

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук С. В. Альховского на диссертацию Морозовой Ольги Владимировны «Генотиповое разнообразие и филодинамика циркулирующих на территории России ротавирусов, сравнение с вакцинными штаммами» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – «Вирусология»

Актуальность темы диссертационного исследования

Ротавирусная инфекция остается одной из основных причин острых кишечных (ОКИ) заболеваний у детей и взрослых. Эта инфекция не представляет опасности для жизни взрослых и большинства детей, однако в мире до сих пор в год регистрируют до полумиллиона детских смертей, связанных с ротавирусным острым гастроэнтеритом, преимущественно в слабо развитых странах. В России ротавирусная инфекция ответственна за более чем 40% ОКИ у детей, которым потребовалась медицинская помощь в условиях стационара. По экономическим потерям ротавирусная инфекция занимает шестое место среди всех инфекционных заболеваний.

Борьба с инфекционным заболеванием в первую очередь требует всестороннего изучения его этиологического агента. Ротавирусы относятся к РНК-содержащим вирусам, которые являются самыми изменчивыми представителями живой природы. Геном ротавирусов представлен сегментированной РНК и в процессе их репликации возможен обмен (реассортация) сегментами генома между разными вирусами. Эти процессы ведут к постоянному появлению новых изолятов, которые обладают измененными биологическими или антигенными свойствами. Популяция ротавирусов неоднородна и одновременно могут циркулировать множество вариантов, одни из которых временно занимают доминирующее положение, другие представлены в незначительной доле. Изучение генетической структуры ротавирусной популяции и механизмов формирования и распространения новых вариантов вируса представляет значительный фундаментальный интерес. Фундаментальное значение также представляет вопрос о происхождении новых генотипов ротавирусов. Штаммы с редкими G[P]-типами в основном рассматриваются как зоонозы и в развивающихся странах могут быть частыми причинами инфекций у детей в связи с их контактами с животными. Как правило, это спорадические случаи, которые, однако, могут достичь эпидемиологической значимости в некоторых географических регионах, вероятно, вследствие способности ротавирусов к реассортации и их высокой изменчивости. Помимо фундаментальных

аспектов, исследования по теме диссертации носят выраженное практическое значение, предоставляя сведения о соответствии применяемых и разрабатываемых вакцин циркулирующим штаммам ротавируса. Этот вопрос важен в оценке эффективности применяемых вакцин, поскольку в процессе эволюции циркулирующие штаммы могут накапливать мутации в нейтрализующих эпитопах и могут появляться новые генотипы вирусы, способные избегать иммунного ответа, индуцированного вакциной. Таким образом, высокая актуальность выбранной темы исследования определяется как фундаментальными, так и прикладными аспектами современной медицинской вирусологии.

Научная новизна диссертационной работы

Исследования геномного разнообразия ротавирусов, их изменчивости и соответствия вакцинным штаммам носят в нашей стране фрагментарный характер. Авторами на модели Нижегородской области проведено наиболее масштабное и углубленное изучение этого вопроса. Научная новизна исследования определяется приоритетными данными о генотипической структуре ротавирусной популяции, новыми данными об их эволюции, и о полифилетическом происхождении новых (двойных) реассортантных штаммов.

В целом, представленные в работе данные значительно расширяют наши знания о разнообразии ротавирусов, циркулирующих на территории России и представляют собой научный фундамент для дальнейшего мониторинга генетических характеристик циркулирующих штаммов в контексте как использования существующих вакцин, так и разработки новых. Выбор кандидатных штаммов для вакцин, применяемых на территории России, должен проводиться с учетом представленных в работе результатов.

Достоверность и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность сделанных в работе выводов основывается на большом объеме проанализированного материала и использовании самых современных методов генетического и филогенетического анализа. Работа проведена на значительной выборке образцов: всего автором проанализирован клинический материал от 6100 детей с ОКИ, поступивших в стационары г Нижнего Новгорода в 2016-2020 гг. Из них выявлено около 2000 положительных на ротавирусы образцов, которые были проанализированы методами электрофореза в ПААГ и в ПЦР. Проведено типирование с использованием разных методов 1223 образцов. Более 200

штаммов были секвенированы как минимум по одному гену. Два штамма генотипов G2P[4] и G4P[8] были секвенированы полностью. Таким образом, авторами накоплен значительный научный материал для анализа. Для подробного филогенетического анализа дополнительно использованы нуклеотидные последовательности из международной базы данных GenBank. В работе использованы современные методы генетического анализа вирусных геномов. Эволюционный анализ проведен с использованием последних версий программ биоинформационной обработки на основе Байесовского алгоритма. Достоверность полученных результатов подтверждает использование для проведения работы современного оборудования, реактивов, зарегистрированных на территории России тест-систем и общепринятых молекулярно-генетических методов исследования. Статистическая обработка данных проведена с использованием соответствующих математических алгоритмов.

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, базируются на полученных результатах, обсуждены на основе анализа современной литературы, в том числе, статей зарубежных авторов последних лет. Полученные данные опубликованы в рецензируемых журналах соответствующего профиля. Таким образом, достоверность представленных в работе данных не вызывает сомнений.

Характеристика работы

Диссертационная работа построена по стандартному плану и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, три главы с изложением и обсуждением полученных результатов, заключение, выводы, список цитированной литературы и приложение. Список литературы включает 340 источников отечественных и зарубежных авторов. Графический материал представлен 20 рисунками и 12 таблицами.

В разделе «Введение» автор обосновывает актуальность исследования, формулирует цель и задачи, научную новизну и практическую значимость своей работы, а также основные положения, выносимые на защиту. При описании актуальности работы автором указывается на то, что в России более 40% острых гастроэнтеритов у детей вызваны ротавирусами, и общий экономический ущерб от этой инфекции занимает шестое место среди всех инфекций. Вирусная популяция в генетическом плане очень разнообразна и динамична. Использование живых вакцин помогает облегчить бремя этой инфекции, однако необходимы масштабные исследования, направленные на изучение возможного влияния вакцинопрофилактики на генотипическую структуру вирусной популяции и на заболеваемость в целом. Таким образом,

актуальность и важность разрабатываемой темы диссертации не вызывает сомнений. Сформулированные цели и задачи полностью соответствуют теме диссертации. На защиту вынесены четыре положения, представляющие основные результаты работы. Положения в целом посвящены генотипическому и генетическому составу ротавирусной популяции, циркулирующей в рассматриваемый период и взаимоотношениям диких и вакцинных штаммов.

Обзор литературы посвящен описанию современных данных о ротавирусах с основным акцентом на их молекулярно-генетические характеристики, формирование иммунного ответа, состояние вакцинопрофилактики в мире и в России, и современные биоинформационные методы (филодинамика) изучения вирусных популяций. В соответствующих главах приведены данные об общей характеристике и таксономии объекта исследования. В обзоре литературы использован значительный, даже избыточный, объем источников.

В разделе Материалы и методы подробно представлено описание используемого клинического материала (более 6000 образцов фекалий от детей, поступивших в стационар с ОКИ). Методы выявления ротавирусов в образцах включали два подхода: классический вирусологический метод выявления двуцепочечных РНК в ПААГ и ПЦР с использованием зарегистрированной тест-системы. Генетический анализ был основан на секвенировании или отдельных генов выявленных ротавирусов (стандартное секвенирование по Сэнгеру) или полногеномное секвенирование выборочных штаммов (NGS).

Результаты собственных исследований представлены в трех главах, из которых первая посвящена подробному описанию генотипической структуры ротавирусной популяции, циркулирующей в рассматриваемый период, а две другие главы посвящены сравнительному анализу взаимоотношений выявленных диких штаммов с вакцинными штаммами. Авторами показано, что структура популяции ротавирусов динамична и имеет потенциал к формированию большого числа ко-циркулирующих вариантов. В Нижегородской области в изучаемый период циркулировали четырнадцать G[P]-типов ротавирусов. Автор предсказывает, что один из генотипов G12 вскоре будет доминировать на глобальном уровне несмотря на то, что в нашей стране он пока относится к редким вариантам. Автор указывает, что антигены 3-х G-типов (9, 12, 8) и 3-х [P]-типов (4, 6, 9) не представлены в существующих вакцинах RV1 и RV5. Филогенетический анализ штаммов на основе нуклеотидных последовательностей генов VP7, VP4, VP6 и NSP4 российских ротавирусов и штаммов в составе вакцин Rotarix® и RotaTeq®

показал, что штаммы дикого типа кластеризуются отдельно от вакцинных. Кроме этого, наблюдается расхождение аллельных вариантов по гену VP7 диких и вакцинных штаммов. Авторами указывается, что это может быть объяснено тем фактом, что штаммы в составе вакцин Rotarix® и RotaTeq® были изолированы более 30 лет назад. В структуре антигенных эпитопов у российских штаммов встречаются множественные замены по сравнению с вакцинными штаммами. Влияние этих замен на эффективность существующих вакцин остается не изученным.

В разделе Заключение автор проводит обобщение полученных результатов в контексте известных литературных данных и обосновывает сделанные выводы и положения, выносимые на защиту. Автореферат содержит основные результаты исследований, представленные в диссертации, и полностью отражает ее содержание. Тема работы, выводы и основные положения диссертации полностью соответствуют специальности 03.02.02 – «Вирусология».

Личный вклад автора в науку

Практически вся экспериментальная часть работы, результаты которой отражены в диссертации: получение и обработка клинического материала (фекальные образцы из стационара), изоляция нуклеиновых кислот, выявление ротавирусов двумя разными методами, проведены автором самостоятельно. Проведение биоинформационного анализа, основанного на секвенировании или отдельных генов или полного генома ротавирусов, выполнены лично автором. Самостоятельно проведен филогенетический анализ и обработка полученных данных.

Результаты исследования отражены в 7 печатных работах, опубликованных в высокорейтинговых журналах соответствующего профиля, включая четыре статьи на английском языке. Во всех опубликованных статьях О.В. Морозова является первым автором, что отражает основной вклад автора в данную работу. Материалы диссертации лично представлены автором на семи научно-практических конференциях. Личный научный вклад автора в представленную диссертационную работу не вызывает сомнений.

Замечания по диссертации.

В связи с тем, что экспериментальная часть работы выполнена на самом высоком методическом уровне, полученные результаты обработаны и представлены в диссертации в полном виде, я, как оппонент, не имею существенных замечаний по существу работы. Однако хотелось бы отметить не очень удачную формулировку цели исследования. У читателя

складывается впечатление, что в работе проводится сравнительный филодинамический анализ популяции циркулирующих (клинических) штаммов с вакцинными штаммами, т.е. для вакцинных штаммов отдельно проведен филодинамический анализ. При дальнейшем ознакомлении с задачами исследования этот вопрос полностью проясняется. Это замечание носит редакционный характер и никак не влияет на качество проведенных научных исследований и представленных на защиту положений и выводов.

В качестве продолжения научной дискуссии хотелось бы задать автору два вопроса, которые были недостаточно, на мой взгляд, освещены в работе:

1. Какое все-таки значение на практике имеет тот факт, что циркулирующие штаммы принадлежат к отличным от вакцинных штаммов филогенетическим линиям и несут замены в антиген-связывающих эпитопах? Имеет ли значение отсутствие в вакцинных препаратах актуальных генотипов вируса, которые циркулируют в настоящее время? Прогнозирует ли автор снижение эффективности зарегистрированных вакцин в данном случае?

2. Может ли массовое применение вакцин оказать влияние на генотипическую структуру ротавирусной популяции? Или полученные данные являются отражением природных процессов, и вакцинация не оказывает заметного влияния на генотипическую структуру и генетические характеристики циркулирующих штаммов?

Заключение

Представленная работа является законченным научным исследованием, выполненным на современном методическом уровне, на значительном и во многом уникальном материале. Поставленные в работе цели и задачи выполнены в полном объеме. Представленные результаты существенно расширяют наши представления о вариантах ротавирусов, циркулирующих на территории нашей страны. Данные, полученные при сравнительном анализе диких и вакцинных штаммов, являются фундаментом для дальнейшего мониторинга влияния ротавирусных вакцин на генотипическую структуру популяции ротавирусов и их генетические характеристики, что имеет большое значение для практического здравоохранения.

По своей актуальности, решению поставленных задач, теоретической и практической значимости полученных результатов работа О.В. Морозовой полностью отвечает требованиям п.9. "Положения о порядке присуждения

ученых степеней”, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор в полной мере достоин присуждения искомой степени по специальности 03.02.02 – «Вирусология».

Официальный оппонент:

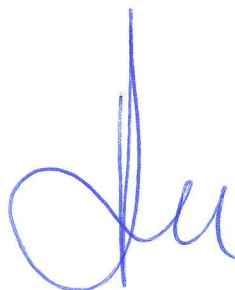
Заведующий лабораторией биотехнологии

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

доктор биологических наук,

Альховский Сергей Владимирович

07 июня 2021 г.



Место работы: ФГБУ «НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России,
123098, г. Москва, ул.Гамалеи, д.18
тел. 8(499)190-30-43
Эл.почта: s_alkhovsky@gamaleya.org; salkh@yandex.ru

ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России

