базу данных GenBank, что позволяет их использование для изучения распространения, генетического разнообразия и популяционной структуры *A. peninsulae*, *M. sibiricus* и ВКЭ.

Степень достоверности научных положений и выводов и апробация результатов

Результаты проведенного соискателем диссертационного исследования, научные положения, выводы и заключение представляются обоснованными, отличаются высокой степенью научной достоверности, которая обеспечена использованием эффективной методологии решения поставленной научной проблемы и выполнением научных экспериментов в строго контролируемых условиях в трех и более биологических воспроизведениях. В исследовании использовались следующие основные методы:

1. цитологические: культивирование клеток млекопитающих, изучение морфологии клеток с помощью световой микроскопии окрашенных препаратов;
2. молекулярно-генетические: изучение фенотипических проявлений в культурах клеток млекопитающих, обратная транскрипция, количественная ПЦР, NGS-секвенирование, молекулярное клонирование фрагментов вирусного генома в плазмидных бактериальных векторах, T7-транскрипция;

3. вирусологические и микробиологические: оценка вирулентности и эффективности репродукции ВКЭ в клеточных моделях, иммуноферментный анализ, прямая микроскопия;

4. статистические: корреляционный анализ r-Спирмена, критерий оценки достоверности различий Манна-Уитни, критерий t-Стьюдента, квартильный метод исключения выпадающих значений.

Работу отличает глубина, последовательность, тщательность и убедительная аргументация рассматриваемых вопросов. В ходе проведения исследования диссертант продемонстрировал умение анализировать и обобщать имеющиеся по теме научные публикации.

Все четыре положения, выносимые на защиту, сформулированы кратко, корректно, в целом представляются весьма убедительными, заслуживают одобрения, отражены в главах, содержащих собственные данные (гл. 3-5), и в 7 публикациях 2016-2020 гг. в российских и зарубежных журналах.

Анализ полученных выводов свидетельствует об их достоверности:

1 вывод о том, что культуры клеток резервуарного (ArnK) и случайного (MdbK) хозяев ВКЭ обладают стабильными культуральными характеристиками и могут быть использованы в качестве лабораторных моделей в вирусологических исследованиях доказан результатами проведенных исследований;

2-4 выводы о различных проявлениях цитопатического ответа, репродукции и персистенции у клеточных культур резервуарного (ArnK) и случайного (MdbK) хозяев ВКЭ при низкой, средней и высокой множественности заражения убедительно продемонстрирован в ходе лабораторных экспериментов;

5 вывод о разных видоспецифичных изменениях в генах, кодирующих вирусные белки E, NS4A и NS4B в процессе адаптации ВКЭ к клеткам *A. peninsulae* и *M. sibiricus* и белках C, prM, NS2A и NS2B, не участвующих в этом процессе, также показан в экспериментах и доказан в ходе утверждения 4 положения, выносимого на защиту.

С 2016 по 2020 гг. прошла широкая апробация результатов диссертационного исследования на 5 международных и 3 всероссийских научных конференциях в Иркутске, Омске, Вене.

Оценка содержания диссертации

Диссертация Н.А. Ляпуновой содержит традиционную структуру и состоит из введения, 5 глав (обзор литературы – 32 стр., материалы и методы – 16 стр., 3 главы собственных исследований – 34 стр.) заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка использованной литературы, включающего 272 источника, из которых

201 – на английском языке. Работа изложена на 124 стр. текста, иллюстрирована 8 рисунками и 10 таблицами.

1. Результаты диссертационной работы соответствуют поставленной цели и задачам. Полученные и охарактеризованные перевиваемые клеточные линии *A. peninsulae* и *M. sibiricus* являются новыми инструментами для проведения *in vitro* исследований по изучению жизнедеятельности ВКЭ и других флавивирусов в естественных условиях. Показано, что новые линии клеток поддерживают вирусную репродукцию как при острой, так и при персистентной инфекции, несмотря то, что в природе естественные и случайные хозяева выполняют разную роль для ВКЭ. Заслуживает отдельного внимания практическое значение полученных результатов о том, что созданные клеточные линии восточноазиатской мыши и сибирской ночницы могут использоваться для изоляции, изучения и наработки антигенов других зоонозных инфекций вирусного происхождения;

2. Содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации;

3. Опубликованные по теме диссертации работы отражают ее основное содержание;

4. Тема и содержание диссертации соответствуют шифру научной специальности 03.02.02 – вирусология;

5. Диссертация написана грамотным научным языком, прослеживается удачная структура, логичность построения и последовательность изложения, благодаря чему диссертация легко читается и оставляет хорошее впечатление.

Несмотря на положительное заключение от диссертационной работы Ляпуновой Н.А., и общее благоприятное впечатление имеются замечания:

1. В работе отмечено, что для обеих культур клеток был проведён контроль контаминации посторонними микроорганизмами и в ПЦР не выявлено: ВКЭ, хантавирусов, морбилливирусов (в т. ч. вируса чумы плотоядных), вируса бешенства, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *B. miyamotoi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Rickettsia sp.*, *Mycoplasma sp.* Учитывая то, что летучие мыши являются природными резервуарами коронавируса и одна из клеточных линий, использованных в работе, получена от летучей мыши, хотелось бы уточнить, почему не был проведён контроль контаминации коронавирусом и другими зоонозами, характерными именно для ночниц, распространенных в регионе?!

Заключение. Таким образом, диссертация Ляпуновой Н.А. "Особенности репродукции вируса клещевого энцефалита в перевиваемых линиях клеток диких млекопитающих – резервуарных и случайных хозяев вируса", является научно-квалификационной работой, в которой выявлены особенности динамики основных стадий репродукции ВКЭ в клетках резервуарных и случайных хозяев, проведена их сравнительная

оценка и показана адаптация ВКЭ к этим разным млекопитающим. Полученные результаты имеют значение для понимания картины адаптации клещевых флавивирусов к различным хозяевам, лучшего понимания функционирования природных очагов и в целом развития вирусологии. Проведенное исследование бесспорно актуально, содержит новизну, имеет теоретическую и практическую значимость, является самостоятельным, законченным научным исследованием, соответствует специальности 03.02.02 – вирусология (биологические науки) и требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями от 21.04.2016 № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Ляпунова Наталья Андреевна заслуживает присуждения искомой ученой степени – кандидат биологических наук.

Отзыв обсужден на заседании Ученого совета ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора (13.05.2021, протокол № 5).

Отзыв составил: Руководитель лаборатории экологического мониторинга природноочаговых паразитозов главный научный сотрудник

доктор биологических наук

Беляева М.И.

e-mail: BelyaevaMI@Tniikip.rosпотребнадзор.ru

Подпись Беляевой М.И. удостоверяю:

Ученый секретарь ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора,

кандидат биологических наук

Бакштановская И.В.

« 7 » июня 2021 г.



Сведения о ведущей организации:

Наименование организации – Федеральное бюджетное учреждение науки «Тюменский научно-исследовательский институт красовой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора)

Почтовый адрес: 625026, г.Тюмень, ул.Республики, д. 147, ТНИИКИП

Тел: +7 (3452) 28-99-92, +7 (3452) 28-99-93, +7 (3452) 28-99-94

Адрес официального сайта: tniikip.rosпотребнадзор.ru

Электронная почта: info@tniikip.rosпотребнадзор.ru