

ОТЗЫВ

официального оппонента Злобина Владимира Игоревича на диссертацию Тучинской Ксении Константиновны «Влияние неинфекционных частиц вируса клещевого энцефалита на иммунный ответ и эффективность противовирусных препаратов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
1.5.10 – Вирусология

Актуальность темы диссертационного исследования. Работа К.К. Тучинской посвящена изучению некоторых недостаточно освещенных в научной литературе аспектов структурной гетерогенности вируса клещевого энцефалита. Клещевой энцефалит является одной из наиболее тяжелых вирусных инфекций на территории нашей страны, протекающих в ряде случаев с тяжелым поражением ЦНС, грубыми остаточными явлениями вплоть до летальных исходов. Возбудителем является вирус клещевого энцефалита, относящийся к семейству Flaviviridae, циркулирующий в природных очагах, широко распространенных в России и имеющих тенденцию к расширению. Вирус входит в экологическую группу арбовирусов и передается человеку преимущественно через укусы иксодовых клещей. Заболеваемость клещевым энцефалитом, уровень которой колеблется год от года, постоянно регистрируется в 25 странах Европы и Азии, а в России – на многих территориях от Калининградской области до Сахалинской. Этим объясняются активно проводимые исследования различных сторон этиологии, патологии, иммунитета при этой инфекции, ведутся разработки и усовершенствования средств специфической профилактики и терапии. Исследования этиологического фактора последних лет принесли новую научную информацию относительно стратегии его репликации, генетической структуры природных популяций, географического распространения, эволюции. Однако, за пределами внимания исследователей оставались весьма важные характеристики вирусных популяций, такие как структурная гетерогенность. Между тем, имеющиеся сведения о наработке в процессе репродукции вируса, помимо зрелых инфекционных частиц, неинфекционных вирионов, обладающих теми или иными дефектами структуры, указывали на важность понимания их роли в патологическом процессе, ответных иммунных реакциях, при разработке профилактических и лечебных препаратов. Исходя из этого, актуальность темы диссертации К.К. Тучинской «Влияние неинфекционных частиц вируса клещевого энцефалита на иммунный ответ и эффективность противовирусных препаратов» не вызывает сомнений.

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Построение адекватного дизайна работы, четко сформулированные цель и задачи исследования явились предпосылкой планирования и осуществления хорошо продуманных экспериментов, получения достоверных результатов и формирования научно обоснованных выводов и положений. Этому способствовало также использование набора современных методических приемов, демонстрирующих надлежащий высокий уровень работы. Рассматриваемые в диссертации вопросы полностью соответствуют паспорту заявленной научной специальности 1.5.10 – Вирусология. Результаты исследований опубликованы в рейтинговых отечественных и зарубежных научных журналах и доложены на научных конференциях, что является свидетельством положительной оценки работы научным сообществом.

Достоверность и научная новизна. Выполнение запланированного исследования потребовало анализа и дальнейшего применения подходящих методов, включая современные вирусологические, молекулярно-биологические, иммунологические тесты, что было выполнено и в результате чего была достигнута воспроизводимость и достоверность полученных результатов. Все данные экспериментов были подвергнуты представленной по ходу изложения материалов статистической обработке.

Научная новизна диссертационной работы очевидна, поскольку, несмотря на актуальность, исследования по данной теме слабо представлены в научной литературе. Новыми являются выявленные автором факторы, определяющие соотношение инфекционных и неинфекционных частиц в вирусной популяции. Впервые установлено, что увеличение присутствия в популяции неинфекционных вирионов ведет к усилению иммунного ответа. В то же время у животных, вакцинированных инактивированной цельновирионной вакциной КЭ, при заражении вирусом с повышенной долей неинфекционных частиц отмечено снижение бустерного ответа. Установлено, что иммунный ответ на заражение препаратами зрелого и незрелого вирусов имеет значительные отличия. Впервые показано, что антитела к незрелому вирусу КЭ быстро элиминируются и не формируют протективного иммунитета. Получены новые важные данные о способности неинфекционных вирусных частиц служить мишенями («ловушками») для нейтрализующих антител и некоторых противовирусных соединений, что может вести к снижению эффективности препаратов для специфической профилактики и терапии клещевого энцефалита.

Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов. Значимость диссертационной работы К.К. Тучинской для науки заключается в раскрытии и характеристике феномена

продукции зараженной вирусом клещевого энцефалита клеткой не только популяции полноценных зрелых инфекционных вирионов, но и разнообразных неинфекционных вирусных частиц, имеющих те или иные дефекты структуры от отсутствия генома (пустые вирионы) или наличия неполного генома до измененной конформации белка оболочки Е и не случившегося процессинга белка ргМ – предшественника мембранного белка М. Кроме того доля неинфекционного вируса в популяции может значительно возрастать в результате внешних воздействий, например повышенной температуры. Выявленные автором факты различий иммунологических свойств инфекционного, неинфекционного вирусов и их смеси важны для понимания процессов, происходящих при инфицировании как иммунного, так и неиммунного организма. В частности, интересны наблюдения повышенной сероконверсии смеси инфекционного и неинфекционного (прогретого) вируса. А также зрелого и незрелого вирусов. Это дает пищу для размышлений разработчикам вакцин. Вообще, значимость работы для практической деятельности представляется вполне очевидной: согласно результатам рецензируемой работы, наличие в вирусной популяции значительной доли неинфекционных вирусных частиц оказывает влияние на эффективность вакцинных препаратов и химических соединений, антивирусное действие которых основано на связывании с определенными доменами белка оболочки Е вируса КЭ. Следовательно, разработчики этих средств должны учитывать, а, возможно, и использовать выявленные феномены для повышения их качества и эффективности.

Структура работы. Диссертационная работа построена по традиционному плану, изложена на 125 страницах и состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Перспективы дальнейшей разработки темы», «Список сокращений и условных обозначений», «Список литературы», содержащий 201 источник. В работе содержатся 10 таблиц и 51 рисунок.

Во введении рассматриваются актуальность темы, степень разработанности темы, цель и задачи работы, научная новизна работы, практическая и теоретическая значимость работы, методология и методы работы, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов, публикации, структура и объем диссертации.

Глава 1 «Обзор литературы» открывается подразделом «Оценка инфекционности вирусов с учетом структурной гетерогенности вирусной популяции», который необходим автору для осмысления имеющейся суммы знаний в конкретной выбранной области исследований. Далее описывается разнообразие неинфекционных вирусных частиц, типичное для разных вирусов. Характеризуются дефектные интерферирующие частицы (ДИЧ) и

субвирусные структуры. Обзор литературы продолжает детальный анализ строения и репликации флавивирусов, в т.ч. структуры и функции вириона, вирусной РНК, структурных белков С, ргМ, Е и с особым акцентом - неструктурного белка NS1, который в процессе репродукции вируса секретируется во внеклеточное пространство, выступая в роли т.н. «растворимого антигена» вируса КЭ. Далее автор рассматривает подробно цикл репродукции вируса. Следующий раздел посвящен описанию вирусных частиц, образующихся в процессе флавивирусной инфекции. В разделе «Иммунный ответ при инфекции ВКЭ» обсуждаются вопросы врожденного и адаптивного иммунного ответов. В разделе «Лечение и профилактика ВКЭ» рассмотрены вакцинопрофилактика КЭ, исследуемые препараты для лечения КЭ, низкомолекулярные ингибиторы.

Глава 2 «Материалы и методы» дает описание вирусов, использованных в работе, а также – противовирусных соединений, клеточных культур, лабораторных животных. Излагаются методы работы с экспериментальными животными. Вирусологические и иммунологические методы включают получение зрелого, незрелого и прогретого вирусов, титрование вирусов *in vitro* и *in vivo*, реакцию нейтрализации методом бляшек и некоторые другие. Из молекулярно-биологических методов следует упомянуть ПЦР в реальном времени, белковый электрофорез в ПААГ, вестерн-блот, иммуноферментный анализ, криоэлектронная микроскопия, исследования репертуара Т-клеточных рецепторов, поточная цитометрия, статистические методы.

Глава 3 «Результаты и обсуждение». В главе дается описание экспериментов с целью выявления факторов, влияющих на долю неинфекционного вируса в пробе. В результате автором выделяются основные факторы, такие как свойства штамма, стадия инфекции и система репродукции. Далее автор изучает влияние условий хранения на структурную гетерогенность вирусной популяции и показывает, что при термической обработке, даже при низких температурных режимах происходит накопление неинфекционных частиц, содержащих геном и вирусную оболочку. В следующей серии экспериментов диссертант исследовала влияние избыточного количества неинфекционных вирусных частиц в пробе на инфекционный процесс и эффективность вакцины КЭ. Было установлено, что неинфекционные вирусные частицы не оказывали влияния на продолжительность жизни и инкубационный период подопытных мышей, а иммунизация вакциной «Клещ-Э-Вак» эффективно защищала животных. Сходные данные были получены при изучении препаратов, содержащих незрелый вирус КЭ. Оценка влияния незрелых неинфекционных ВЧ на нейтрализующую активность антител показала, что, присутствуя в популяции ВКЭ, они могут снижать титры нейтрализующих антител, а степень их снижения может быть связана со способом получения сыворотки. Также

выявлен практически важный феномен, связанный с незрелыми ВЧ, а именно, их способность играть роль дополнительных мишеней для нейтрализующих антител.

В заключении автор подводит итоги проведенным исследованиям и в краткой форме резюмирует полученные результаты.

Выводы соотносятся с полученными научными данными и в целом свидетельствуют о достижении диссертантом поставленной цели и задач диссертационного исследования.

Список цитируемой литературы вполне адекватен теме диссертационной работы и включает необходимое и достаточное число публикаций.

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями ВАК РФ и в полной мере отражает содержание диссертационной работы. Статьи по теме диссертации опубликованы в изданиях, одобренных ВАК РФ, а также входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus и WoS.

В целом диссертационная работа К.К. Тучинской производит благоприятное впечатление, благодаря проведенным на высоком научном уровне исследованиям в малоизученной области, которая, тем не менее, представляет большой интерес, прежде всего, в аспекте создания и усовершенствования вирусных препаратов и выходит за рамки изучения вирусов семейства Flaviviridae. Диссертант заслуживает всяческого одобрения за проявленную инициативу в разработке данной темы, которая, хочется надеяться, получит дальнейшее развитие.

Замечания и вопросы по теме диссертации.

Оценивая в целом положительно диссертационную работу, приведем некоторые возникшие в ходе рецензирования замечания.

1. Вопрос о штаммовых различиях в образовании той или иной доли неинфекционных частиц, на наш взгляд, не столь однозначен и нуждается в дальнейшем изучении. Число испытанных штаммов недостаточно. Кроме того, в исследование были взяты штаммы, имеющие очень длительную пассажную историю, причем не известно, как они хранились многие годы, в каких условиях проводились пассажи (вероятно, многочисленные) и как они могли повлиять на структуру популяции (во всяком случае такие данные в диссертации не приводятся). Для стандартизации условий опыта и минимизации влияния пассажной истории, вероятно, было бы целесообразно увеличить число испытываемых штаммов и предварительно провести несколько пассажей на одной и той же клеточной культуре, при одинаковой температуре,

одинаковых множественности заражения, экспозиции и т.д. Кроме того, было бы нелишним исследовать в сравнительном аспекте свежие изоляты вируса от клещей и млекопитающих. Если согласиться, что продукция определенной доли неинфекционных ВЧ – это штаммовая характеристика, она должна воспроизводиться, т.е. быть генетически обусловленной. Следует ли из этого, что вирусным геномом детерминируется производство бракованного потомства?

2. Представлены данные об увеличении сероконверсии и титров антител при заражении животных смесью инфекционного и неинфекционного вируса, зрелого и незрелого вирусов по сравнению с исходным инфекционным вирусом. Этот факт констатируется, но не обсуждается с позиции возможного механизма, чего можно было бы ожидать.

3. Литературное оформление работы заслуживает в основном хорошей оценки, хотя имеются некоторые досадные ошибки. Неоднократно встречающиеся выражения «лечение и профилактика ВКЭ» неправильны. Не может быть лечения и профилактики вируса, а только – заболевания, т.е. КЭ. В разделе научной новизны читаем: «Впервые установлено, что при инфицировании животных, вакцинированных цельновирионной вакциной КЭ, препаратом вируса с повышенной долей неинфекционных ВЧ, наблюдаются изменения бустерного ответа и спектра индуцируемых антител. Так неправильно формулировать, это не результат. Следует конкретизировать, какие именно изменения наблюдаются. Имеются и другие мелкие ошибки по тексту, не влияющие на его содержание.

Вопросы по теме диссертации.

1. Хотелось бы узнать мнение диссертанта о биологическом смысле наработки в ходе вирусной репродукции огромного количества неинфекционных вирионов. Происходит ли это из-за сбоя в функционировании системы? При положительном ответе на этот вопрос следует признать, что число ошибочных синтезов вирусных компонентов и дефектов в сборке вирионов превосходит число регулярных. Если же такова стратегия репродукции вируса, для чего она и на каком уровне регулируется?

2. При знакомстве с диссертацией возникает вопрос, вероятно, являющийся одним из основных: изучалась ли кем-либо структурная гетерогенность штаммов, используемых для производства существующих коммерческих вакцин? Учитывается ли этот фактор в производстве вакцин? Может ли он влиять на эффективность вакцин? Потребуется ли корректировки технологии?

Заключение

Диссертационная работа Тучинской Ксении Константиновны на тему: «Влияние неинфекционных частиц вируса клещевого энцефалита на

иммунный ответ и эффективность противовирусных препаратов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований полностью соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации N2842 от 24.09.2013 (с изменениями в ред. Постановления Правительства Российской Федерации N2335 от 21.04.2016, N2748 от 02.08.2016, N2650 от 29.05.2017, N21024 от 28.08.2017, N21168 от 01.01.2018, NQ426 от 20.03.2021), предъявляемым к кандидатским и докторским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. — Вирусология.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов ФГБУ НИЦЭМ им. Почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России
Доктор медицинских наук (1.5.10 – Вирусология), профессор, академик РАН
Тел.: +7 499 193 30 01, e-mail: vizlobin@mail.ru

Злобин Владимир Игоревич

Подпись Злобина В.И. удостоверяю:

Ученый секретарь

ФГБУ НИЦЭМ им. Почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России

Кандидат биол. наук Кожевникова Людмила Кондратьевна

Адрес: 123098 Москва, ул. Гамалеи, 18.

Тел.: +7 499 193-71-71

e-mail: info@gamaleya.org

24.11.2022

