

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ**  
**«НАУЧНО – ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ**  
**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»**  
**СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ**  
**НАУК**  
**(ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН)**

197376, Санкт-Петербург  
ул. Академика Павлова, 12

Телефон: (812) 234-6868, факс: (812) 234-9489  
E-mail: [em@iemrams.ru](mailto:em@iemrams.ru)

**ОТЗЫВ**

официального оппонента на диссертационную работу

Даниленко Дарьи Михайловны

«Анализ эволюционной изменчивости и биологических свойств вирусов пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09, циркулировавших в России в период с 2009 по 2013 гг.»,

представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

по специальности 03.02.02 – Вирусология

Актуальность темы. Диссертационная работа Дарьи Михайловны Даниленко посвящена актуальной проблеме - характеристике антигенных, биологических и молекулярно-биологических свойств вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных на территории Российской Федерации за период с 2009 по 2013 г. Вирусы А(Н1N1)pdm09 явились причиной первой в 21 веке пандемии гриппа, которая была зарегистрирована Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2009 г. Как указывается в документах ВОЗ, в постпандемическом периоде вирусы А(Н1N1)pdm09 приобрели свойства сезонных возбудителей гриппа и продолжают циркулировать. В связи с этим изучение антигенных и биологических свойств вирусов А(Н1N1)pdm09, циркулирующих в России, и их сравнение с другими изолятами, выделенными в мире, является весьма актуальным и имеет большое теоретическое и практическое значение.

В соответствии с целью работы автором были определены задачи исследования, включающие изучение особенностей выделения и репродукции исследуемых вирусов, характеристику антигенных и молекулярно-генетических свойств современных российских штаммов А(Н1N1)pdm09, исследование направлений эволюционной изменчивости.

Автором лично были выполнены выделение, типирование и антигенный анализ большинства исследованных изолятов, получение иммунных сывороток. Значительная часть исследований по изучению репродукции вирусов гриппа на клеточных линиях человека и животных, индукции апоптоза, молекулярно-генетическому и эволюционному

анализу гемагглютинина (НА) и нейраминидазы, оценки позитивной селекции также выполнена лично автором.

Диссертация изложена на 229 страницах машинописного текста, включая 29 таблиц и 30 рисунков; построена по традиционному плану; состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, главы собственных исследований, включающей 4 раздела, обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения.

При написании «Обзора литературы» автором использовано большое количество работ отечественных и зарубежных авторов (список литературы содержит 234 источников 20 на русском и 214 на английском языках). Хочется отметить прекрасный литературный язык, которым изложен обзор проанализированных источников, а также то обстоятельство, что большое внимание уделено работам именно отечественных авторов. В «Обзоре литературы» освещены современные научные данные о свойствах пандемических вирусов гриппа, выделенных в различных регионах мира, направлениях эволюции, приведены интересные гипотезы возникновения и «вымирания» пандемических штаммов.

Глава «Материалы и методы» включает подробное описание целого ряда вирусологических, молекулярно-биологических и биохимических методик. В целом указанная глава свидетельствует, что работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных биотехнологий и средств компьютерной обработки данных.

В первой подглаве раздела «Результаты собственных исследований» проанализированы особенности выделения и антигенная характеристика вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09. Показано преимущество куриных эмбрионов для выделения пандемических вирусов, особенно из секционного материала. При изучении репродукции на различных клеточных показано, что в отличие от вирусов А(Н5N1) и сезонных штаммов А(Н1N1)pdm09 репродуцировались на ограниченном спектре клеточных линий, и инфекционная активность почти во всех случаях была ниже таковой для других протестированных штаммов.

Следующая часть собственных исследований посвящена изучению отдельных биологических свойств вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в сравнении с эпидемическими вирусами гриппа человека, вирусами гриппа свиней и птиц. Показано, что вирусы пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09 обладают пониженной репродукцией в клеточных линиях человека и вызывают слабую индукцию апоптоза. Продемонстрирована низкая, но детектируемая нейраминидазная активность вирусов А(Н1N1)pdm09.



Третья часть собственных исследований посвящена антигенному анализу вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09. Антигенный анализ вирусов А(Н1N1)pdm09, выделенных за пятилетний период, показывает их антигенную однородность. Получены новые интересные данные об антигенном и генетическом родстве вирусов А(Н1N1)pdm09 с вирусами гриппа свиней А(Н1N1), выделенными более 70 лет назад, а также возбудителями вспышки «свиного гриппа» в США в Нью-Джерси в 1970-е годы XX века. Составлены антигенные карты на основании данных РТГА с 128 антигенами. Результаты работы убедительно демонстрирует преимущество антигенного картирования, когда есть возможность проанализировать большое количество антигенов, по сравнению с традиционным представлением данных РТГА в табличном виде.

В заключительной части собственных исследований анализируется молекулярно-генетическая структура поверхностных антигенов вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09. Изучена роль мутации D222G в НА вирусов А(Н1N1)pdm09. Показано, что среди аутопсийного материала вирусы, несущие мутации в 222 положении НА, встречаются в 51% случаев. Так, на примере российских штаммов подтверждена гипотеза о том, что указанная замена обеспечивает сродство к сиаловым рецепторам нижних отделов респираторного тракта человека, что приводит к тяжелому течению заболевания, и возможной последующей гибели больного. Показано, что генетическое разнообразие вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 возрастает, как для штаммов, циркулирующих в России, так и во всем мире.

Обсуждение полученных результатов написано в соответствии с логикой изложения диссертационных материалов. В данном разделе обобщаются полученные результаты, проводится сравнение с мировым уровнем исследований.

Выводы соответствуют основному содержанию работы.

Обобщая, хочу отметить следующее. Все выносимые на защиту положения и выводы достоверны и обоснованы экспериментальными исследованиями и анализом. Диссертационная работа Дарьи Михайловны Даниленко содержит ряд новых научных данных. Безусловной научной новизной проделанной работы является впервые проведенный анализ свыше 900 штаммов вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, изолированных на территории России в период с 2009 по 2013 гг.

Практическая значимость работы. На основании полученных автором данных была определена этиология эпидемий гриппа в России. Результаты работы использовались при проведении практических занятий по выделению и идентификации вирусов гриппа, ряд выделенных штаммов вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 были переданы в референс-лаборатории с целью международного мониторинга за гриппом. Достоверность

полученных автором экспериментальных данных обеспечивается большим объемом проведенных лабораторных исследований с применением современных методик и компьютерных программ. Выводы основаны на результатах проведенных исследований и вытекают из материалов диссертации.

Материалы диссертации отражены в 15 печатных работах, в том числе в 7 статьях в 3 реферируемых российских журналах из списка ВАК и в 2 международных журналах, неоднократно представлены на Российских и международных конференциях.

В качестве замечания к работе хочется отметить некоторую перегруженность работы иллюстративным материалом, включающим несколько общеизвестных и часто цитируемых диаграмм, в частности, разделе Обзора литературы, посвященном пандемиям гриппа. В то же время желательно было бы включить в раздел обзора литературы, касающийся биологических свойств вирусов A(H1N1)pdm09, данные о вирулентности этих вирусов для человека, учитывая, что в начальный период пандемии 2009 года у некоторой доли молодых и здоровых людей развилась тяжелая форма первичной вирусной пневмонии, не наблюдаемая во время сезонных эпидемий. Не совсем традиционным представляется размещение отдельных результатов собственных исследований в разделе «Обсуждение». Указанные замечания, разумеется, несколько не умаляют общей значимости полученных данных и не влияют на высокую оценку проделанной работы.

#### Вопросы.

1. Результаты Вашей работы свидетельствуют, что вирусы A(H1N1)pdm09, выделенные на территории Российской Федерации, не содержат молекулярно-генетических детерминант высокой патогенности, известных, например, для вирусов птичьего гриппа (полиосновный кливудж-сайт, делеции в генах нейраминидазы и NS1), плохо репродуцируются в клеточных культурах млекопитающих, вызывают слабую индукцию апоптоза и обладают низкой нейраминидазной активностью. Какими факторами, помимо мутации в 222 положении HA, может объясняться необычно высокая частота тяжелого течения и смертности среди молодых людей в самом начале развития пандемии?
2. Чем можно объяснить до сих пор сохраняющуюся антигенную однородность вирусов пандемического гриппа при прогрессирующем генетическом разнообразии?
3. В тесте изучения ферментативной активности нейраминидазы с MUNANA Вами были получены данные об отсутствии влияния разведения вируса на активность нейраминидазы. Чем можно объяснить такой эффект, учитывая, что согласно формуле,



описывающей кинетику ферментативных реакций, скорость протекания реакции зависит в том числе и от концентрации фермента?

Заключение. Диссертация Дарьи Михайловны Даниленко «Анализ эволюционной изменчивости и биологических свойств вирусов пандемического гриппа А(Н1N1)рdm09, циркулировавших в России в период с 2009 по 2013 гг.» является вполне завершенным научно-исследовательским трудом. Новые научные данные, полученные диссертантом, имеют весьма существенное значение как для науки, так и для практики. Полученные автором результаты достоверны, положения и выводы достаточно обоснованы. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации. Опубликованные автором научные статьи полностью соответствуют теме диссертации. Работа базируется на большом числе исходных данных, написана хорошим литературным языком. По каждой главе и работе в целом сделаны четкие выводы. Таким образом, диссертационная работа «Анализ эволюционной изменчивости и биологических свойств вирусов пандемического гриппа А(Н1N1)рdm09, циркулировавших в России в период с 2009 по 2013 гг.» отвечает требованиям п.9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, а ее автор – Даниленко Дарья Михайловна – заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.02 – Вирусология.

Официальный оппонент

Ведущий научный сотрудник

ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН

Д.м.н. Ю.А. Дешева.

11.09.2014

Подпись официального оппонента заверяю.

