



УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУ «НИИ гриппа  
им. А.А. Смородинцева»  
Минздрава России,  
доктор медицинских наук, профессор  
Д. А. Лиознов

«01» октября 2024 года

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Шустовой Елены Юрьевны на тему: «Роль рекомбинации и межвидового перехода в возникновении циркулирующих вариантов энтеровирусов», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология

### **Актуальность темы диссертационного исследования и ее связь с планами отраслевой науки**

Диссертационная работа Шустовой Е.Ю. посвящена актуальной проблеме о роли рекомбинации энтеровирусов в возникновении широкого разнообразия циркулирующих вариантов этих вирусов, а также возможностях межвидового перехода.

Энтеровирусы (ЭВ) представляют собой обширный род небольших по размеру РНК-вирусов семейства *Picornaviridae*. Это вирусное семейство представляет собой одну из самых больших групп вирусов человека и животных и содержит несколько патогенов млекопитающих, таких как вирус гепатита А, вирус ящура, риновирусы (РВ) и полиовирус, этиологический агент полиомиелита и прототип ЭВ, неполиомиелитные энтеровирусы (например, вирусы Коксаки) и другие. Среди 15 видов, составляющих род энтеровирусов, семь видов содержат человеческие вирусы: энтеровирусы А-Д (EV-A до EV-D) и риновирусы А до С (RV-A до RV-C).

ЭВ — это небольшие безоболочечные вирусы, содержащие одноцепочечную РНК положительной полярности длиной около 7,5 кб. Геном кодирует большую открытую рамку считывания, которая транслируется в полипротеин, обрабатываемый вирусными протеазами (2A, 3C и 3CD) для получения четырех капсидных белков (VP1-4) и неструктурных белков, таких как протеазы и РНК-зависимая РНК-полимераза. Одним из основных механизмов изменчивости ЭВ, помимо накопления точечных мутаций, является рекомбинация, которая у ЭВ происходит часто. В опытах по коинфицированию клеточных линий различными ЭВ рекомбинантные формы регулярно идентифицируются в результате генетических обменов между вирусными штаммами в пределах одного типа,

между различными типами в пределах одного вида или даже между различными видами в случае рекомбинации, происходящей в 5' UTR. Высокая частота рекомбинационных событий приводит к возникновению вирусов с измененными свойствами, что может вызывать нетипичное течение инфекций, а также, при определенных условиях, приводит к межвидовому переходу вирусов, что и определяет высокую практическую значимость данной диссертационной работы.

Помимо высокой практической значимости диссертационного исследования необходимо отметить, что оно имеет и несомненную теоретическую значимость. Механизмы рекомбинации различных ЭВ из группы А до момента проведения исследования были изучены слабо, что не позволяло в полной мере оценить роль рекомбинации в возникновении новых вариантов ЭВ, а также четко идентифицировать частоту рекомбинационных событий у различных ЭВ вида А и наличие «горячих точек» рекомбинации в геноме.

#### **Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций**

В результате проведенных исследований на выборке из 80 штаммов ЭВ вида А путем проведения секвенирования фрагментов VP1, 2С и 3D впервые был выполнен анализ рекомбинации у энтеровирусов вида А как единого целого. В частности, было показано, что в структурной области генома VP1 все отобранные для анализа образцы группировались в соответствии с типами с образцами, взятыми из Genbank, в то время как в двух других областях генома 2С и 3D филогенетические группы значительно отличались от таковых для VP1, что подтвердило происходившие многочисленные события рекомбинации. В ходе проведенного подробного филогенетического анализа была впервые изучена временная динамика рекомбинации у разных типов ЭВ вида А. Впервые показано, что ЭВ EV-A71, CV-A16, CV-A4 и CV-A10 характеризуются ограниченной рекомбинацией, варианты EV-A76 и EV-A90 не имеют признаков рекомбинации с классическими типами ЭВ вида А, в то время как остальные типы ЭВ вида А демонстрировали признаки активной рекомбинации.

Впервые показано, что граница областей VP1-2А, считавшаяся ранее «горячей точкой» рекомбинации, по всей видимости является артефактом, наблюдаемым по причине разной силы филогенетического сигнала в данных участках генома; при этом частота рекомбинации между областями генома VP1/2С и 2С/3D примерно сопоставима.

Особый интерес представляет часть исследования, посвященная происхождению вирусов Г75 и О72, вызвавших две крупные вспышки везикулярной болезни свиней в

Советском Союзе. Впервые выполнено полногеномное секвенирование штамма Т75, показано, что штамм Т75 на 80,0–90,4% идентичен последовательностям вируса CV-B4 и произошел от человеческого вируса CV-B4, а не CV-B5, как считалось ранее. Кроме того, впервые было установлено, что штамм Т75 является мозаичным рекомбинантом. Таким образом, в результате ретроспективного анализа доказано, что обмен частями генома разных родительских последовательностей ЭВ приводит к более высокому генетическому разнообразию и может способствовать преодолению межвидового барьера, создавая новые эволюционные ниши для ЭВ.

### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Основные положения диссертации, выносимые на защиту, хорошо аргументированы. Результаты исследований подтверждены молекулярно-генетическими и, прежде всего, различными филогенетическими методами, позволяющими сделать однозначные заключения. В работе не используются методы описательной и аналитической статистики, однако необходимо отметить, что они заложены в методах филогенетики, являющихся основными в данном диссертационном исследовании. Результаты работы были представлены на трех международных профильных конференциях: международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» к 90-летию Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург, Россия, 5-7 июня 2013 года), V Европейском конгрессе вирусологов (Лион, Франция, 11-14 сентября 2013 года), и Конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность - 2024» (Москва, Россия, 16-17 апреля 2024 года). Результаты диссертационного исследования были опубликованы в пяти научных работах, из них работ, опубликованных согласно Перечню рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Минобрнауки России (перечень ВАК) – 1.

### **Оценка содержания диссертации и ее завершенности**

Общий объем диссертации составляет 123 страницы. Диссертация построена по традиционному плану, состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, выводы и список литературы, включающий 227 источников, из них 13 на русском языке, 214 – на английском языке. В структуре диссертации представлены 25 таблиц и 39 рисунков.

Первая глава диссертации посвящена подробному обзору литературы об энтеровирусах, включая современные представления об энтеровирусах, их классификации, жизненном цикле и строении генома, рецепторах, клинических проявлениях. Подробно рассмотрены механизмы рекомбинации энтеровирусов, а также методы филогенетики, позволяющие проводить анализ, в дальнейшем использованный в работе. Кроме того, рассмотрены примеры межвидового перехода энтеровирусов. Обзор литературы написан логично, легко читается и не требует специальных комментариев, замечания к данной главе отсутствуют.

Глава «Материалы и методы» исследования изложена подробно. Из приведенного описания видно, что в работе использован широкий круг методов, включая методы традиционной вирусологии по ведению клеточных культур, накоплению вируса в культуре, а также методы молекулярной биологии, включая методы полимеразной цепной реакции и секвенирования по Сэнгеру. Кроме того, для анализа полученных последовательностей были использованы современные инструменты для построения выравниваний последовательностей, филогенетических деревьев, метода молекулярных часов. Набор методов адекватен поставленным задачам исследования.

В главе «Результаты и обсуждения» представлены данные анализа геномов 80 ЭВ вида А, приведены результаты исследования рекомбинации и времени возникновения общего предка для отдельных вариантов ЭВ. Кроме того, представлены результаты исследования геномов ЭВ, вызвавших вспышку заболеваний у свиней в Советском Союзе, впервые идентифицирована субвидовая принадлежность штамма Т75 и его отличие от штамма О72. Обсуждается роль рекомбинации в эволюции ЭВ и возможности обеспечения межвидового перехода. Полученные результаты сопоставимы с данными, полученными другими исследователями, и при этом существенно дополняют и уточняют их.

В разделах «Практические рекомендации» и «Перспективы дальнейшей разработки темы» очень кратко приводятся возможные практические рекомендации и направления исследований, которые будут актуальны для продолжения изучения роли рекомбинации в эволюции ЭВ.

Выводы, приведенные по результатам выполненной диссертационной работы представлены четко и следуют из материалов диссертации. Апробация результатов работы является достаточной: по результатам диссертации опубликовано пять научных работ, в том числе одна в Перечне рецензируемых научных изданий (Перечень ВАК).

Принципиальных замечаний, по существу и структуре диссертации нет. Из недочетов следует указать следующие. В работе употребляются выражения и обороты из

разговорной речи, не соответствующие стилистике изложения работы, такие как «замечательная генетическая стабильность», «облако генетической информации», «малоприспособленный вирусный геном». В тексте работы встречаются пунктуационные ошибки, неверное написание фамилий авторов цитируемых работ.

Отдельно необходимо отметить неверное оформление списка использованных источников, в котором источники на русском языке приведены внутри списка источников на английском языке, при этом все источники приведены не в алфавитном порядке, а в порядке встречаемости в тексте, что затрудняет восприятие и не соответствует рекомендациям по оформлению списка по ГОСТ, поскольку научные материалы, написанные на иностранном языке, всегда указывают в последнюю очередь.

Перечисленные материалы не носят принципиального характера, а касаются лишь технических аспектов оформления работы.

В ходе прочтения диссертации сформировалось несколько вопросов к автору исследования.

- 1) Поскольку все исследованные штаммы ЭВ вида А были выделены из клинических материалов от людей, была ли попытка проанализировать влияние рекомбинации на тяжесть течения инфекции?
- 2) Почему, по мнению автора, некоторые ЭВ вида А имеют ограниченный профиль рекомбинации, в то время как другие, более «новые» варианты, демонстрируют широкие возможности и частоту рекомбинации?
- 3) Как изучение рекомбинации может способствовать созданию эффективных средств профилактики и терапии ЭВ инфекций?
- 4) Описаны ли случаи, когда зоонозные ЭВ, возникшие в результате перехода от человека к животным, вновь вызывали инфекции у людей («обратный зооноз»)?

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Полученные в работе результаты важны для понимания общих закономерностей эволюции ЭВ вида А; кроме того, достоверно показано формирование зоонозных вариантов ЭВ от ЭВ, поражающих человека. В совокупности полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения генетического мониторинга за изменчивостью энтеровирусов как у людей, так и у животных с целью своевременной идентификации новых возбудителей, обладающих свойствами повышенной вирулентности и патогенности, а также для разработки современных средств профилактики и терапии ЭВ инфекций.

**Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным  
Положением о порядке присуждения ученых степеней**

Диссертационная работа Шустовой Елены Юрьевны на тему: «Роль рекомбинации и межвидового перехода в возникновении циркулирующих вариантов энтеровирусов», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология представляет собой выполненную и законченную научно-квалификационную работу, по актуальности, научной новизне, объему исследований и практической значимости полученных результатов отвечающей требованиям п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (с изменениями в ред. Постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016; № 650 от 29.05.2017; № 1024 от 28.08.2017; № 1168 от 01.01.2018; № 426 от 20.03.2021; № 101 от 26.01.2023; с изменениями в действующей ред. № 62 от 25.01.2024), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Шустова Елена Юрьевна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Ученого Совета ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, протокол № 7 от 01 октября 2024 года.

Заместитель директора по научной работе,  
заведующий отделом этиологии и эпидемиологии  
ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»  
Минздрава России, кандидат биологических наук  
адрес электронной почты: [daria.danilenko@influenza.spb.ru](mailto:daria.danilenko@influenza.spb.ru)  
тел.: + 7 (812) 499-15-25



Дарья Михайловна Даниленко

Подпись к.б.н. Даниленко Д.М. заверяю  
Ученый секретарь ФГБУ «НИИ гриппа им.  
А.А. Смородинцева» Минздрава России,  
кандидат медицинских наук

 Т.Г. Лобова

« 1 » октября 2024 года

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России), 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 15/17. Телефон: +7 (812) 499-15-00, [www.influenza.spb.ru](http://www.influenza.spb.ru), [office@influenza.spb.ru](mailto:office@influenza.spb.ru)