

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Калининой Ольги Викторовны
на диссертацию Прокопьевой Елены Александровны на тему:
«Фенотипические и генотипические свойства пандемического вируса гриппа
A(H1N1)pdm09 при адаптации к мышам различного генотипа»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.02 - «вирусология»

Актуальность темы

Гриппозная инфекция занимает одно из ведущих мест в структуре общей инфекционной заболеваемости и является социально-значимым заболеванием. Несмотря на активную вакцинацию населения во всем мире, ежегодно эпидемии гриппа охватывают до 15% населения Земли, что связано с постоянным антигенным дрейфом у вирусов гриппа, а каждые 10-40 лет возникают пандемии, вызванные появлением вариантов вируса с новыми биологическими свойствами в результате реассортации сегментов генома различных подтипов вируса гриппа А.

В XXI веке первая и пока единственная пандемия гриппа, в которую были вовлечены более 200 стран, была зарегистрирована в 2009 г. и вызвана появлением нового варианта вируса гриппа A(H1N1), получившего название A(H1N1)pdm09. Различные варианты вируса гриппа типа А на протяжении последних 100 лет были причиной уже четырех пандемий. Отличительной особенностью нового пандемического штамма A(H1N1)pdm09 является его принадлежность к «тройным реассортантам» за счет комбинации сегментов генома вирусов гриппа свиней, птиц и человека. Ранее устойчивой передачи и закрепления активной циркуляции таких вариантов вирусов гриппа в человеческой популяции не отмечалось. Очевидно, что в процессе эволюции штамм A(H1N1)pdm09 приобрел дополнительные селективные преимущества, позволившие ему не только перешагнуть межвидовой барьер и успешно адаптироваться к новому хозяину, но и стать более вирулентным и трансмиссивным по сравнению с циркулировавшими штаммами гриппа в первом десятилетии XXI века. До сих пор молекулярные механизмы, обусловившие вышеперечисленные селективные преимущества штамму A(H1N1)pdm09, остаются до конца неизученными.

Учитывая, что изменение патогенного потенциала вируса происходит в процессе взаимодействия вируса с клетками-мишенями, исследование фенотипических свойств пандемического штамма A(H1N1)pdm09 при его адаптации к мышам является крайне важным для понимания механизмов адаптации патогена к хозяину и выявления новых детерминант патогенности.

В связи с этим, диссертационную работу Прокопьевой Е.А., можно с полной уверенностью считать своевременной и актуальной.

Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнений. Работа выполнена на высоком методическом уровне с применением широкого спектра современных методов и подходов: вирусологических (выделение и культивирование штаммов вируса гриппа на клеточной культуре MDCK, определение инфекционного титра на растущих куриных эмбрионах, моделирование гриппозной инфекции на лабораторных животных), молекулярно-генетических (выделение РНК, обратная транскрипция, ПЦР в режиме реального времени, секвенирование), серологических (РГА, РТГА), патоморфологических, включая электронную микроскопию, а также компьютерных программ (филогенетический анализ, анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, статистическая обработка).

Автором проанализированы образцы секционного материала (легкого, головного мозга, печени, почки, тонкой кишки) 335 мышей трех генетических линий при изучении фено- и генотипических особенностей пандемического штамма *A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09)* в ходе его адаптации к новому хозяину (мышь) посредством многократного пассирования (7-12 пассажей) через легкие; 34 мышей двух генетических линий при сравнении биологических свойств двух штаммов пандемического гриппа, циркулировавших в 2009 и 2010 гг; 65 мышей генетической линии BALB/c при сравнении патогенности штамма *A/Tomsk/273-MA1/2010 (H1N1pdm09)* и *A/goose/Krasnoozerskoye/627/05/05(H5N1)*. Многочисленные эксперименты грамотно запланированы, проведены на высоком методическом уровне, а все результаты подвергнуты статистической обработке.

Основные результаты диссертационной работы отражены в 18 научных работах, в том числе три - в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для опубликования основных научных результатов на соискание ученой степени кандидата наук. Материалы исследования представлены в виде докладов на многочисленных российских и международных конференциях.

Научные положения, выносимые на защиту обоснованы. Выводы и практические рекомендации логично вытекают из поставленных задач и результатов проведенных исследований.

Научная новизна диссертационной работы состоит в том, что автор получил панель штаммов вируса гриппа типа А, которая включает исходный пандемический штамм *A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09)* и его производные, адаптированные к мышам трех генетических линий: BALB/c, C57B1/6z и аутбредной линии CD1. Автором доказано, что пандемический штамм *A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09)*, выделенный от пациента с благополучным исходом заболевания, способен быстро адаптироваться к лабораторным мышам и вызывать повреждения клеточных структур не только в легких, но и в головном мозге, печени и почках, вызывая до 100 % летальности в зависимости от генетической линии мыши. Впервые, определены полные геномные последовательности всех трех адаптированных вариантов данного

штамма и выявлены аминокислотные замены, отвечающие за усиление их патогенных свойств в процессе адаптации.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные Прокопьевой Е.А. в ходе выполнения исследования данные вносят существенный вклад в понимание механизмов увеличения вирулентности вируса гриппа А и формирования новых потенциально опасных для человека вариантов возбудителя.

Созданная панель штаммов, включающая неадаптированный и адаптированные варианты пандемического штамма *A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09)*, может быть использована для оценки эффективности различных противовирусных химиопрепаратов. Полученный адаптированный вариант вируса гриппа штамма *A/Tomsk/273-МАЗ/2010(H1N1pdm09)* позволил при моделировании гриппозной инфекции у мышей оценить профилактическую эффективность окисленных декстранов на участке опытно-промышленного производства АО "ФНПЦ "Алтай" (г. Бийск) в рамках Федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2012 годы".

Полные геномные последовательности всех трех адаптированных вариантов данного штамма депонированы в международный банк данных GenBank. Автором создана база данных маркеров патогенности, которая может найти применение при анализе высоковирулентных свойств возникающих вариантов вируса гриппа.

Автор является соавтором патента "Синтетические олигонуклеотиды-праймеры, используемые для получения первичных последовательностей генов (PB2, PB1, PA, NP, MP, NS) низкопатогенных вирусов гриппа птиц".

Результаты и выводы диссертации могут быть использованы для модельных экспериментов с целью изучения любого пандемического вируса гриппа А.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Е.А. Прокопьевой построена по традиционной форме. Она состоит из введения, основной части, включающей в себя обзор литературы, описание материалов и методов исследования, собственные исследования и обсуждение результатов собственных исследований, заключения, списка использованных сокращений, списка литературы и приложения. Диссертация изложена на 184 страницах машинописного текста, иллюстрирована 26 рисунками и 12 таблицами. Список литературы включает 260 источников, из которых 198 иностранных. Имеются заключения биоэтического и этического комитетов на проведение экспериментальных и клинических исследований по теме работы.

В разделе «Введение» автор описывает актуальность темы исследования, посвященного свойствам пандемического гриппа А(H1N1)pdm09, отражает степень разработанности проблемы быстрой адаптации вирусов к организму человека и их способности преодолевать

межвидовой барьер. На основании этого автором сформулирована цель исследования и поставлены четыре научные задачи для ее достижения. Во введении представлены научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, приведено краткое описание методологии и методов исследования, отражена степень достоверности и апробации результатов, приведены основные положения, выносимые на защиту.

Раздел "Обзор литературы" состоит из 4 подглав, в которых представлен подробный анализ научных публикаций по рассматриваемой теме, и заключения. В первой подглаве Прокопьева Е.А. приводит общие данные о гриппе, эпидемиологических особенностях вирусов гриппа А, В и С, а также строении вириона гриппа А и его свойствах. Во второй подглаве основное внимание уделено вопросам возникновения эпидемий и пандемий, а также описанию молекулярных механизмов возникновения пандемических вирусов гриппа А. В третьей подглаве автор приводит обзор многочисленных литературных данных, посвященных выбору лабораторных моделей и условиям проведения экспериментов по изучению патогенеза гриппозной инфекции. В четвертой подглаве автор кратко приводит описание молекулярных механизмов адаптации вируса гриппа А(H1N1)pdm09 к организмам хозяев. В заключительном разделе обзора литературы автор логично обосновывает цель диссертационного исследования.

В целом, обзор литературы написан хорошим литературным языком, практически не содержит грамматических и орфографических ошибок. Автор диссертации хорошо разбирается в проблеме, а сам литературный обзор может быть рекомендован к опубликованию в виде обзорной статьи.

Раздел "Материалы и методы" подробно описывает методы и подходы, использованные в работе. Обращает на себя внимание тот факт, что все методы являются современными, а результаты, получаемые при их использовании - достоверными. Особым достоинством работы является комплексное использование разнообразных методов: вирусологических, серологических, молекулярно-биологических, а также патоморфологических. Работа выполнена на стыке различных дисциплин на прекрасном методическом уровне.

В главе "Собственные исследования", состоящей из 3 разделов, приведены экспериментальные данные, полученные Прокопьевой Е.А. в ходе выполнения кандидатского исследования.

В разделе "Изучение адаптации пандемического вируса гриппа" автор описывает получение адаптированных вариантов пандемического штамма *A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09)* к лабораторным мышам трех генетических линий. Характеризует закрепившиеся в адаптированных вариантах по сравнению с родительским штаммом мутации. Проводит изучение вирулентных свойств адаптированных вариантов при перекрестном инфицировании мышей двух генетических линий, а также особенностей патогенеза гриппозного заболевания, вызванного адаптированным вариантом вируса, подтверждая данные патоморфологическими исследованиями.

В разделе "Изучение биологических свойств штаммов вируса гриппа А(Н1N1)pdm09, циркулировавших во время пандемии 2009 г. и в постпандемический период в 2011 г. на территории Сибири" автор проводит всесторонний сравнительный анализ штаммов *A/Novosibirsk/13/2009(H1N1)pdm09* и *A/Novosibirsk/KSH/2011(H1N1)pdm09*, выделенных от пациентов с благополучным исходом заболевания, доказывая снижение патогенности штамма *A/Novosibirsk/KSH/2011(H1N1)pdm09* с использованием патоморфологических методов исследования.

В разделе "Сравнительное исследование патогенности вирусов гриппа А/Н5N1 и А(Н1N1)pdm09 (неадаптированный и адаптированный варианты)" автор характеризует течение воспалительного процесса у лабораторных животных, зараженных данными штаммами вируса гриппа.

Раздел "Обсуждение результатов собственного исследования" посвящен подробному анализу представленных результатов, их сопоставлению с известными литературными данными, что дает полное представление об актуальности диссертационного исследования и его значимости для фундаментальной науки и практического здравоохранения.

Выводы диссертационного исследования Е.А. Прокопьевой полностью соответствуют поставленным цели и задачам, что свидетельствует о законченности работы.

Замечания и вопросы для обсуждения

Содержание диссертационного исследования досаточно полно и подробно представлено в рукописи и автореферате. Существенных недостатков в работе не обнаружено, но возникает ряд вопросов и пожеланий, приведенных ниже:

1) не вполне понятна формулировка «Данный вирус гриппа был зарегистрирован в более чем 214 странах и стал результатом около 151,700 – 575,400 смертей по всему миру». Откуда такой разброс данных? Неужели до сих пор нет более точных данных о людских потерях?

2) в связи с формулировкой положения №1, выносимого на защиту «Пандемический ВГ А(Н1N1)pdm09 способен быстро адаптироваться к генетически различным животным.....» возникает вопрос: существуют ли генетически идентичные животные, если да, то какие, и использовал ли автор таких животных в экспериментах при моделировании гриппозной инфекции на мышах?

3) есть ряд замечаний редакционного плана: кусочки органов невозможно залить в парафин, скорее их можно залить парафином; нумерация подглав обзора литературы не содержит подглавы 1.3, и т.д.;

4) в выводе №4 присутствует слово «вероятно», что более соответствует предположению, а не доказанному результату;

5) при представлении экспериментальных данных желательно иначе представить анализ аминокислотных замен с процентом их выявляемости, поскольку в рукописи он приведен частично и в связи с этим трудно воспринимаем, а также использовать при описании накопления в геноме

мутаций не термин аминокислотные замены, поскольку они присутствуют только в белках, а несинонимические нуклеотидные замены, мутации которых и обуславливают изменение аминокислот в белках.

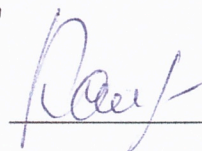
Следует отметить, что все перечисленные вопросы имеют частный характер, а перечисленные недостатки ни в коей мере не влияют на крайне положительное впечатление о работе.

Заключение

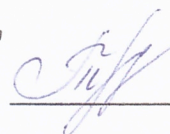
Диссертационная исследование ПРОКОПЬЕВОЙ ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНЫ на тему: «Фенотипические и генотипические свойства пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 при адаптации к мышам различного генотипа», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02- вирусология является законченной научно-квалификационной работой, которая вносит существенный вклад в понимание механизмов появления пандемических вирусов и патогенеза гриппа типа А, что безусловно найдет свое применение в целях мониторинга и контроля пандемически значимых вариантов вируса гриппа.

По актуальности темы, объему исследований, методическому уровню, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Прокопьевой Елены Александровны соответствует профилю 03.02.02 - «вирусология» и отвечает требованиям п. 9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, ПРОКОПЬЕВА ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА, заслуживает присуждения искомой степени - ученой степени кандидата биологических наук.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярной микробиологии
ФБУН "Санкт-Петербургский
научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Пастера"
доктор биологических наук
по специальности 03.02.02 вирусология

 О.В. Калинина

Подпись д.б.н. О.В. Калининой заверяю,
Ученый секретарь ФБУН "Санкт-Петербургский
научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Пастера"
кандидат биологических наук

 Г.Ф. Трифонова

23 ноября 2015 года

