ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Мансур Улы «Генетическое разнообразие и молекулярный анализ вирусов парагриппа человека, циркулировавших в Санкт-Петербурге в период с 2017 по 2025 год», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – Вирусология

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) сохраняют лидирующие позиции в структуре инфекционной заболеваемости населения как в Российской Федерации, так и во всем мире. При этом степень изученности целого ряда возбудителей ОРВИ не всегда соответствует их реальному эпидемиологическому и клиническому значению. Это в полной мере относится к вирусам парагриппа человека.

К настоящему времени описано четыре типа вирусов парагриппа человека, которые относятся к двум родам семейства Paramyxoviridae: вирусы hPIV1 и hPIV3 относятся к роду Respirovirus, а hPIV2 и hPIV4 – к роду Orthorubulavirus, и эти типы существенно различаются по эпидемиологии и клиническим проявлениям вызываемых заболеваний. Вирус парагриппа 1 типа – основная причина крупа у детей раннего возраста; hPIV3 по значимости среди возбудителей бронхиолита и пневмонии у детей первого года жизни уступает только респираторно-синцитиальному вирусу; роль hPIV2 и hPIV4, особенно у иммунокомпрометированных пациентов, в последние годы пересматривается в сторону увеличения. У реципиентов трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток и солидных органов парагриппозная инфекция может принимать тяжелое, жизнеугрожающее течение, а средств специфической профилактики и этиотропной терапии до настоящего времени нет.

При этом молекулярно-генетическая изученность этой группы вирусов заметно отстает от современного методического уровня. Подавляющее большинство депонированных в международных базах данных последовательностей представляет собой фрагменты отдельных генов, преимущественно гена гемагглютинин-нейраминидазы (HN). Такой подход не позволяет оценить эволюцию генома в целом, выявить рекомбинацию и надежно распознать новые генетические варианты. Для России ситуация до последнего

времени была еще менее благополучной: полногеномных данных по отечественным штаммам практически не было, и их положение в глобальной филогенетической структуре оставалось неизвестным.

Все вышеизложенное определяет актуальность диссертационного исследования Мансур Улы, посвященного комплексной молекулярно-генетической характеристике вирусов парагриппа человека 1-4 типов, циркулировавших в Санкт-Петербурге на протяжении восьми эпидемиологических сезонов (с 2017/18 по 2024/25 гг.).

ОБОСНОВАННОСТЬ НАУЧНЫХ ПОЛОЖЕНИЙ, ВЫВОДОВ И РЕКОМЕНДАЦИЙ

Цель работы сформулирована четко – комплексный полногеномный молекулярно-генетический анализ hPIV1-4, циркулировавших в Санкт-Петербурге в течение восьми сезонов. Четыре задачи выстроены логично и закрывают весь путь от выделения вирусов и характеристики их биологических свойств до разработки панелей праймеров для полногеномного секвенирования, филогенетического анализа и поиска молекулярных маркеров филогенетических групп; в совокупности они полностью обеспечивают достижение цели.

Обоснованность научных положений определяется прежде всего объемом и репрезентативностью исследованного материала. В основу работы положены результаты госпитального надзора за гриппом и ОРВИ, проводившегося на базе трех стационаров Санкт-Петербурга в рамках международной программы Global Influenza Hospital Surveillance Network. За восемь эпидемических сезонов проанализировано 24824 респираторных образца; вирусы парагриппа выявлены в 1645 из них, что составило 11,5% положительных проб. Выборка охватывает и период пандемии COVID-19, нарушившей привычную циркуляцию респираторных вирусов, – это придает выявленным закономерностям дополнительную ценность.

Три положения, выносимые на защиту, сформулированы конкретно и полностью подкреплены фактическим материалом: первое – характеристикой 56 изолятов и сопоставлением 36 пар «клинический образец – изолят», показавшим генетическую стабильность вирусов при краткосрочном культивировании; второе – валидацией праймерных панелей по специфичности, чувствительности и робастности и получением с их помощью 445 полных геномов hPIV1-3

непосредственно из клинического материала; третье – полногеномным филогенетическим анализом 453 последовательностей на фоне представительной мировой выборки. Выводы логично следуют из полученных данных и не выходят за их рамки. Приятно отметить, что соискатель последовательно разграничивает установленные факты и их возможную интерпретацию – качество, особенно важное при работе с предсказательными алгоритмами и филогенетическими реконструкциями.

ДОСТОВЕРНОСТЬ И НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Набор вирусологических, серологических, молекулярно-биологических, биоинформатических и статистических методов адекватен поставленным задачам. Вирусы выделяли на двух клеточных линиях (LLC-MK2 и MA-104), что повышало выход изолятов. Биологические свойства изолятов охарактеризованы с разных сторон: инфекционный титр по $TCID_{50}$, гемагглютинирующая активность с эритроцитами морской свинки, курицы и человека, РТГА с гомологичными и гетерологичными изолятами, реакция нейтрализации с крысиными поликлональными антисыворотками.

Секвенирование выполнено на платформах MGI DNBSEQ-G400 и Illumina NextSeq 2000 со строгими критериями качества: в анализ включались только консенсусные последовательности с покрытием не менее 95% длины генома при медианной глубине не менее 10×. Филогенетические деревья строили методом максимального правдоподобия в IQ-TREE и RAxML с оценкой поддержки ветвей по 1000 бутстреп-репликатам, причем для выделения филогенетических групп использовалась не только топология дерева, но и комбинация бутстреп-поддержки с пороговыми значениями средних попарных расстояний. События рекомбинации засчитывались только при подтверждении минимум тремя алгоритмами пакета RDP5 – это практически исключает ложноположительные результаты.

Хорошо продуман внутренний методический контроль: специфичность панелей подтверждена и на гетерологичных типах hPIV, и на широком спектре других респираторных вирусов; аналитическая чувствительность определена количественно, по пороговым значениям Ct; робастность проверена на филогенетически удаленных референсных штаммах. Сопоставление геномов

исходных клинических образцов и полученных из них изолятов прямо показывает, что направленной адаптации вирусов к условиям культивирования не происходит.

Научная новизна работы значительна и имеет несколько самостоятельных составляющих. Впервые в Российской Федерации выполнено полногеномное исследование hPIV всех четырех типов; массив из 453 депонированных в GenBank последовательностей (105 hPIV1, 37 hPIV2, 303 hPIV3 и 8 hPIV4) – первый представительный российский набор полных геномов hPIV, заметный даже на фоне мировой выборки, особенно по hPIV3. Разработаны и валидированы оригинальные панели перекрывающихся праймеров для hPIV1-3, защищенные двумя патентами РФ (№ 2833687 и № 2859039). Для hPIV4 впервые в отечественной практике использован метагеномный подход SMART-9N; решение не создавать отдельную ампликонную панель для этого типа из-за его выраженной гетерогенности (два генетически различных подтипа, hPIV4a и hPIV4b) выглядит методически зрелым и хорошо аргументированным.

Главный результат работы с фундаментальной точки зрения – выявление и обоснование новой филогенетической группы hPIV3, обозначенной как кластер D. Ее обособленность подтверждена несколькими независимыми линиями доказательств: монофилетичностью на полногеномном дереве при высокой бутстреп-поддержке, средними попарными расстояниями выше порога, принятого для кластеров, воспроизводимостью группы на дереве по гену HN, набором групп-специфичных аминокислотных замен в белках P, HN, F и L и особым профилем сайтов N-гликозилирования. В кластер вошли не только российские штаммы, но и вирусы, выявленные в последние годы во Франции, Германии, Пакистане, Сингапуре, Малайзии и США, – группа явно циркулирует глобально, и объяснить результат локальным артефактом невозможно.

ЗНАЧИМОСТЬ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ НАУКИ И ПРАКТИКИ

Теоретическая значимость работы – вклад в понимание эволюции и популяционной структуры hPIV. Показано, что чем выше уровень филогенетической иерархии, тем больше накапливается групп-специфичных аминокислотных маркеров, что отражает длительность независимой эволюции соответствующих групп. Продемонстрирована высокая консервативность

функционально значимых участков гликопротеина HN, включая каталитические остатки активного центра, – на эволюцию этого белка явно действуют жесткие структурно-функциональные ограничения. Важен и вывод о согласованности филогении по гену HN с полногеномным анализом: он делает результаты работы сопоставимыми с многолетним массивом ранее опубликованных данных.

Практическая значимость работы многопланова. Разработанные праймерные панели представляют собой готовый к внедрению методический инструмент для программ геномного мониторинга возбудителей ОРВИ. Сформированная коллекция современных изолятов всех четырех типов, включая впервые выделенный в России современный изолят hPIV4, а также полученные поликлональные антисыворотки, депонированные в Государственную коллекцию вирусов, представляют собой самостоятельный научный ресурс, значение которого будет возрастать по мере развития исследований в области специфической профилактики и терапии парагриппозной инфекции. Депонированные в GenBank последовательности доступны международному научному сообществу и могут использоваться при проектировании диагностических систем.

СООТВЕТСТВИЕ ДИССЕРТАЦИИ ПАСПОРТУ НАУЧНОЙ СПЕЦИАЛЬНОСТИ

Содержание диссертационной работы, использованные методы, полученные результаты, положения, выносимые на защиту, и сформулированные выводы полностью соответствуют пунктам 4 (Молекулярная биология вирусов, структурно-функциональная биология вирусных белков. Структура и экспрессия вирусных геномов. Эволюция вирусов и их разнообразие. Генетика и геномика вирусов. Популяционная генетика), 8 (Проблемы экологии вирусов, их географического распространения, эпидемиологии и путей распространения вирусных инфекций, изучение путей передачи вирусов, их носительства, выявление естественных хозяев) и 9 (Проблемы классификации вирусов и их номенклатуры, классификации вирусных инфекций на клеточном уровне и на уровне организма, проблемы частной вирусологии. Возбудители вирусных инфекций человека, животных и растений) паспорта научной специальности 1.5.10 – Вирусология (отрасль науки – биологические), поскольку в работе изучается генетическое разнообразие

вирусов парагриппа человека и их эволюционная изменчивость, разрабатываются методы их выявления и характеристики, а также изучаются закономерности их циркуляции в популяции человека.

ПОЛНОТА ОСВЕЩЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ В ПЕЧАТИ

Основные результаты диссертационного исследования в полном объеме отражены в научной печати. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 4 статьи в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, и 2 патента Российской Федерации на изобретение, защищающие разработанные панели праймеров. Результаты доложены на ряде российских и международных форумов, в том числе на конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского (Москва, 2024), конгрессе «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2024», XI и XII Международных конференциях молодых ученых (Новосибирск, 2024, 2025) и VIII Российско-Китайском форуме по инфекционным заболеваниям (Санкт-Петербург, 2025).

Публикационная активность соискателя, включая участие в исследовании, опубликованном в журнале The Lancet Global Health, а также наличие двух патентов на изобретение, полностью удовлетворяет требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и адекватно отражает ее основные положения и выводы.

СОДЕРЖАНИЕ И ОФОРМЛЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Диссертация изложена на 193 страницах и построена по традиционному плану: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список литературы и приложение с дополнительными материалами. Работа иллюстрирована 25 таблицами и 30 рисунками; список литературы включает 247 источников, из которых 11 отечественных.

Обзор литературы – систематизированное изложение современного состояния вопроса, от таксономии и организации генома до эпидемиологии и клинических проявлений. Два раздела заслуживают отдельного упоминания. Первый посвящен эволюции методов секвенирования hPIV – от отдельных

фрагментов по Сэнгеру до современных ампликонных и метагеномных подходов – и написан критически, с разбором достоинств и ограничений каждого варианта. Второй содержит систематизацию схем филогенетической классификации hPIV1-4 с оригинальными обобщающими схемами самого соискателя; этот раздел сам по себе упорядочивает весьма разрозненную и терминологически пеструю область.

Глава «Материалы и методы» описана исчерпывающе: принципы дизайна и полный состав праймерных панелей, условия амплификации и секвенирования, биоинформатический анализ с указанием программ, их версий и параметров запуска. Уровень детализации полностью обеспечивает воспроизводимость исследования.

Результаты изложены в двенадцати разделах, соответствующих логике задач: от выявляемости и типовой структуры вирусов, выделения их в культуре и характеристик изолятов – через разработку и валидацию праймерных панелей, применение SMART-9N для hPIV4 и сопоставление геномов образцов и изолятов – к полногеномной филогении каждого из четырех типов, анализу гена HN с картированием аминокислотных замен, гликозилированию и рекомбинации. Иллюстрации – таблицы, графики покрытия генома, филогенетические деревья – информативны и выполнены качественно.

Обсуждение свидетельствует о зрелости соискателя как исследователя. Собственные данные систематически сопоставляются с зарубежными, совпадения и расхождения обсуждаются корректно, для расхождений предлагаются обоснованные объяснения. Особенно хорош раздел о таксономическом ранге кластера D hPIV3: автор не просто констатирует обособленность группы, а разбирает альтернативную точку зрения (отнесение сходной группы к подкластеру C6 внутри кластера C у Zhu и соавт.) и аргументированно отстаивает свою. Заключение обобщает результаты и намечает перспективы; выводы конкретны и в полной мере обоснованы фактическим материалом.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ОФОРМЛЕНИЮ

Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы не имеется. Имеются отдельные замечания редакционного характера:

1. В тексте диссертации и автореферата встречаются единичные опечатки и стилистические погрешности, обусловленные, по-видимому, тем, что русский язык не является для соискателя родным. В частности, в разделе «Научная новизна» использовано слово «проверено» вместо «проведено»; на с. 10 диссертации – «подходы к изчение» вместо «подходы к изучению».

2. В ряде разделов главы «Материалы и методы» изложение построено с использованием громоздких пассивных конструкций, что несколько затрудняет восприятие текста.

3. При представлении данных о временном распределении штаммов в таблицах, построенных по результатам филогенетического анализа с предварительным прореживанием выборки, целесообразно было бы дополнительно указывать, что приведенные числа относятся к репрезентативной подвыборке, а не к полному набору полученных последовательностей.

Указанные замечания носят исключительно редакционный характер, не затрагивают существа полученных результатов и не снижают высокой научной и практической ценности выполненного исследования.

ВОПРОСЫ ДИСКУССИОННОГО ХАРАКТЕРА

1. Обособленность кластера D hPIV3 обоснована в работе сразу несколькими критериями: монофилетичностью, средними попарными расстояниями выше пороговых для кластеров, групп-специфичными заменами и профилем гликозилирования HN. При этом пороговые значения, на которые опирается классификация hPIV3, изначально рассчитывались для отдельного гена HN, а в недавнем полногеномном исследовании Zhu и соавт. сходная группа трактуется как подкластер C6 внутри кластера C. Как автор соотносит пороги, рассчитанные для гена и для полного генома, какие данные – антигенные, фенотипические или эпидемиологические – были бы решающими для признания кластера D самостоятельной группой, и нужна ли, на его взгляд, единая полногеномная классификация hPIV?
2. У штаммов кластера D hPIV3 изменен профиль потенциальных сайтов N-гликозилирования HN: один сайт утрачен, другой приобретен. Каким образом это может отражаться на антигенных свойствах вируса, и какими

экспериментальными подходами такое предположение было бы разумно проверять?

3. Геномы hPIV4 получены только из культивированных изолятов, тогда как для hPIV1-3 проводилось сопоставление клинических образцов и изолятов. Планирует ли автор применять SMART-9N непосредственно к клиническим образцам hPIV4, и позволит ли коллекция изолятов и антисывороток оценить возможную адаптацию этого типа к условиям культивирования и антигенные взаимоотношения между филогенетическими группами?
4. Материал исследования собран исключительно в Санкт-Петербурге, однако в третьем положении, выносимом на защиту, и в заключении популяционная структура hPIV охарактеризована уже для «территории России» в целом. Насколько обоснован, по мнению автора, перенос выводов с одного региона на всю страну, располагает ли он данными по другим регионам России и планируются ли аналогичные исследования, например, в рамках программ геномного мониторинга респираторных вирусов?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Мансур Улы «Генетическое разнообразие и молекулярный анализ вирусов парагриппа человека, циркулировавших в Санкт-Петербурге в период с 2017 по 2025 год» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной самостоятельно на высоком методическом уровне, в которой содержится решение актуальной научной задачи – комплексной молекулярно-генетической характеристики вирусов парагриппа человека, циркулирующих на территории Российской Федерации, и разработки методических подходов к их полногеномному секвенированию, имеющей существенное значение для вирусологии и системы эпидемиологического надзора за острыми респираторными вирусными инфекциями.

По актуальности, научной новизне, методическому уровню, объему выполненных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертация полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного

Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями и дополнениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Мансур Ула, безусловно заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – Вирусология.

Официальный оппонент:

Исакова-Сивак Ирина Николаевна,
член-корреспондент РАН, доктор биологических наук,
заместитель директора по научной работе
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
(специальность 1.5.10 – Вирусология)

_____ И.Н. Исакова-Сивак

Подпись члена-корреспондента РАН, доктора биологических наук Исаковой-Сивак Ирины Николаевны заверяю.

Ученый секретарь ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
Кандидат медицинских наук

_____ Углева Е.М.

197022, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12
Тел.: +7 (812) 234-68-68
E-mail: iem@iemspb.ru
«13» ноября 2026 г.