



УТВЕРЖДАЮ:

директор ФГБНУ  
научный центр  
и разработки  
иммунобиологических препаратов член-  
корреспондент РАН, доктор медицинских  
наук, профессор

Айдар Айратович Ишмухаметов

«14» мая 2021 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

Усольцевой Полины Сергеевны

**«Особенности ранних этапов репродукции экзовирусов с различной  
рецепторной специфичностью»,**

**представленной к защите на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология**

Диссертационная работа П.С. Усольцевой выполнена в Екатеринбургском научно-исследовательском институте вирусных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Диссертация изложена на 147 страницах, иллюстрирована 24 рисунками, включает 15 таблиц. Список литературы насчитывает 143 источника. Диссертационная работа построена по стандартному принципу, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результаты исследования и их обсуждение изложены в трёх подразделах одной главы; рукопись завершается заключением, выводами, списком литературы и двумя приложениями. По теме диссертации опубликовано 14 работ, в их числе 6 статей в рецензируемых научных журналах, внесенных в перечень изданий, утвержденных Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, и 8 тезисов докладов в сборниках материалов российских и международных конференций в период 2016-2019 гг., а также один патент на изобретение и свидетельство о регистрации программы для ЭВМ.

## **Актуальность проблемы**

Неполиомиелитные энтеровирусы (НПЭВ) человека (более 100 типов) характеризуются глобальным распространением, клинические проявления инфекции, вызываемой этими вирусами, весьма разнообразны - от легких простудоподобных лихорадочных состояний, конъюнктивита, гастроэнтерита до тяжелых заболеваний с поражением нервной системы – менингита, энцефалита, энцефаломиелита и др. В последние десятилетия во всем мире увеличилось количество случаев неврологических заболеваний, проявляющихся клинической картиной паралитического полиомиелита, вызываемых энтеровирусом (ЭВ) типа 71 (EV-A71), вирусом Коксаки A16 (CV-A16), ЭВ типа 70 (EV-D70), ЭВ типа 68 (EV-D68) и некоторыми другими. О возрастающем значении этих вирусов свидетельствует тот факт, что в 2018 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) внесла эмерджентные НПЭВ в качестве кандидата в Список приоритетных заболеваний, которые представляют серьезную угрозу для здоровья населения и требуют дальнейших исследований как в практической области эпидемиологического надзора и диагностики, так и продолжения углубленного научного изучения различных аспектов взаимодействия вирусов с клеткой.

Широкий спектр клинических форм энтеровирусных инфекций (ЭВИ) свидетельствует о способности НПЭВ к репродукции в различных тканях и органах человека. Основой тканевого тропизма ЭВ является специфичность взаимодействия вирусов с рецепторами чувствительных клеток. Исследования ранних этапов входа ЭВ в чувствительные клетки были начаты ещё в середине прошлого века на модели вируса полиомиелита, но многие вопросы молекулярных механизмов и кинетических особенностей цикла репродукции ЭВ с различной рецепторной специфичностью остаются неизвестными до сих пор. Так, для вирусов ЕСНО не идентифицирован рецептор, дезинтегрирующий капсид, далеко неполным является количественное описание кинетики дезинтеграции капсида с высвобождением РНК вирусов ЕСНО при варьировании экспериментальных условий. В связи с этим диссертация П.С. Усольцевой, посвященная изучению особенностей ранних этапов репродукции вирусов ЕСНО с различной рецепторной специфичностью, является актуальной.

## **Значение диссертационной работы**

Для достижения цели работы автору необходимо было решить следующие задачи:



1) Проверить гипотезу о роли неонатального рецептора Fc фрагмента иммуноглобулинов класса G человека (hFcRn) в качестве рецептора дезинтегрирующего белковый капсид вирусов ЕСНО и вируса Коксаки А9;

2) Разработать математическую модель, описывающую процессы входа вирусов ЕСНО в клетку и сборки вирусных частиц в одиночном цикле репродукции, на основании которой разработать техническое задание для её реализации в виде программного обеспечения для ЭВМ;

3) Сравнить кинетику ранних этапов взаимодействия вирусов ЕСНО, использующих различные связывающие рецепторы и типы эндоцитоза, с клеткой.

В последовательной серии экспериментальных исследований и с помощью математического моделирования эти задачи были решены. П.С. Усольцевой было показано, что неонатальный рецептор Fc фрагмента иммуноглобулинов класса G человека является общим дезинтегрирующим капсид рецептором для вирусов ЕСНО и Коксаки А9. Несомненное значение имеет часть работы, посвящённая математическому моделированию. Установлено, что изменения инфекционной активности вирусов ЕСНО в одиночном цикле репродукции в культуре клеток статистически адекватно аппроксимируются двумя логистическими функциями: убывающей функцией – для процесса дезинтеграции капсида с высвобождением вирусной РНК и возрастающей функцией – для процесса инкапсидации вирусной РНК при сборке новых вирионов. Предложенная автором математическая модель изменения инфекционной активности позволяет статистически адекватно рассчитывать количественные параметры, характеризующие процессы входа вируса в клетку и сборки новых вирионов в экспериментах с одиночным циклом репродукции. Создание модели и идентификация общего для вирусов ЕСНО дезинтегрирующего капсид рецептора hFcRn стали основой для изучения особенностей входа в клетки вирусов ЕСНО, обладающих различной рецепторной специфичностью. Эксперименты с субтиповыми вариантами вируса ЕСНО 11, использующими различные связывающие клеточные рецепторы (DAF и hFcRn), в культурах клеток RD и Л-41 КД/84 позволили установить особенности проникновения вирусов в клетку. Субтиповые варианты могут проникать в клетку, используя либо двухэтапное взаимодействие с клеточными рецепторами – сначала со связывающим рецептором DAF, затем с hFcRn – рецептором, вызывающим дезинтеграцию капсидных белков, либо одноэтапное взаимодействие с рецептором hFcRn, используя его как для

связывания с клеткой, так и для дезинтеграции белкового капсида с последующим выходом геномной РНК вирусов. Возможность применения разработанной математической модели получила экспериментальное подтверждение в исследованиях влияния химических ингибиторов репродукции вирусов ЕСНО (роданина, нистатина и нокодазола) на параметры одиночного цикла репродукции, а именно на скорость дезинтеграции капсида с высвобождением РНК. Эти эксперименты в сочетании с разработанной математической моделью позволили выяснить количественные различия пропускной способности путей входа субтипových вариантов вируса ЕСНО 11 в клетки, инициируемых различными рецепторами. Использование субтипowymi вариантами различных связывающих клеточных рецепторов (DAF и hFcRn) и ассоциированных с ними путей входа вирусов в клетки обуславливает количественные различия эффектов химических ингибиторов (роданина – ингибитора дезинтеграции капсида эховирусов, нистатина – ингибитора функции липидных плотов и нокодазола – ингибитора полимеризации микротрубочек) на кинетику высвобождения и инкапсидации вирусной РНК.

Результаты диссертационной работы имеют несомненную научную новизну: впервые определена функция рецептора hFcRn при репродукции вирусов ЕСНО и Коксаки А9 в культуре клеток RD; экспериментально подтверждена двухэтапная схема взаимодействия DAF-зависимых вирусов с рецепторами при входе в клетку; изучены механизмы селекции субтипových вариантов вирусов ЕСНО в различных культурах клеток (RD и Л-41 КД/84). Оригинальным результатом является разработка математической модели, способной количественно описывать изменения инфекционной активности энтеровирусов в процессе репродукции в культуре клеток. Впервые изучен механизм ингибирующего эффекта некоторых ингибиторов в отношении субтипových вариантов вируса ЕСНО 11 в культуре клеток RD.

Т.о. представленная рукопись диссертационной работы П.С. Усольцевой позволяет заключить следующее:

Полученные результаты соответствуют цели исследования и его задачам. Они имеют теоретическую и практическую значимость, открывая новые возможности для изучения патогенеза заболеваний, вызываемых НПЭВ, как *in vitro*, так и *in vivo*, позволяют расширить формат доклинических испытаний противовирусных лекарственных средств. Разработанная математическая модель и созданная на её



основе компьютерная программа может быть использована для фундаментальных исследований кинетических параметров репродукции энтеровирусов, для фармакологических исследований ингибиторов репродукции энтеровирусов в культурах клеток.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертационной рукописи.

Содержание опубликованных работ соответствует содержанию диссертации.

Рукопись диссертации хорошо оформлена, логично структурирована, материал изложен чётко, стилем, принятым для научных публикаций.

Тема диссертации соответствует научной специальности 03.02.02- вирусология (биологические науки).

Научные положения, выносимые на защиту, отражены в опубликованных работах.

### **Степень достоверности и обоснованности представленных данных**

Достоверность и обоснованность представленных в диссертационной работе данных обусловлена применением автором современных методических подходов для решения поставленных задач. Используются вирусологические, молекулярно-биологические методы, метод математического моделирования и статистические методы обработки результатов. Проанализированный объем научного исследования как в качественном, так и в количественном отношении адекватен задачам исследования. Методы исследования, оборудование, реактивы, расходные материалы подробно и ясно описаны. Рисунки и таблицы рукописи диссертации и автореферата в полной мере отражают суть экспериментов, их количественные характеристики и статистическую обработку полученных результатов, что соответствует современным принципам статистики. Представленные в работе результаты получены на достаточной выборке и проанализированы с использованием корректных методов статистической оценки данных. Автором проведен сравнительный анализ собственных данных с результатами мировой научной литературы. Выводы соответствуют поставленным задачам и отражают их решение. Интерпретация полученных данных является оригинальной и обоснованной.

Все это в совокупности позволяет заключить, что представленная диссертационная работа П.С. Усольцевой является самостоятельным, оригинальным, завершенным в рамках поставленной цели и задач научно-квалификационным трудом.

### **Анализ достоверности выводов**

Результаты диссертационной работы оформлены в виде 6 выводов, которые в полной мере отражают суть выполненной работы, обоснованы полученными результатами, корректно сформулированы.

### **Замечания и вопросы по диссертации П.С. Усольцевой**

По рассматриваемой диссертации есть следующие замечания:

- 1) Некорректным является написание типового названия вирусов группы ЕСНО или Коксаки как «эховирусы», «коксакивирусы».
- 2) Так как диссертация имеет преимущественно теоретическое значение, целесообразно было бы в тексте диссертации дать рекомендации по использованию научных выводов в виде отдельного раздела.

По диссертации имеется вопрос:

В п.3 раздела «Теоретическая и практическая значимость работы» предлагается использовать альбумин и поликлональные антитела к hFcRn для субвидовой классификации малоизученных и новых энтеровирусов. Каким образом автор предполагает осуществлять такую классификацию, как будут классифицированы вирусы?

### **Заключение**

Диссертационная работа Усольцевой Полины Сергеевны на тему «Особенности ранних этапов репродукции эховирусов с различной рецепторной специфичностью», выполненная под руководством кандидата медицинских наук, доцента кафедры медицинской физики, информатики и математики ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России Резайкина Алексея Васильевича и представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 - вирусология, является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором содержится решение важной научной задачи – изучены некоторые аспекты молекулярных механизмов и кинетики цикла репродукции ЭВ с различной рецепторной специфичностью. Результаты работы вносят значительный вклад в изучение фундаментальной проблемы современной вирусологии – понимание механизмов взаимодействия вируса и клетки. Разработанная математическая модель и созданная на её основе компьютерная программа могут быть



использованы для фундаментальных исследований кинетики репродукции энтеровирусов, для фармакологических исследований ингибиторов репродукции энтеровирусов в культурах клеток.

По своей актуальности, научной значимости, объему выполненных исследований, новизне полученных результатов и научных положений диссертация Усольцевой П.С. полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013г., № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Усольцева П.С., заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 - вирусология.

Отзыв обсужден на межлабораторном заседании отдела актуальных и вновь возникающих инфекций с пандемическим потенциалом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Протокол № 4 от «13» мая 2021 года).

Отзыв подготовил:

Ведущий научный сотрудник лаборатории полиомиелита  
и других энтеровирусных инфекций с референс-центром  
ВОЗ по надзору за полиомиелитом  
ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»,  
профессор кафедры организации и технологии производства  
иммунобиологических препаратов Института фармации  
и трансляционной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова  
доктор медицинских наук  
(03.00.06 – вирусология 14.00.30 – эпидемиология)  
e-mail: ivanova\_oe@chumakovs.ru



О.Е. Иванова

Подпись О.Е. Ивановой удостоверяю  
Ученый секретарь ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»  
к.б.н.  
«17» мая 2021 года



А.В. Белякова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»)

Адрес: поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, город Москва, 108819

Тел./факс (495) 841-90-02; (495) 549-67-60; (495) 841-93-21

E-mail: sue\_polio@chumakovs.ru, <http://www.chumakovs.ru>