

**ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**  
**на диссертационную работу Усольцевой Полины Сергеевны на тему:**  
**"Особенности ранних этапов репродукции эховирусов с различной**  
**рецепторной специфичностью", представленную**  
**на соискание ученой степени кандидата биологических наук**  
**по специальности 03.02.02 - вирусология**

Энтеровирусные инфекции (ЭВИ) – убиквитарные инфекции с широким спектром клинических проявлений, вызываемые более 100 серотипами вирусов. РНК-содержащие вирусы стремительно эволюционируют при отсутствии доказано эффективных средств лечения и профилактики. Многие аспекты патогенеза ЭВИ требуют дальнейших исследований. В том числе, до сих пор нет четких объяснений, почему именно детский возраст является фактором риска тяжелых форм ЭВИ; так, новорожденные и дети раннего возраста подвергаются наибольшему риску развития тяжелых энтеровирусных инфекций и летального исхода, а вертикальная передача с развитием врожденных инфекций связаны с риском смерти плода (Solomon T., 2010; Huang M-L, 2013).

Эховирусы относятся к виду Enterovirus B (EV-B) – одному из самых обширных по количеству типов в роде Enterovirus, – и являются основными возбудителями вирусного энцефалита/ менингоэнцефалита, асептического менингита, наиболее значительной заболеваемости и смертности детей при ЭВИ (Holmes et al., 2016; Khetsuriani et al., 2006). Они также вызывают острый вялый паралич, разнообразные экзантемы, пневмонит, гепатит, коагулопатии, синдром HFMD и др. (Abzug, 2014; Huang et al., 2015). В последние годы зарегистрированы серьезные вспышки эховирусных инфекций в Америке, Европе и Азии (Crocker et al., 2015; Kadambari et al., 2014; Kim et al., 2012; Mao et al., 2010); эховирусы составили 7 из 15 наиболее часто встречающихся серотипов энтеровирусов в 2014–2016 годах в США (Abedi et al., 2018). В Китае наблюдение за детьми в нескольких провинциях показало, что EV-B были доминирующими серотипами в спинномозговой жидкости пациентов (Chen et

al., 2017; Zhu et al., 2016), при этом остается неясным, как EV-B проникают через гематоэнцефалический барьер и вызывают неврологические заболевания.

На сегодняшний день идентифицирован целый ряд рецепторов, способствующих проникновению энтеровирусов в клетки хозяина, однако рецепторы, опосредующие процесс высвобождения геномной РНК у эховируса и других EV-B, остаются до конца неясными; известные рецепторы EV-B (CD55,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_6$  и  $\alpha_v\beta_3$ ) ответственны за прикрепление вируса, но ни один из них не вызывает конформационных изменений в вирусной частице, процесса, необходимого для высвобождения вирусного генома вируса (Shakeel et al., 2013; Tuthill et al., 2010). Экспрессия DAF / CD55 не повышает чувствительность непермиссивных клеток к инфекции, что означает, что другая молекула клеточной поверхности функционирует как первичный рецептор. Ряд исследователей ранее предположили, что эховирусы должны иметь Ig-подобный рецептор, чтобы опосредовать «раздевание» (Plevka et al., 2010; Powell et al., 1997; Rossmann et al., 2002). Несколько групп из разных стран почти одновременно в течение 2019 – 2020 г.г. идентифицировали человеческий неонатальный рецептор FcRn в качестве панэховирусного рецептора, клеточного рецептора для EV-B, индуцирующего конформационное изменение эховирусов (Zhao et al., 2019; Morosky et al., 2019; Niu et al., 2020). Результаты исследований П.С. Усольцевой с коллегами, полученные, в том числе, в рамках данной диссертационной работы, входят в этот круг первых опубликованных новых данных о рецепторах EV-B (04.03.2019).

Исследование взаимодействия эховирусов с клеточными рецепторами имеет фундаментальное значение для понимания молекулярных основ тропизма этих вирусов к определённым видам клеток, для объяснения особенностей патогенеза и клинического течения ЭВИ, и т.д. Открытие FcRn рецептора и механизма входа энтеровирусов в клетку хозяина даст, например, представление о механизмах, лежащих в основе проникновения EV-B за гематоэнцефалический и гемато-плацентарный барьеры, обеспечит прогресс в изучении противовирусных стратегий. Идентификация FcRn как

функционального рецептора для большой группы EV-B открывает путь для разработки эффективных вакцин и лекарств, проливает свет на разработку эффективных моделей для изучения эховирусных инфекций на животных.

Основная задача биологии - предсказать, как организмы будут вести себя на основе того, как они взаимодействуют со своей средой. Математическое моделирование – это современная возможность учесть множество положительных и отрицательных обратных связей, функций вируса или клетки-хозяина на различных этапах, с построением графических прогностических моделей их влияния на общее время и продуктивность цикла заражения в клетке (Yin, Redovich, 2018). Такие модели могут расширить представления об эволюции вирусов, обогатить междисциплинарные знания о вирусах на молекулярном и клеточном уровнях интеграцией с математическим, физическим, инженерным анализом биологических структур.

Таким образом, диссертационная работа П.С. Усольцевой посвящена несомненно высоко актуальной проблеме современной вирусологии: изучению кинетических характеристик и молекулярных механизмов энтеровирусной инфекции на субклеточном уровне, а именно - установлению особенностей ранних этапов репродукции эховирусов с различной рецепторной специфичностью, - т.е., изучению того недостающего звена взаимодействия вируса и клетки, которое до настоящего времени оставалось одним из уязвимых моментов молекулярной биологии эховирусов.

Для достижения заявленной автором цели сформулированы следующие три задачи:

- 1) Проверка гипотезы о роли неонатального рецептора Fc фрагмента иммуноглобулинов класса G человека (hFcRn) в качестве рецептора дезинтегрирующего белковый капсид эховирусов и коксакивируса A9.
- 2) Разработка математической модели, описывающей процессы входа эховирусов в клетку и сборки вирусных частиц в одиночном цикле репродукции эховирусов, и технического задания по реализации модели в виде программного обеспечения для ЭВМ.

3) Сравнительное изучение кинетики ранних этапов взаимодействия с клеткой эховирусов, использующих различные связывающие рецептры и типы эндоцитоза.

*Научная новизна, достоверность результатов и выводов*

Общая характеристика работы, отраженная во введении, содержит убедительную аргументацию бесспорной научной новизны выполненного исследования.

Диссертантом впервые установлена функция hFcRn в качестве общего депротеинизирующего рецептора для эховирусов и коксакивируса A9, при этом выявлены различия в длительности и выраженности защитного эффекта блокирования hFcRn с помощью альбумина и антител к hFcRn для Daf<sup>+</sup> и Daf<sup>-</sup> вариантов эховирусов, представительство которых в популяции практически равновесно. Автором показано, что эффект блокирования hFcRn более значим для DAF-независимых вирусов, отражая различные этапы входа Daf<sup>+</sup> и Daf<sup>-</sup> вирусов в клетку.

Впервые, на основании полученных результатов исследования, разработана математическая модель кинетики инфекционной активности энтеровирусов в одиночном цикле репродукции в культуре клеток с применением двух логистических функций: убывающей – для процесса дезинтеграции капсида с высвобождением вирусной РНК и возрастающей – для процесса инкапсидации вирусной РНК, убедительно демонстрирующих тенденции взаимодействия системы вирус-клетка при реализации выявленных автором механизмов. Разработанные на основе выявленных данных простые математические модели, безусловно, приближают создание цифровой медицины и биологии.

К несомненным достоинствам работы относится реализация математической модели и выполненный автором, на её основе, анализ особенностей кинетики дезинтеграции капсида с высвобождением РНК и инкапсидации Daf<sup>+</sup> и Daf<sup>-</sup> эховирусов в зависимости от внешних факторов: на разных клеточных линиях (рабдомиосаркомы (RD) и моноцитарной лейкемии человека (JL41 КД/84)) и под воздействием различных химических соединений (роданина – средства с

антипролиферативным и антиметастатическим действием; нистатина – антифунгального препарата полиеновой группы, повреждающего холестерол клеточных мембран; нокодазола – противоопухолевого препарата, действующего на цитоскелет). Показано, что в культуре клеток RD негативная селекция Daf<sup>-</sup> эховирусов связана с пониженной скоростью дезинтеграции капсида с выходом РНК и инкапсидации РНК по сравнению с Daf<sup>+</sup> клонами, в то время, как негативная селекция Daf<sup>+</sup> эховирусов на культуре клеток Л41 КД/84 обусловлена пониженным уровнем связывания таких вариантов с клетками в сочетании с пониженной скоростью дезинтеграции капсида с высвобождением РНК и инкапсидации РНК.

Впервые показан избирательный эффект роданина в отношении субтипových вариантов эховируса 11 в культуре клеток RD, проявлявшийся в зависимости от их рецепторной специфичности: снижение скорости дезинтеграции капсида с последующим высвобождением РНК наблюдалось у DAF-зависимого варианта эховируса 11 и не наблюдалось у варианта, не взаимодействовавшего с рецептором DAF.

Автором впервые продемонстрированы различия эффектов нокодазола на репродукцию субтипových вариантов эховируса 11 с различной рецепторной специфичностью, связанные с различной чувствительностью путей входа эховирусов в клетку к блокированию везикулярного транспорта, зависящего от микротрубочек.

Работа выполнена на большом лабораторном и экспериментальном материале, высоком методическом уровне; автором применен широкий спектр современных вирусологических и молекулярно-биологических методов исследования.

Автором использованы также адекватные методы статистического анализа, включающие методы описательной, сравнительной и аналитической статистики, в том числе – математическое моделирование, позволившие провести корректную оценку полученных данных, что обеспечивает достоверность сделанных на их основе заключений и выводов.



*Практическая значимость диссертации* безусловна и определяется, в первую очередь, возможностью использования полученных новых научных данных для изучения взаимосвязи экспрессии hFcRn в различных клетках и тканях человека с патогенезом заболеваний, вызываемых данными энтеровирусами; создания эффективных моделей для изучения эховирусных инфекций на животных, в том числе – трансгенных мышей, экспрессирующих hFcRn, как для изучения патогенеза ЭВИ, так и создания, и доклинических испытаний противовирусных средств, уточнения механизмов действия онколитических вирусов. Разработанная математическая модель и созданная на её основе компьютерная программа могут быть использованы для дальнейших фундаментальных исследований кинетических параметров репродукции энтеровирусов.

По материалам диссертации опубликовано 14 статей, из которых 6 опубликованы в журналах списка, рекомендованного ВАК Минобрнауки России. Зарегистрирована 1 программа для ЭВМ.

*Общая характеристика работы:*

Рассматриваемая работа традиционна по своей структуре и оформлению, изложена на 147 страницах текста, содержит разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы. Список литературы включает 143 источника (19 отечественных, 128 зарубежных), из них 25% - публикации последних 5 лет, 34% - публикации старше 5 лет (до 10 лет).

Диссертационная работа иллюстрирована 15 таблицами, 24 рисунками.

В целом, оформление работы соответствует требованиям, предъявляемым к работам подобного уровня.

Цель исследования сформулирована достаточно четко и корректно.

Положения, выносимые на защиту, сформулированы грамотно и коррекции не требуют.

*В главе 1 (Обзор литературы)* рассмотрены подробные характеристики энтеровирусов: от таксономического положения и номенклатуры до организации генома, и стадий репродукции; в том числе – отражены современные концепции каждого шага проникновения вируса в клетку, представлены идентифицированные на сегодня рецепторы для энтеровирусов с анализом их биологических свойств и рецепторной специфичности, определяющие тканевой и органнй тропизм вирусов. Автором отражены и различные нерешенные аспекты молекулярных механизмов ЭВИ (в том числе – эховирусных инфекций), и активно обсуждаемая в биологической литературе гипотеза о существовании общего депротенинизирующего рецептора для эховирусов. В обзоре литературы представлена подробная характеристика методов изучения дезинтеграции капсида вирусов полиомиелита и эховирусов в культурах клеток с оценкой достоинств и недостатков каждого; представлена также эволюция подходов к математическому моделированию стадий репродуктивного цикла вирусов, с обоснованием задач диссертационной работы, примененных методов исследования и наглядного отражения полученных результатов.

Обзор литературы по форме и содержанию написан интересно с насыщенным анализом затронутых аспектов, касающихся конкретных заявленных тем диссертации, ясным с математической точностью изложением деталей проблем, что свидетельствует о высоком теоретическом уровне подготовки диссертанта, способного свободно и просто интерпретировать сложные материалы предшествующих исследований. Обзор литературы хорошо структурирован и логичен, заявленные автором задачи диссертационной работы концептуально едины с содержанием данной главы. Замечаний по обзору литературы нет.

*Во второй главе диссертации* приведены сведения о примененных в диссертационной работе материалах и методах; подробная информация относительно реактивов, использованных культур клеток, штаммов и клонов энтеровирусов (все клинические изоляты выделены на клетках RD в

лаборатории энтеральных вирусных инфекций «ЕНИИВИ» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»), методов оценки активности вирусов. В разделе доказательств присутствия и функционирования человеческого неонатального рецептора FcRn в качестве панэховирусного рецептора применены методы исследования протективного эффекта человеческого сывороточного альбумина и поликлональных и моноклональных антител к hFcRn при заражении культур клеток EV-B. Кинетика инфекционной активности эховируса 11 в одиночном цикле репродукции изучена на культурах клеток (RD и Л-41 КД/84) и при применении ингибиторов репродукции (роданин, нистатин, нокодазол).

Использованные автором в работе лабораторные, экспериментальные, молекулярно-генетические и статистические методы исследования современны и информативны, применены к достаточному объему наблюдений в динамике. Представление собственных материалов диссертант осуществляет так же логично и последовательно, как и данных литературы, в строгом соответствии с целью и задачами работы.

*3-я глава «Результаты и обсуждение», посвященная результатам собственных исследований – основная глава диссертации, содержит данные проведенных исследований и их интерпретацию.*

*Раздел 3.1 отражает выполненную работу по установлению роли человеческого неонатального рецептора Fc фрагмента иммуноглобулинов класса G (hFcRn) в качестве общего дезинтегрирующего капсид рецептора для эховирусов и коксакивируса A9, и обсуждение полученных результатов.*

На первом этапе автором продемонстрированы специфичность и избирательность подавления репродукции эховирусов и коксакивируса A9 за счет блокирования hFcRn с помощью его физиологического лиганда (человеческого альбумина) и антител к рецептору – доказано, что вирус-инактивирующее действие в отношении эховирусов 11 типа имеется у альбумина, очищенного от глобулинов и жирных кислот, но отсутствует у альбумина, очищенного от глобулинов, но не очищенного от жирных кислот. Для подтверждения экспрессии hFcRn в культуре клеток RD и проверки



функциональной активности антител автором использована непрямая иммунофлуоресцентная микроскопия с первичными поликлональными (пАТ) и моноклональными (мАТ) антителами к hFcRn и вторичными анти-IgG антителами, конъюгированными с флуорохромом - показано отсутствие hFcRn и эффекта от мАТ и пАТ в клетках MDCK.

На втором этапе продемонстрирован защитный эффект человеческого альбумина и антител к hFcRn при заражении клеток близкородственными эховирусами, имеющими одинаковую структуру в типичном для энтеровирусов сайте связывания с дезинтегрирующими капсид рецепторами (в каньоне вокруг осей симметрии 5-го порядка), но различную поверхностную структуру вирионов в сайте связывания с рецептором DAF – выявлено избирательное блокирующее действие HSA-GF и пАТ по отношению к рецептору для эховирусов (близкородственных клонов эховируса 11) и коксакивируса A9, и его отсутствие в отношении коксакивирусов B4 и B5. Одновременно, при выполнении данной работы, автором установлено, что в условиях неполного блокирования hFcRn альбумином или антителами к hFcRn, длительность и величина защитного эффекта были меньше у эховирусов, способных к связыванию с DAF, по сравнению с эховирусами, не взаимодействовавшими с DAF, что отражает двухэтапное взаимодействие DAF-зависимых эховирусов с рецепторами при входе в клетку.

Определение роли FcRn при эховирусных инфекциях человека имеет принципиальное значение и открывает широкие перспективы в исследовании различных аспектов молекулярных механизмов эховирусных инфекций: FcRn экспрессируется в кишечнике, почках, легких, плаценте, гематopoэтических клетках, эндотелии сосудов и гематоэнцефалическом барьере, что соответствует тканевому тропизму EV-B; кишечник является основной мишенью, откуда вирусы диссеминируют во многие другие органы (ЦНС, печень, селезенка, легкие, костный мозг и сердце), вызывая многочисленные клинические формы ЭВИ. FcRn облегчает транспорт материнских IgG через плаценту к плоду, обеспечивая формирование пассивного иммунитета

новорожденных, а также опосредует действие IgG у взрослых. Возможно, именно FcRn обеспечивает и проникновение EV-B за гематоэнцефалический и гемато-плацентарный барьеры.

Вопрос 1 по главе «Материалы и методы»: стр 58-59. Как определяли максимальную нетоксичную концентрацию ингибиторов репродукции?

*В разделе 3.2 представлена разработка математической модели инфекционной активности эховирусов в одиночном цикле репродукции*

Математическое моделирование всегда украшает исследовательскую работу, позволяя упростить, идеализировать и визуализировать этапы, направленность и др. характеристики биологических процессов. Автором в качестве аналитического метода исследования применена логистическая регрессия, при этом следует иметь в виду, что с помощью одного автономного дифференциального уравнения могут быть описаны только монотонные изменения переменной, и, следовательно, ни периодические, ни хаотические процессы описаны быть не могут. Используемый автором математический анализ позволил представить теоретически фазы инфекционной активности вирусов в экспериментальной системе, трудно воспроизводимые в реальных экспериментальных условиях. Опираясь на абстрактный график изменения инфекционной активности энтеровирусов в экспериментах с одиночным циклом репродукции в культуре клеток, с помощью подбора двух логистических (*S*-образных) функций, в которых убывающая логистическая функция соответствует процессу дезинтеграции исходных вирионов, а возрастающая логистическая функция - процессу инкапсидации вирусной РНК при сборке новых вирионов, автор предложила концептуальную модель объекта моделирования, выбрав оптимизацию приближения теоретической функции к экспериментальной кривой численным методом роя частиц с расчетом коэффициента расхождения Тейла. Программа для ЭВМ, созданная на основе предложенной модели изменения инфекционной активности эховирусов, зарегистрирована в Федеральной службе интеллектуальной собственности: номер регистрации (свидетельства) – 2020660270.

Безусловным украшением работы являются представленные в диссертации графики аппроксимирующих функций исследованных параметров, рассчитанные с помощью математической модели по экспериментальным точкам.

Замечание по данному разделу: в разделе содержатся литературные данные, которые соответствуют признакам литературного обзора (стр. 83) и более логичны в главе 1.

*В разделе 3.3 анализируются кинетические особенности одиночного цикла репродукции клонированных субтиповых вариантов эховируса 11 с различной рецепторной специфичностью*

Учитывая доказанное выше присутствие дезинтегрирующего капсид hFcRn рецептора для эховирусов, опираясь на данные экспериментов с клонированными субтиповыми вариантами эховируса 11, с расширенным диапазоном клеток-хозяев и двойным рецепторным тропизмом, используя созданную математическую модель количественного выражения инфекционной активности эховирусов в одиночном цикле репродукции, автор представила сравнительную количественную характеристику путей входа клонов эховируса 11 с различной рецепторной специфичностью в двух культурах клеток и под воздействием различных препаратов, т.е. наглядно продемонстрировала эффективность применения разработанной ею математической модели для детального этапного анализа взаимодействия вируса и клетки в предложенных условиях среды.

Математический анализ данных с построением графиков аппроксимирующих функций для *daf*<sup>+</sup> и *daf*<sup>-</sup> клонов эховируса 11 в культурах клеток с известными селективными свойствами (позитивная селекция *daf*<sup>+</sup> вариантов в культуре клеток RD и позитивная селекция *daf*<sup>-</sup> вариантов в культуре клеток Л-41 КД/84) позволил автору предположить ряд биологических особенностей функционирования вирусов, определяемых связыванием с рецептором DAF.

Так, согласно математической модели, в культуре клеток RD, несмотря на более продолжительный внутриклеточный трафик *daf*<sup>+</sup> клона 431-1 эховируса

11 до сайта репликации, с отсроченным началом явного роста инфекционной активности, более высокая пропускная способность пути входа *daf*<sup>+</sup> клона по сравнению с пропускной способностью пути входа *daf*<sup>-</sup> клона 431-6, взаимодействующего с рецептором hFcRn, в сочетании более высокой скоростью дезинтеграции капсида *daf*<sup>+</sup> клона обеспечивают опережающее достижение максимальной инфекционной активности *daf*<sup>+</sup> клоном по сравнению с *daf*<sup>-</sup> клоном.

Значительно меньший, исходя из результатов математического моделирования, уровень экспрессии рецептора DAF на клетках Л-41 КД/84 по сравнению с клетками RD обеспечивает более высокую пропускную способность пути входа в клетки, инициируемого рецептором hFcRn, что в сочетании с более высокой скоростью инкапсидации у *daf*<sup>-</sup> клона обеспечивает этому клону 431-6 E11 меньшее время для достижения максимальной инфекционной активности. О низкой пропускной способности пути входа в клетки Л-41 КД/84, используемого *daf*<sup>+</sup> клоном 431-1, свидетельствовали, по мнению автора, уровень инфекционной активности у *daf*<sup>+</sup> клона – почти на три порядка ниже, чем у *daf*<sup>-</sup> клона 431-6, и средняя скорость депротенинизации *daf*<sup>+</sup> клона - в 1341 раз ниже, чем у *daf*<sup>-</sup> клона.

Идентификация FcRn как функционального рецептора для большой группы вирусов EV-B открывает многообещающие перспективы для разработки эффективных вакцин и лекарств, что продемонстрировано автором с применением предложенной математической модели при анализе влияния на кинетические параметры одиночного цикла репродукции *daf*<sup>+</sup> и *daf*<sup>-</sup> клонов эховируса 11 ингибиторов репродукции эховирусов, детальные молекулярные механизмы ингибирующего эффекта которых остаются неясными.

Так, например, в отличие от применявшихся ранее способов оценки эффектов роданина по влиянию на конечную продуктивность инфекции, математическое моделирование позволило количественно оценить воздействие роданина на скорость процессов дезинтеграции капсида с высвобождением РНК и инкапсидации вирусной РНК. Автором показано более существенное

влияние роданина на параметры ОЦР *daf*<sup>+</sup> клона эховируса 11 по сравнению *daf*<sup>-</sup> клоном, что проявилось в снижении скорости дезинтеграции в 1,95 раза по сравнению с исходной, сокращении расчетного интервала времени до начала явного роста инфекционной активности (с 11,62 до 0 минут) и повышении скорости инкапсидации РНК в 1,34 раза, и в итоге – в достоверно более высоких значениях инфекционной активности в присутствии роданина для *daf*<sup>+</sup> клона эховируса 11, что подтвердило наличие эффекта в отношении DAF-зависимого варианта эховируса 11, использующего связывающий рецептор DAF и дезинтегрирующий капсид рецептор hFcRn. Эффект роданина в отношении *daf*<sup>-</sup> клона эховируса 11, использующего связывающий рецептор hFcRn, оказался слабо выраженным с незначительным, но достоверным снижением инфекционной активности.

В отличие от эффекта роданина на экспрессию рецептора DAF, для нистатина подобного эффекта обнаружено не было, но установлено снижение уровня экспрессии рецептора hFcRn на поверхности клеток RD, что приводило к снижению исходного уровня связывания с клетками в присутствии нистатина *daf*<sup>-</sup> клона 431-6 (но не *daf*<sup>+</sup> 431-1) в культуре клеток RD. В тоже время, общее влияние нистатина на параметры ОЦР оказалось схожим для *daf*<sup>+</sup> и *daf*<sup>-</sup> клонов эховируса 11 - снижение скорости дезинтеграции капсида, удлинение расчетного интервала времени до начала явного роста инфекционной активности, снижение скорости инкапсидации РНК и максимального уровня инфекционной активности к концу периода наблюдения, однако в количественном выражении более существенные проявления ингибирующих эффектов нистатина установлены в отношении *daf*<sup>-</sup> клона. Известно, что нистатин повреждает холестерол липидных плотов плазматических мембран, формируя трансмембранные поры, исходя из этого представления, автором предложены варианты интерпретации механизмов ингибирующего эффекта нистатина на репродукцию обоих клонов эховируса 11 и снижение продуктивности инфекции, но очевидно, что точный патогенез еще ждет дальнейшего исследования.



Нокодазол – ингибитор полимеризации микротрубочек в цитоплазме клеток, согласно выполненным автором исследованиям и математическому анализу данных, снижал экспрессию рецептора hFcRn на поверхности клеток RD, приводя к снижению инфекционной активности *daf*<sup>-</sup> клона, при этом не оказывал влияния на экспрессию рецептора DAF в условиях эксперимента - максимальная инфекционная активность *daf*<sup>+</sup> клона эховируса 11 в присутствии нокодазола не отличалась от таковой без него. Влияние нокодазола на параметры ОЦР *daf*<sup>+</sup> и *daf*<sup>-</sup> клонов эховируса 11 проявилось в общем снижении скорости дезинтеграции капсида. Автором, также, как и в эксперименте с нистатином, предложены варианты интерпретации выявленных отличий репродукции *daf*<sup>+</sup> и *daf*<sup>-</sup> вариантов эховирусов 11 в клетках RD.

Очевидно, что точные механизмы проникновения эховируса в клетки и полный анализ влияния FcRn на патогенез ЭВИ еще ждут дальнейших исследований, но не вызывают сомнений доказательства автора того, что имеют место количественные различия пропускной способности путей входа эховирусов в клетки, инициируемых рецепторами DAF и hFcRn. Исходя из двухэтапной схемы взаимодействия DAF-зависимых эховирусов с рецепторами при входе в клетку и преимущественной перинуклеарной внутриклеточной локализации hFcRn, сначала происходит взаимодействие со связывающим рецептором DAF, затем – с депротеинизирующим рецептором hFcRn, что определяет отличия молекулярных механизмов взаимодействия *daf*<sup>+</sup> и *daf*<sup>-</sup> вариантов эховирусов с клеткой, и зависимость от экспрессии дезинтегрирующего капсид рецептора на поверхности клеток.

Дальнейшие исследования роли FcRn в патогенезе эховирусных инфекций должны раскрыть механизмы диссеминации вирусов, в том числе – молекулярные механизмы проникновения за гематоэнцефалический и гемато-плацентарный барьеры, возможно, послужить основой для создания комбинации терапевтических антител и других средств, эффективно воздействующих на консервативные эпитопы эховирусов и энтеровирусов вообще.

*Заключительная 4 короткая глава диссертации (Заключение)* посвящена представлению квинтэссенции полученных результатов – общему резюме диссертационной работы, которое написано очень интересно, конкретно, сжато, с привлечением литературных данных для сопоставления основных итогов выполненной работы с одновременно опубликованными исследованиями других авторов.

Завершают диссертацию выводы, которые соответствуют поставленным задачам, суммируют главные результаты исследования и свидетельствуют о достижении цели работы.

Основные результаты исследования в достаточной степени представлены в печатных изданиях.

Подводя итог оценке диссертационного исследования П.С. Усольцевой, следует отметить, что работа выполнена полностью в соответствии с поставленными целями и задачами.

Замечаний по содержанию и оформлению диссертации нет.

Считаю необходимым отметить, что диссертационная работа П.С. Усольцевой расширяет представления о патогенезе ЭВИ, детализируя ранее неизвестные молекулярные механизмы прикрепления эховирусов и их репродукции, и открывает новые перспективы в исследовании этих инфекций. У автора и ее коллег по данному разделу науки имеется высокий шанс занять ведущие позиции в мире в одной из областей фундаментальной вирусологии, от решения проблем в которой, в частности, зависят перспективы целенаправленного создания высокоэффективных противовирусных средств.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Усольцевой Полины Сергеевны на тему "Особенности ранних этапов репродукции эховирусов с различной рецепторной специфичностью", представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 - вирусология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании

выполненного автором исследования содержится решение актуальной научной задачи – подтверждения гипотезы о роли человеческого неонатального рецептора Fc фрагмента иммуноглобулинов класса G в качестве общего дезинтегрирующего капсид рецептора для эховирусов, что имеет существенное значение как для вирусологии, так и для инфекционных болезней вообще.

Работа Усольцевой Полины Сергеевны по актуальности, научной новизне, практической значимости, полноте изложения и обоснованности выводов соответствует требованиям пункта 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановления Правительства РФ от 30.01.2002 №74), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Официальный оппонент:  
Доктор медицинских наук,  
профессор кафедры  
инфекционных болезней  
педиатрического факультета  
ГБОУ ВПО  
«Новосибирский государственный  
медицинский университет»  
Минздрава России  
E.mail: izvekova@inbox.ru

*ИЗВ*

И. Я. Извекова

Дата: 26.05.2021  
Адрес: Красный проспект, 52,  
Новосибирск, Новосибирская обл., 630091  
Тел. 8 (383) 222-32-04

Подпись Извековой И.Я. заверяю



Ф.И.О., должность, дата

