

**Отзыв официального оппонента В.В. Зверева
на диссертационную работу Ларионовой Натальи Валентиновны
«Возбудитель гриппа: изменчивость в
природе и эксперименте», представленной на
соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.02.02 - вирусология**

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.

Грипп, как одна из самых массовых вирусных инфекций, справедливо считается важным фактором, губительно влияющим на здоровье человека. Заболеваемость, вызванная регулярно обновляющимися сезонными вирусами гриппа, периодически возникающими пандемическими и спорадически передающимися людям зоонозными вирусами сопровождается общей интоксикацией организма, бактериальными осложнениями, высокой избыточной заболеваемостью и смертностью от вирусных пневмоний и сопутствующих соматических заболеваний.

Профилактика с помощью живых вакцин рассматривается как наиболее перспективная мера борьбы с гриппом. Живая гриппозная вакцина (ЖГВ) имеет существенное преимущество перед инактивированным вакцинным препаратом, поскольку ее действующим началом является аттенуированный вирус, интенсивность репродукции которого в дыхательных путях определяется уровнем иммунитета. В этом проявляется избирательность действия ЖГВ, которая не размножается у человека с высоким уровнем иммунитета, но активирует те же звенья иммунитета, что и патогенный вирус, у неиммунных восприимчивых лиц.

Непрерывная изменчивость антигенных свойств вирусов гриппа приводит к проявлению несоответствия вакцинного и эпидемического вирусов гриппа и необходимости регулярного обновления вакцинных препаратов.

Диссертационное исследование Н.В. Ларионовой выполнено в отделе вирусологии им. А.А. Смородинцева ФБГНУ «Института экспериментальной медицины», коллективу которого принадлежит мировой приоритет в разработке аттенуированных реассортантных штаммов ЖГВ. Антигенная актуальность вакцинного реассортанта обеспечивается

наследованием генов NA и NA от эпидемического вируса, а безвредность гарантируется наследованием генов от лабораторных холодоадаптированных генетически стабильных доноров аттенуации (формула генома 6:2). Вместе с 6 генами, кодирующими внутренние белки вириона, они передают вакцинным штаммам холодоадаптированный, температурочувствительный и связанный с температурочувствительностью аттенуированный фенотип (*ca/ts/att*). Метод получения вакцинных реассортантов, основан на различиях биологических свойств созданных в лаборатории *ts/ca/att* доноров аттенуации и естественно циркулирующих вирулентных вирусов гриппа.

Для контроля стабильности свойств вакцинных препаратов доноры аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69, применяемые для отечественных ЖГВ, должны иметь четкий фенотипический и молекулярно-генетический паспорт.

Для разработки рациональной стратегии получения штаммов необходимо понимание направлений и закономерностей эволюции эпидемических вирусов. Высокая изменчивость современных вирусов гриппа по таким биологическим свойствам, как чувствительность в температуре репродукции (*ts/ca*), чувствительность к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови влияют на эффективность подготовки ЖГВ, поскольку делают неэффективными используемые для получения вакцинных реассортантов селективные факторы. Серьезным вызовом является необходимость разработки реассортантных штаммов ЖГВ к вирусам гриппа с пандемическим потенциалом, поскольку между далеко отстоящими в эволюционном ряду вирусами может отсутствовать констелляция генов.

В связи с вышеизложенным, актуальность диссертационной работы Н.В. Ларионовой, посвященной изучению закономерностей изменчивости биологических свойств вирусов гриппа А и В в природе и определению молекулярно-генетических механизмов индуцированной изменчивости фенотипических признаков вируса гриппа в эксперименте не вызывает сомнений.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ обусловлена с решением поставленных автором задач по определению молекулярно-генетических механизмов индуцированной изменчивости фенотипических признаков вируса гриппа в эксперименте; характеристике закономерностей эволюционной изменчивости биологических признаков вирусов гриппа; разработке новых принципов подготовки реассортантных штаммов ЖГВ для сезонных и обладающих пандемическим потенциалом вирусов гриппа.

Заключается научная новизна в выявлении мутантных генов холодоадаптированных доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69, ответственных за наследование реассортантными штаммами *ca/att* фенотипа; в молекулярно-генетической характеристике донора В/СССР/60/69; в установлении единства механизма аттенуации вирусов гриппа А и В, связанного с изменением температурного диапазона функционирования белков полимеразного комплекса; в выявлении существования закономерности циклической эволюции вирусов гриппа А и В по признаку температурочувствительности репродукции и связи этого признака с изменением эпидемических потенциалов вирусов; в обнаружении различий между В/Виктория- и В/Ямагата-подобными вирусами гриппа по признаку устойчивости к неспецифическим термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади, указывающим на различия в их рецепторной специфичности. Решение конкретной практической задачи, связанной с преодолением влияния неспецифических ингибиторов сыворотки крови на успех получения вакцинных реассортантов, привело к теоретическим выводам о существовании взаимодействия гемагглютинина и нейраминидазы вирусов гриппа в проявлении свойства чувствительности/устойчивости к ингибиторам сыворотки крови и прийти к заключению о взаимном участии белков НА и NA в рецепторном взаимодействии с чувствительной клеткой.

В рамках решения практических задач установлены ограничения в способности к реассортации между донором аттенуации на основе вируса гриппа человека А(H2N2) и штаммами А/H5N1/PR8-RG для инактивированной ЖГВ. Подобное скрещивание дает возможность получать температурочувствительные, холодоустойчивые вакцинные реассортанты на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) с наследованием от высокопатогенных вирусов гриппа птиц единственного гена НА (H5) (формула генома 7:1); разработан новый методический подход к получению штаммов аттенуированной ЖГВ на основе высокопатогенных вирусов гриппа птиц А(H5N1) с использованием модифицированных, сконструированных методами обратной генетики штаммов для инактивированной вакцины А/H5N1/PR8-RG, позволяющий проводить реассортацию в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) и безопасный для персонала.

ЗНАЧЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ НАУКИ И ПРАКТИКИ.

Установление существования эволюционных закономерностей в вариабельности биологических характеристик у циркулирующих вирусов гриппа А и В, наряду с молекулярно-генетической характеристикой донора аттенуации В/СССР/60/69, и формулировкой представления о единстве молекулярных основ проявления *ts/ca/att*

фенотипа доноров аттенуации А и В для ЖГВ являются фундаментальным вкладом представленной работы в вирусологию гриппа.

Автором подготовлены 20 реассортантных штаммов ЖГВ на основе сезонных возбудителей гриппа А(Н1N1, Н3N2) и В и пандемического вируса гриппа А(Н1N1)09pdm. На эти штаммы ЖГВ получены к настоящему времени 19 патентов на изобретение РФ.

Впервые ЖГВ на основе пандемического вируса (Н1N1)pdm09 зарегистрирована в России. За разработку вакцинного штамма вируса гриппа А/17/Калифорния/2009/38 (Н1N1)pdm для производства ЖГВ для взрослых и детей авторы удостоены диплома Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам в номинации «100 лучших изобретений России».

Штаммы ЖГВ к высоковирулентным вирусам гриппа птиц А/Н5N1, подготовленные автором по разработанной оригинальной методике, составляют отечественный резерв вакцин к потенциально пандемическим вирусам гриппа.

Холодоадаптированные реассортантные штаммы ЖГВ к сезонным вирусам гриппа А и В депонированы в Государственных коллекциях вакцин на базе ФГБУ «ГИСК им. Л.А.Тарасевича» МЗ России и Института вирусологии им.Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ России.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ. Работа оформлена в соответствии с требованиями ГОСТ Р 7.0.11—2011 к структуре и оформлению диссертаций и содержит введение, основную часть, заключение, выводы и приложения. Основная часть включает обзор литературы, материалы и методы исследования, три главы собственных исследований и их обсуждение. Диссертация изложена на 336 страницах машинописного текста; иллюстрирована 89 таблицами, 23 рисунками, содержит 3 приложения. Список литературы включает 548 цитируемых отечественных и зарубежных источников и 68 публикаций автора. Ссылки публикации автора указаны в разделе заключение, под каждым его пунктом, что дает наглядное представление о полноте опубликованных материалов.

Во введении отмечена актуальность темы, поставлены цели и задачи исследования, отражены научная новизна, положения, выносимые на защиту, а также научно-практическая значимость работы.

Обзор литературы состоит из трех глав, изложен хорошим литературным языком, с интересом читается, полно освещает проблемы, затронутые в диссертации. Представленные в обзоре материалы глубоко проанализированы автором,

подтверждением чему служат обобщающие литературные документы таблицы (табл. 1.1, 1.2, 2.1, 3.2). Заканчивается обзор литературы кратким заключением, подводящим к изложению собственных результатов.

В главе Материалы и методы подробно излагаются вирусологические, серологические, иммунологические и молекулярно-генетические методы, примененные в работе, исследования на лабораторных животных, методы изоляции вакцинных вирусов от привитых добровольцев, методы статистической обработки данных.

Результаты исследований включают три главы.

Первая глава собственных исследований посвящена анализу роли генов в аттенуации вирусов гриппа. В ней на основе коллекции из 225 (38+187) реассортантов с различным набором генов от скрещивания донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 с эталонными вирусами гриппа А (Н1N1) и А (Н3N2) демонстрируется что температурочувствительный фенотип реассортантов вируса гриппа А обусловлен конstellляцией мутантных белков полимеразного комплекса донора при обязательном участии мутантного белка PB2. Приводятся результаты получения и характеристики чистой линии донора аттенуации В/СССР/60/69, его молекулярно-генетического анализа, на основе коллекции из 36 одногенных и полигенных реассортантов устанавливается независимая роль мутантных генов полимеразного комплекса PB2 и PA донора в формировании *ts* фенотипа реассортантов. С помощью другой коллекции из 35 реассортантов демонстрируется роль мутантного гена PA в формировании *sa* фенотипа реассортантов. Интересны результаты по идентификации уникальных мутаций в геноме чистой линии донора аттенуации В/СССР/60/69. Поскольку дикий предшественник донора не сохранился, для идентификации специфичных мутаций прибегли к использованию промежуточного пассажного *ts/non-sa* вариант и сравнению нуклеотидных и аминокислотных последовательностей донора аттенуации с последовательностями из баз данных эпидемических вирусов гриппа В, выделенных в период с 1940 до 2006 года. Автором показано, что клонированный донор аттенуации В/СССР/60/69 имеет восемь специфичных мутаций, в том числе четыре уникальные мутации в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса PB2 и PA.

Вторая глава собственных исследований посвящена эволюционной изменчивости биологических свойств эпидемических штаммов вирусов гриппа. В ней приведены результаты ретроспективного анализа эпидемических вирусов гриппа А и В человека, выделенных разных регионах, в различные эпидемические и пандемические циклы и в рамках единичных локальных эпидемий, по способности к репродукции в РКЭ при

температурах за пределами оптимальных. Автором продемонстрировано, что температурный диапазон репродукции подвержен значительной изменчивости в ходе естественного дрейфа возбудителей гриппа А (H1N1, H2N2 и H3N2) и В линий «Виктория» и «Ямагата». Начало пандемического цикла у вирусов гриппа А(H3N2) и А(H2N2), а также у ранних представителей вирусов гриппа А(H1N1) и В, неизменно характеризовалось циркуляцией температуроустойчивых возбудителей. Дальнейшая эволюция приводила к попеременной циркуляции *non-ts* и *ts* вирусов, которые со временем окончательно вытеснялись температурочувствительными. Каждый серотип вируса гриппа А(H1N1 и H3N2) и обе линии вируса гриппа В прошли несколько циклов волнообразного изменения признака температурочувствительности. Автор рассматривает оригинальную гипотезу, приводящую к заключению, что факт стабильной циркуляции температурочувствительных вирусов можно рассматривать как снижение эпидемических потенциалов вируса и предпосылку появления нового дрейфового или шифтового антигенного варианта. Циркуляция эпидемических вирусов А и В, обладающих устойчивостью к пониженной до 25°C температуре инкубации, не подвержена эволюционной изменчивости и носит спорадический характер.

В этой же главе приводятся результаты изучения изменения признака чувствительности к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови у вирусов гриппа в природе и эксперименте.

Проведенный анализ чувствительности к термостабильным ингибиторам сыворотки крови эпидемических вирусов гриппа А и В, выделенных с 1934 по 2012 гг., позволил сделать некоторые обобщения о циркуляции чувствительных и устойчивых штаммов вируса гриппа. Вирусы гриппа А(H1N1) устойчивы к термостабильным ингибиторам сыворотки крови лошади и морской свинки. Вирусы гриппа А(H2N2) и (H3N2) вариабельны по ингибиторочувствительности. Эволюция вирусов гриппа В, результатом которой стало появление двух ветвей «Ямагата»- и «Виктория»-подобных вирусов привела к их разделению по признаку чувствительности к термостабильным сывороточным ингибиторам.

Реассортация ингибиторочувствительных и устойчивых вирусов с ингибитороустойчивыми донорами аттенуации позволила продемонстрировать комплексное участие белков HA и NA в проявлении вирусами гриппа ингибиторочувствительного фенотипа.

Третья глава собственных исследований посвящена подготовке и характеристике холодоадаптированных реассортантных штаммов для живой гриппозной вакцины на основе современных сезонных, пандемического А(H1N1)pdm09 и потенциально

пандемических вирусов гриппа А(Н5N1), А(Н3N2)v. Отмечается, что подготовка штамма ЖГВ на основе пандемического вируса и вируса гриппа свиней А(Н3N2)v не вызвала затруднений. Донор аттенуации сероподтипа Н2N2 успешно вступал в реассортацию с вирусами сероподтипов Н1N1 и Н3N2, независимо от их антигенной новизны.

Задача подготовки вакцинных штаммов на основе высокопатогенных вирусов гриппа птиц Н5N1 потребовала разработки метода, позволяющего преодолеть патогенность вирусов для куриных эмбрионов. В качестве источника поверхностных антигенов вирусов гриппа птиц были использованы реассортантные штаммы для инактивированных вакцин, условно обозначенные как А/Н5N1/PR8-RG с генами НА и NA от вирусов Н5N1 и генами внутренних белков от вируса А/PR8/34, сконструированные генно-инженерными методами и аттенуированные за счет удаления полиосновного сайта рестрикции, что позволило приемами классической реассортации провести замену внутренних генов штаммов А/Н5N1/PR8-RG на гены донора аттенуации для ЖГВ. При этом были выявлены ограничения в конstellации генов вируса человека А(Н2N2) и вирусов птиц А(Н5N1), из-за которых NA N1 вирусов птиц переходила в состав реассортантов только с белком PB2/PR8, что не давало возможность получить вакцинные реассортанты для ЖГВ с формулой генома 6:2. Были получены реассортанты с геном НА Н5 вирусов птиц, а гены NA N2 и внутренних белков унаследовавшие от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57. По высокой иммуногенности и протективной активности для хорьков вирусы с единственным геном НА Н5, а остальными генами от донора аттенуации не отличались от вируса с формулой генома 6:2, полученного с помощью методов обратной генетики.

В этой же главе автор рассматривает комплекс мер для преодоления сложностей при создании реассортантов для ЖГВ на основе отличающихся по биологическим характеристикам эпидемических вирусов.

В разделе Обсуждение автор анализирует полученные в работе результаты и оценивает их с позиций мирового научного опыта. Обсуждение полностью отражает результаты исследования, обобщает проделанную работу, намечает пути дальнейшей разработки темы.

Выводы из выполненной работы соответствуют поставленным задачам, подводят итог проведенным исследованиям и достаточно полно отражают результаты, полученные автором.

Полученные результаты и сделанные на их основании выводы базируются на анализе статистически значимого количества материала. Достоверность результатов работы подтверждается как экспериментальными данными, так и использованием современных средств и методик проведения исследований.

Основные результаты и положения диссертации, выводы и заключение полностью отражены в 19 патентах на изобретения РФ, 49 печатных работах, 16 из которых опубликованы в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки РФ, и 14 – в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования. Научные достижения автора были представлены в 45 докладах на международных и российских научных конференциях.

Автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

ВОПРОСЫ И ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИИ

В анализируемой диссертации существенных недостатков не выявлено, замеченные единичные опечатки и неточности не умаляют общего благоприятного впечатления от проведенных исследований и в целом от работы.

В качестве вопроса дискуссионного вопроса автору хотелось бы задать следующий :

Вы отмечаете сложности получения реассортантов с формулой генома 6:2 на основе ингибиторочувствительных вирусов гриппа и преимущественное формирование реассортантов, наследующих единственный ген, кодирующий НА от эпидемического родителя. При этом вы продемонстрировали, что ЖГВ H5N2, на основе 7:1 реассортантов, в состав которых входит единственный ген НА от вирусов гриппа птиц, по протективным и иммуногенным характеристикам в испытаниях на хорьках не отличается от вакцинного штамма с формулой генома 6:2, полученного методами обратной генетики. Не рассматриваете ли Вы возможность применения реассортантов с формулой генома 7:1, с единственным геном НА от эпидемического вируса, в качестве вакцинных препаратов, когда получить 6:2 реассортанты затруднительно и это сказывается на скорости подготовки штамма ЖГВ?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом можно констатировать, что представленная Н.В. Ларионовой диссертация является законченной научно-исследовательской работой, содержащей решение актуальных научных задач. Диссертация полностью соответствует паспорту заявленной научной специальности «03.02.02 – вирусология».

Н.В. Ларионова выполнила большой объем экспериментальной работы с использованием современных вирусологических, иммунологических, молекулярно-биологических методов. В диссертации представлены обоснованные научные положения и выводы, вытекающие из результатов проведенных многосторонних исследований.

Диссертационная работа Ларионовой Натальи Валентиновны «Возбудитель гриппа: изменчивость в природе и эксперименте» по актуальности, новизне, научно-практической значимости полностью отвечает требованиям п. 9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук.

Н.В. Ларионова заслуживает присуждения ей искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 – «вирусология».

Официальный оппонент – директор института
доктор биологических наук, профессор, академик РАН

В.В. ЗВЕРЕВ

Подпись директора ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова
доктора биологических наук, профессора, академика РАН Виталия Васильевича Зверева
заверяю

Ученый секретарь

ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова
кандидат биологических наук



Андропова Н.И.

марта 2017 г.