

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Соболева Ивана Андреевича «Изменчивость поверхностных гликопротеинов вирусов гриппа А (H3N2) и В, циркулировавших на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – «Вирусология»

Актуальность темы

Вирусы гриппа А (*Orthomyxoviridae, Influenzavirus A*) и В (*Orthomyxoviridae, Influenzavirus B*), этиологически связанные с острыми респираторными заболеваниями, представляют серьёзную угрозу здравоохранению во всём мире. Сезонные эпидемии гриппа в осенне-зимний период возникают ежегодно, приводя к массовой потере нетрудоспособности и повышению смертности в группах риска. Поэтому вирусы гриппа А и В являются объектами пристального внимания со стороны научного и медицинского сообщества.

Бурное развитие молекулярно-генетических технологий на рубеже прошлого и нынешнего веков позволило глубже понять содержание процессов, лежащих в основе реализации жизненного цикла вирусов гриппа, популяционной структуры, антигенных свойств, патогенеза и формирования устойчивости к химиопрепаратам. Результатом получения новых знаний явился значительный прогресс в улучшении эпидемиологического надзора, разработка новых средств профилактики и методов защиты от инфекции. Вместе с тем, многие аспекты этих проблем требуют дальнейших более глубоких исследований.

Диссертационная работа Ивана Андреевича Соболева посвящена изучению изменчивости поверхностных гликопротеинов вируса гриппа А (H3N2) и В накануне и сразу после пандемии, вызванной вирусом гриппа А (H1N1) pdm09. Актуальность данной работы не вызывает сомнения. Большое количество исследований посвящено изучению эволюции

пандемического варианта. Но диссертант выбрал гораздо менее «модную», но, безусловно, не менее важную задачу досконально изучить изменчивость непандемических вариантов вируса на фоне пандемии гриппа. Исследование Соболева И.А. представляет несомненный интерес как с фундаментальной, так и с практической точки зрения.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна.

Достоверность и объективность полученных автором результатов обеспечивается обширным набором статистически обработанных данных и глубоким осмыслением результатов. В результате выполненных Соболевым И.А. исследований выявлены механизмы изменчивости вируса гриппа А (H3N2) и В. Автором впервые исследованы молекулярно-генетические характеристики штаммов, циркулировавших в азиатском регионе России с 2008 по 2013 гг.. Показаны наличие и направление антигенного дрейфа гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA), особенности штаммов, выделенных во время третьей волны пандемии (2010-2011 гг.) по сравнению со штаммами предпандемического (2008-2009 гг.) и постпандемических (2011-2012 гг., 2012-2013 гг.) эпидемических сезонов.

Диссертационная работа Соболева И.А. представляет собой законченное исследование, выполненное с использованием современных вирусологических и молекулярно-генетических подходов, а также, методов компьютерного анализа. В работе были использованы современные материалы, тестовые наборы и оборудование. Поставленные задачи успешно решены, цель диссертационной работы достигнута.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.

Работа Соболева И.А. представляет собой самостоятельный законченный научный труд. Им определены нуклеотидные последовательности генов HA и NA 29 штаммов вируса гриппа А (H3N2) и 33 штаммов гриппа В, выделенных в азиатской части Российской Федерации. Все последовательности депонированы в международные базы данных GenBank и GISAID и, таким образом, доступны мировому научному сообществу.

В работе Ивана Андреевича выявлены паттерны накопления мутаций в поверхностных гликопротеинах вируса гриппа и обнаружены позиции, по которым происходит накопление аминокислотных замен, ассоциированных с изменением антигенных свойств вируса, а следовательно – с уклонением от иммунного прессинга со стороны как конкретного хозяйского организма, так и коллективного иммунитета. Отсюда становится очевидна практическая значимость работы: выявлены закономерности генетической изменчивости поверхностных гликопротеинов вирусов гриппа, необходимые для правильного выбора вакцинных штаммов.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах.

Полученные Соболевым И.А. результаты были многократно апробированы на международных научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 6 научных статей в журналах из перечня ВАК. Содержание, стиль, манера изложения и обсуждения научных данных позволяют сделать заключение о высоком профессиональном уровне исследователя. Большой объем экспериментального материала, использование современных высокоинформативных методов исследования и теоретическое обобщение полученных данных позволили Соболеву И.А. сформулировать основные выводы диссертационной работы, объективность и достоверность которых не вызывает сомнений.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Результаты и выводы, представленные Соболевым И.А. в своей диссертационной работе, благодаря разнообразию использованных методов анализа, могут быть с легкостью интегрированы в дальнейшие более масштабные работы по изучению генетического разнообразия и эволюции вирусов гриппа. Нуклеотидные последовательности, депонированные в международные базы данных GenBank и GISAID, могут быть использованы другими исследователями как в России, так и во всём мире. Штаммы, депонированные в коллекцию микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», могут быть использованы для приготовления диагностических препаратов и для сравнительного анализа биологических свойств новых штаммов вирусов гриппа.

Содержание диссертации.

Структура диссертации достаточно традиционна. Работа изложена на 225 страницах и состоит из вводной части, основной части, включающей главы «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов», а также заключительной части, состоящей из выводов, списка использованной литературы и приложения.

В вводной части обосновывается актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту, обрисована разработанность проблемы, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость диссертационной работы.

Глава «Обзор литературы» посвящена обзору основных научных концепций по теме диссертации, сделанном с привлечением большого числа литературных источников. Список цитируемой литературы включает 228 наименований. В данной главе представлена общая картина современных представлений о классификации вирусов гриппа, а также их морфологии,

строении генома, белках и их функциях, механизме репликации. Кроме того, в главе «Обзор литературы» подробно рассматриваются строение и функции поверхностных гликопротеинов, изменчивость вирусов, а также генетическое разнообразие и классификация вирусов гриппа А (H3N2) и В, циркулировавших в мире с 2008 по 2013 гг..

В главе «Материалы и методы» автор приводит материалы, примененные в ходе выполнения работы, а также вирусологические, молекулярно-биологические и компьютерные методы исследования и анализа. Содержание главы «Материалы и методы» свидетельствует, что работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных экспериментальных методов и компьютерной обработки данных.

В главе «Результаты собственных исследований» автором представлен анализ экспериментального материала, полученного в течение эпидемических сезонов 2008-2009 гг., 2010-2011 гг., 2011-2012 гг. и 2012-2013 гг.. В течение пандемического сезона 2009-2010 гг., связанного с доминированием А (H1N1) pdm09, не было обнаружено вирусов гриппа А (H3N2) и В.

Результаты собственных исследований хорошо проиллюстрированы (работа включает 46 таблиц и 48 рисунков), проанализированы с достаточной степенью полноты и детализации и обсуждены в соответствующем разделе. Приведены данные о генетическом разнообразии и изменчивости HA и NA эпидемических штаммов вируса гриппа А (H3N2) и двух генетических линий вируса гриппа В, выделенных в различных населенных пунктах азиатской части России. Были определены полные нуклеотидные последовательности генов, кодирующих поверхностные гликопротеины (HA и NA), и по этим двум сегментам генома осуществлен сравнительный молекулярно-генетический анализ штаммов вируса гриппа А (H3N2), изолированных на территории азиатской части Российской Федерации. Все последовательности депонированы в международную базу данных GenBank.

Филогенетический анализ был выполнен на двух уровнях системной организации: на уровне нуклеотидных последовательностей сегментов генома,

кодирующих поверхностные гликопротеины, и на уровне соответствующих последовательностей аминокислотных остатков. Таким образом, автором была осуществлена оценка генетической изменчивости, включающей в себя синонимичные и несинонимичные замены, а также изменчивости, обусловленной появлением и накоплением аминокислотных замен, которые могут оказывать влияние на характеристики белков, в первую очередь на их антигенные свойства.

Для сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов HA и NA автор использовал несколько подходов: построение матрицы попарных генетических дистанций, построение дендрограмм и построение филогенетических сетей. Матрицы попарных генетических дистанций позволили в численной форме оценить и сравнить различия нуклеотидных последовательностей, как в пределах отдельных эпидемических сезонов, так и между штаммами, выделенными в разные сезоны. Филогенетические деревья и сплитграфы (филогенетические сети) визуализировали филогенетические связи между последовательностями. Филогенетические дендрограммы, являющиеся наиболее широко используемым в мировой практике способом представления филогенетических связей, позволили в «классической» древовидной форме оценить генетическое разнообразие и степень изменчивости вирусных штаммов. Сплитграфы, основанные на ином принципе моделирования филогенетических связей, подтвердили результаты, полученные «классическим» филогенетическим анализом и позволили наглядно представить выделение отдельных филогенетических групп.

Для анализа совокупности аминокислотных последовательностей HA и NA автором также использовались матрицы попарных дистанций (на аминокислотном уровне) и построение соответствующих дендрограмм. Кроме того, был осуществлен анализ аминокислотных замен (позиции в составе белковой молекулы, их принадлежность к антигенным сайтам и влияние на приобретение или потерю потенциальных сайтов гликозилирования) как в

отношении вакцинных штаммов, так и непосредственно между исследованными штаммами.

В содержательном смысле, глава «Результаты собственных исследований» может быть разделена на две части, одна из которых посвящена вирусу гриппа А (H3N2), а другая – вирусу гриппа В. Для каждой из частей автор приводит подробный анализ генетического разнообразия HА и NА вирусных штаммов, выделенных в рамках отдельных эпидемических сезонов, а также описывает изменчивость и филогенетические связи HА и NА общей совокупности. Кроме того, автор подробно рассматривает сходство и различие исследованных штаммов с эталонными вакцинными штаммами, а также определяет их принадлежность к генотипам, генетическим группам и подгруппам согласно общепринятой классификации. Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей Иван Андреевич дополнил результатами исследования антигенных свойств штаммов, которые представил в разделах «Динамика изменчивости поверхностных гликопротеинов штаммов вируса гриппа А (H3N2), изолированных на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.» и «Динамика изменчивости поверхностных гликопротеинов штаммов вируса гриппа В, изолированных на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.».

В главе «Обсуждение результатов собственного исследования» Соболев И.А. сопоставляет представленные в работе результаты с известными литературными данными и приводит сведения о генетическом разнообразии вирусов гриппа, циркулировавших в мире с 2008 по 2013 гг.. В этом разделе диссертации автор соотносит полученные результаты с результатами других исследований, выполненных на территории России.

Выводы соответствуют основному содержанию работы.

Автореферат достаточно полно и адекватно отражает содержание диссертации. В нем дана общая характеристика работы, кратко описаны методы, использованные при проведении исследования, основные результаты, из которых следуют выводы.

Замечания

1. В разделе «Результаты собственных исследований», при описании нуклеотидных и аминокислотных последовательностей НА и NA вирусов гриппа в отдельные эпидемические сезоны, текст перегружен однообразными и повторяющимися синтаксическими конструкциями.

2. В работе подробно проанализированы НА и NA вирусов гриппа, но абсолютно не затронуты внутренние белки и сегменты генома, их кодирующие.

3. Автор не приводит никаких данных о связи выявленных изменений с клиническими проявлениями заболевания, а также с наличием или отсутствием вакцинации. Понятно, что это выходит за рамки смыслового ядра работы, но необходимо было, на мой взгляд, хотя бы объяснить, почему такие данные (представляющие колоссальный практический интерес !) не были собраны.

4. Иллюстративный материал (в частности, филогенетические сети) не всегда удобен для восприятия – следовало бы использовать составные дендрограммы.

5. В библиографическом перечне крайне скудно (я бы даже применил термин «неоправданно убого») представлены работы отечественных учёных, что явно не соответствует уровню их вклада в разработку обсуждаемой проблематики.

6. Разумеется, автору не удалось избежать орфографических и пунктуационных ошибок, опечаток и неудачных смысловых конструкций – однако это свойственно всякой объёмной рукописи.

Сделанные замечания не имеют принципиального характера и не умаляют ценности диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Соболева Ивана Андреевича «Изменчивость поверхностных гликопротеинов вирусов гриппа А (H3N2) и В, циркулировавших на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.»,

представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – «Вирусология», является законченной научно-квалификационной работой, которая вносит важный вклад в изучение изменчивости вирусов гриппа – этиологических агентов актуальных массовых заболеваний человека. Результаты и методические подходы работы целесообразно использовать для дальнейшего изучения вирусов гриппа, циркулирующих в азиатской части России и за её пределами.

Диссертационная работа по важности поставленных и решенных в ней задач, соответствует современному методическому уровню их решения, по уровню научной и практической значимости полученных результатов, обоснованности научных положений и выводов, полноте апробации и публикации результатов соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым ВАК России к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор – Соболев Иван Андреевич – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 – «Вирусология».

Доктор биологических наук по специальности 03.02.02 – «Вирусология»,
доцент по специальности 03.02.02 – «Вирусология»,
заведующий лабораторией экологии микроорганизмов
Дальневосточного федерального университета (г. Владивосток),
заведующий лабораторией вирусологии
ФНЦ биоразнообразия наземной биоты
Восточной Азии ДВО РАН (г. Владивосток)

М.Ю. Щелканов

