

УТВЕРЖДАЮ

Врио генерального директора
ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора
Р.А. Максютов
2016 г.



ОТЗЫВ

**ведущей организации о диссертационной работе Ковалева Сергея Юрьевича
«Происхождение, распространение и эволюция вируса клещевого энцефалита»,
представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности 03.02.02 – вирусология (биологические науки)**

Актуальность темы диссертации

Работа посвящена вирусу клещевого энцефалита, типичному представителю рода *Flavivirus*, широко распространенному в природных очагах северной Европы и Азии. Собственно само семейство флавивирусов (*Flaviviridae*), род *Flavivirus* объединяет в своем составе 53 различных вида РНК-содержащих вирусов. Диаметр вирионов флавивирусов составляет около 50 нм и вирусные частицы имеют липидную мембрану. Геном флавивирусов представлен одноцепочечной инфекционной РНК размером от 9500 до 12500 н.о.. Вирусный геном кодирует один полипротеин, который подвергается процессингу вирусными и клеточными протеазами с образованием индивидуальных структурных и неструктурных вирусных белков. 5'- и 3'-нетранслируемые районы геномной РНК весьма переменчивы и для ВКЭ они имеют длину около 130 и 400-700 н.о., соответственно.

Флавивирусы способны инфицировать широкий круг организмов: млекопитающих, членистоногих, птиц, рептилий и формируют природные очаги в различных географических регионах мира. Многие представители семейства способны вызывать заболевания у человека. Наиболее значимые для человека флавивирусные инфекции связаны с вирусами денге, желтой лихорадки, японского энцефалита, Западного Нила и Зика. Для клинической картины этих заболеваний характерны тяжелые лихорадки, менингиты, энцефалиты, тяжелые поражения печени и других внутренних органов, а для лихорадки Зика характерны тяжелые поражения ЦНС эмбриона человека. Наибольшую медицинскую значимость для России имеет вирус клещевого энцефалита (ВКЭ). Кроме того, на территории Российской Федерации показана циркуляция вирусов Западного Нила, Омской геморрагической лихорадки, Повассан и, предположительно, вируса японского энцефалита. В последние годы

постоянно регистрируются завозные случаи лихорадки денге и Зика.

В большинстве случаев передача флавивирусной инфекции осуществляется переносчиком (вектором) - комаром или клещом. Это позволяет условно подразделять флавивирусы на клещевые и комариные, а также на группу вирусов, для которых вектор не известен. Филогенетический анализ, проведенный на основе полногеномных последовательностей флавивирусов, подтверждает справедливость такого разделения. Известно, что клещевые флавивирусы, связанные с морскими птицами, широко распространены в районах массового гнездования в Северном и Южном полушариях. Это позволило ряду авторов высказать предположение, что ареал клещевых флавивирусов расширился из районов обитания птиц в сторону лесов Евразии, где основным хозяином флавивирусов становились иксодовые клещи. Далее, эволюция флавивирусов продолжалась в лесных и лесостепных районах континента. Другая распространенная гипотеза эволюции флавивирусов состоит в том, что большинство современных представителей клещевых флавивирусов являются потомками вирусов, существовавших около 10-13 тысяч лет назад в конце последнего ледникового периода. Именно его окончание изменило климатические условия и географическое распространение многих видов членистоногих, птиц и млекопитающих в северной Евразии. Это, в конечном итоге, привело к значительным изменениям географического распространения клещевых флавивирусов, и создало новые условия для их эволюции. Считается, что именно эти события вызвали появление вируса клещевого энцефалита в природных ландшафтах северной Евразии.

Другим важным фактором изменения природной среды является экономическая деятельность человека, что также могло создать предпосылки эволюционного расхождения некоторых групп флавивирусов, особенно в течение последних двух-трех веков. Эти соображения обуславливают особый интерес к молекулярной эволюции флавивирусов в природных очагах Евразии и роли антропогенного воздействия на эволюцию флавивирусов в этих природных очагах.

В рамках исследования эволюции флавивирусов, на основе анализа нуклеотидных последовательностей геномов, особое практическое значение имеют получаемые данные о генетических особенностях и направленности эволюции флавивирусных популяций. Именно фундаментальные данные о структуре геномов флавивирусов являются основой для развития современных методов диагностики, профилактики и лечения флавивирусных инфекционных заболеваний. Эти данные предопределили быстрое развитие методов ПЦР диагностики, совершенствование и создание новых вакцин против флавивирусов, а также создание новых

высокоэффективных противовирусных препаратов, блокирующих ферментные активности NS3 и NS5 неструктурных белков флавивирусов.

Основное содержание, уровень анализа и завершенность диссертации

Диссертация Ковалева С.Ю. объемом 323 страниц состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, двух глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. В список литературы вошли 305 первоисточников, в том числе 76 публикаций отечественных и 229 зарубежных авторов. Работа содержит 15 таблиц, 39 рисунков и 10 приложений.

Во введении обосновывается актуальность темы исследования, раскрыта степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы сформулирована следующим образом: «разработать систему классификации вируса клещевого энцефалита в пределах субтипа и на основе комплексного подхода предложить гипотезу о времени происхождения, путях распространения и механизмах эволюции ВКЭ». Описана научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, методология и методы исследования, сформулированы выносимые на защиту положения диссертационной работы. Проведена оценка степени достоверности полученных результатов, приведены данные по апробации результатов и личному вкладу автора.

В **первой главе** представлен обзор литературы, в котором имеются следующие разделы: общая характеристика вируса клещевого энцефалита, географическое распространение субтипов ВКЭ, проблемы генетической идентификации штаммов и методы типирования вируса, иксодовые клещи как основные хозяева и переносчики ВКЭ, существующие представления об эволюции ВКЭ, микроэволюционные процессы в популяциях РНК-содержащих вирусов, концепции видообразования у вирусов. Структура обзора представляется обоснованной и полной. Сам обзор написан хорошо, обобщает основные современные работы и представления по теме диссертационной работы. Он читается с большим интересом. Отдельные подразделы обзора могут быть рекомендованы в качестве основы для подготовки обзорных статей или фрагментов монографии по теме исследования. Однако более точное обоснование задач настоящего исследования могло бы позволить улучшить восприятие данного раздела и более точно сформулировать цели и задачи исследования.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования. Экспериментальная часть работы основана на большом экспериментальном материале: представленным большим количеством вирусных изолятов, иксодовых клещей и

клиническом материале от пациентов. В целом, выбор методов исследования адекватен поставленным задачам и позволяет получать достоверные результаты.

В **третьей главе** описаны отдельные аспекты изучения распространения ВКЭ и результаты исследования иксодовых клещей на территории России. Глава разбита на пять разделов, из которых 4 раздела связаны с описанием исследований ВКЭ и один раздел посвящен исследованию таежного клеща.

В **четвертой главе** автор описывает свои подходы к пониманию популяционной структуры и эволюции ВКЭ. Два раздела посвящены кластерной структуре популяций ВКЭ, один раздел описывает квантовую теорию эволюции ВКЭ и один раздел описывает возможность существования межвидовых гибридов у трех видов иксодовых клещей.

Работа завершается кратким заключением, содержащим анализ и обобщение полученных результатов, список литературы. В состав работы включены 10 приложений. Отсутствие названий у многочисленных приложений диссертационной работы затрудняет работу с этими материалами (стр. 4, 255, 257, 263, 264, 267, 269, 320, 321, 322, 323).

Научная новизна результатов исследований

На наш взгляд научная новизна исследования состоит в том, что:

1. Определены нуклеотидные последовательности фрагментов генома для более, чем 600 вариантов ВКЭ и одного полного вирусного генома, проведено их депонирование в GenBank. Это составляет приблизительно 25% всех известных и опубликованных нуклеотидных последовательностей ВКЭ.
2. Определены нуклеотидные последовательности коротких фрагментов генома для трех видов иксодовых клещей, проведено депонирование в GenBank более 100 последовательностей.
3. Проведен анализ генетического разнообразия определенных автором последовательностей и уже известных ранее последовательностей. На этой основе сделана попытка оценить значимость обнаруженных замен в секвенированных последовательностях.
4. Предложена методология генотипирования полевых образцов ВКЭ посредством использования однораундовой мультиплексной ПЦР, которая апробирована с использованием панели ВКЭ - позитивных образцов. Относительно невысокая чувствительность данного подхода для анализа реальных образцов, по всей вероятности, связана с низкой концентрацией РНК ВКЭ в исследованных автором материалах.

5. Предложены гипотезы по усовершенствованию таксономии ВКЭ, направленности и скорости эволюции ВКЭ, в том числе с учетом временных факторов. Кластеронная и квантовая гипотезы, сформулированные автором, вынесены на обсуждение в ряде публикаций в ведущих научных журналах.
6. Представлены первые результаты, подтверждающие возможность существования межвидовых гибридов у иксодовых клещей, являющихся переносчиками клещевых инфекций, в том числе и ВКЭ.

Обоснованность научных положений и достоверность полученных результатов

Полученные результаты по определению нуклеотидных и аминокислотных последовательностей ВКЭ и нескольких видов иксодовых клещей удовлетворительно согласуются с опубликованными в GenBank экспериментальными данными других авторов. В целом, достоверность этих результатов не вызывает сомнений и может быть оценена как очень высокая. Эти данные были должным образом опубликованы в рецензируемых международных журналах, в том числе в US National Library of Medicine National Institutes of Health (система баз данных NCBI), где диссертантом опубликовано 1967 сообщений о расшифрованных нуклеотидных и аминокислотных последовательностях. Полученные результаты докладывались на многочисленных российских и международных конференциях и семинарах. Диссертация представляется оригинальным документом, в ней имеются необходимые ссылки на использованные сведения других авторов.

При этом автором предлагаются новые гипотезы и предположения, часть из которых вынесена в выводы работы и опубликована международных рецензируемых журналах. Оценить значимость и достоверность этого раздела работы крайне затруднительно. Очевидный дискуссионный характер этих положений предполагает развитие дальнейшего научного обсуждения выдвинутых гипотез и выполнения независимых исследований по поиску новых аргументов подтверждающих или опровергающих эти положения и гипотезы.

Личный вклад автора

Основные результаты получены лично автором, которым была генерирована идея исследования, сформулированы цели, задачи и выводы. Самостоятельно проведено большинство лабораторных исследований, анализ и интерпретация полученных результатов. Роль автора в разработке основных положений кластеронного подхода для характеристики структуры популяций ВКЭ и квантовой теории эволюции ВКЭ также не вызывает сомнений.

Научно-практическая значимость работы

Исследования, проведенные автором диссертации, позволили определить нуклеотидные последовательности фрагмента вирусного генома, кодирующего белок Е, и соответствующему ему аминокислотные последовательности для 500 штаммов сибирского и дальневосточного субтипов ВКЭ (депонировано в GenBank 604 нуклеотидных последовательностей и столько же аминокислотных последовательностей ВКЭ).

Определена полная нуклеотидная последовательность генома штамма ВКЭ SofjinKSY (JF819648) дальневосточного субтипа, выделенного в 1937 году первой Дальневосточной экспедицией под руководством проф. Л.А. Зильбера, из коллекции Екатеринбургского научно-исследовательского института вирусных инфекций Роспотребнадзора. Автором на стр. 14 диссертации ошибочно указан код доступа в GenBank DQ486861, относящийся к штамму ЕК-382 (Эстония) и секвенированный в лаборатории проф. Каргановой Г.Г. в 2006 году.

Получены первые данные, что различные виды иксодовых клещей способны формировать гибриды посредством межвидового скрещивания. Высказано предположение, что они могут играть важную роль в эволюции ВКЭ, выступая в качестве переходного звена при смене вирусом членистоногого хозяина.

Особое практическое значение имеют полученные автором данные о генетических особенностях и направленности эволюции флавивирусных популяций. Эти фундаментальные данные о структуре геномов флавивирусов могут стать основой для развития современных методов диагностики, профилактики и лечения флавивирусных инфекционных заболеваний. Именно эти данные позволят адаптировать методы ПЦР диагностики к современным изолятам ВКЭ, провести совершенствование и создание новых вакцин против ВКЭ, а также создание новых высокоэффективных противовирусных препаратов на основе информации о генетической структуре фрагмента белка Е большого количества штаммов ВКЭ.

Материалы исследований были использованы при подготовке программ курсов лекций «Молекулярная генетика» и «Биоинформатика» биологического факультета УрФУ им. Б.Н. Ельцина.

Основные положения автореферата соответствуют тексту диссертационной работы.

Замечания

Замечания, которые можно сделать по данной работе, могут быть разделены на две группы. К первой группе замечаний следует отнести собственно ошибки и/или видимые

недостатки данной работы. Вторая группа замечаний носит дискуссионный характер и связана с обсуждением предлагаемых автором новых положений и гипотез.

1. В разделе 2.1 «материалы исследования» отсутствует информация о методах сбора иксодовых клещей и методологии их предварительной видовой идентификации. Это особенно важно для клещей, собранных с людей. В этом случае клещи бывают сильно повреждены, и возникают вполне понятные проблемы с их видовой идентификацией. Нет информации о суммарной представленности основных стадий развития иксодовых клещей в сборах. Нет данных о способности межвидовых гибридов давать потомство. Это особенно важно в свете утверждений автора о наличии межвидовых гибридов иксодовых клещей.
2. На стр. 66 представлена информация по исследованию более 200 образцов клинического материала от пациентов и погибших от клещевого энцефалита людей. Отсутствует информация о решении этических проблем при исследовании материалов от пациентов. Где, когда и каким этическим комитетом были одобрены эти исследования.
3. Раздел 2.2.5, стр. 76, 77, и далее. Понятие «Расчет скорости нуклеотидных замен», наверное, не самое точное определение в данном случае. Видимо, речь идет о частотах возникновения нуклеотидных замен в вирусных генах. В любом случае, очень важно знать длину (количество нуклеотидов) анализируемых фрагментов. К сожалению, этой информации в разделе нет. Она принципиально важна для сравнительной оценки получаемых значений и определения достоверности получаемых значений.
4. Автор постоянно использует понятие «вакцинный штамм ВКЭ», в том числе и в выводе 6. По контексту понятно, что речь идет о производственном (ых) штамме (ах) ВКЭ, который (е) используется для производства инактивированных вакцин. Понятие «вакцинный» штамм применяется для аттенуированных вирусных штаммов и предполагает, что на основе этих штаммов готовят неинактивированные вакцины, содержащие живой вирус и безопасные для человека. В случае ВКЭ для производства вакцин в РФ используется штаммы 205 и Софьин, которые относятся к высокопатогенному для человека дальневосточному субтипу ВКЭ.
5. Проблема по штамму «*Soffin VT1999* из инактивированной вакцины КЭ (номер партии С45-7 К3354, год выпуска - 1999) производства ФГУП НПО «Вирион» (Томск, Россия)».

Как нам известно, при производстве Томской вакцины используется штамм 205 ВКЭ. Его полная нуклеотидная последовательность была определена и опубликована

Сафроновым с соав. еще в 1991 году (DQ989336). В 2012 году полная последовательность генома штамма 205 ВКЭ была повторно независимо определена (JX498939). Эти данные подтвердили полную генетическую стабильность штамма 205 в течение более чем 20 лет его существования в лабораторных условиях и его отличия от штамма Софьин.

Диссертант использовал для определения нуклеотидной структуры препарата вакцины, который был инактивирован формалином. Достаточно хорошо известно, инаktivация формалином приводит к модификации вирусных нуклеиновых кислот, что могло быть причиной ошибок при проведении определения нуклеотидных последовательностей. По всей вероятности, эти соображения относятся и к последовательностям штамма Софьин, восстановленных из препарата вакцины московского производства (раздел 3.3., стр. 112-115). В разделе «Материалы и методы» нам не удалось обнаружить описание достаточно известных методов работы с инактивированными формалином нуклеиновыми кислотами.

Видимо, к данным по последовательностям штамма Софьин также надо относиться с очень большой осторожностью. При всем этом, нельзя не согласиться с автором в том, что необходимо проводить определение полной нуклеотидной последовательности генома для производственных штаммов вирусов.

Ко второй группе замечаний следует отнести следующие формулировки диссертанта и нашедшие отражения в выводах работы:

Утверждения о распространении ВКЭ по территории Сибири, Урала и Северо-Запада России по транспортным путям и распространении штаммов ВКЭ через реализацию долгосрочных государственных программ по акклиматизации охотничье-промысловых зверей и птиц носят предположительный и гипотетический характер. Доказательная база явно недостаточна.

Данные по кластерному подходу и сам кластерный подход должны быть формализованы в виде стандартного метода или пакета соответствующих программ. Это позволит проверить возможность использования данного подхода для анализа других вирусных последовательностей и определить возможные рамки его применения. Это в равной мере относится и к концепции квантовой эволюции ВКЭ. Пока же представленные подходы можно трактовать как новые гипотезы (предположения) выдвинутые диссертантом. Правомочность широкого использования этих подходов для исследования ВКЭ не очевидна и нуждается в подтверждении дополнительными данными. Общепринятая тенденция по исследованию генетического разнообразия и эволюции вирусов смещается к анализу

полногеномных последовательностей. Так для ВКЭ уже депонировано в GenBank более 100 полногеномных последовательностей, что дает новые возможности анализа генетического разнообразия этих флавивирусов и направленности их эволюции.

Заключение

Несмотря на сделанные замечания, диссертационная работа является законченным самостоятельным научно-квалификационным исследованием, выполненным на высоком научном уровне, и соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а сам автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология (биологические науки).

Отзыв на диссертацию и автореферат обсуждены на заседании Ученого совета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, состоявшемся 28 декабря 2016 г, протокол № 13.

Локтев Валерий Борисович, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Кочнева Галина Вадимовна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией вирусных гепатитов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Подписи Локтева В.Б. и Кочневой Г.В. удостоверяю.

ученый секретарь ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Роспотребнадзора,

к.б.н., доцент



О.А. Плясунова

630559 р.п. Кольцово, Новосибирская обл.,
Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Телефон: (383) 336-60-10
Факс: (383) 336-74-09
E-mail: vector@vector.nsc.ru
<http://www.vector.nsc.ru>