

**Отзыв официального оппонента
на диссертационную работу Соболева Ивана Андреевича
«Изменчивость поверхностных гликопротеинов вирусов гриппа
А(Н3N2) и В, циркулировавших на территории азиатской части РФ с
2008 по 2013 гг», представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология**

Актуальность темы.

Грипп относится к острым респираторным вирусным инфекциям и представляет собой одну из наиболее значимых проблем, стоящих перед современным здравоохранением. Заболеваемость гриппом обуславливает ряд проблем социального и экономического характера: смертность в группах риска, резкое повышение нагрузки на персонал медучреждений, снижение трудовых ресурсов.

Эпидемиологические особенности гриппа во многом объясняются строением его генома. Высокая степень изменчивости генома в результате накопления отдельных мутаций позволяет вирусу уклоняться от специфического иммунитета, что проявляется в развитии ежегодных эпидемии. Сегментированность генома вируса обуславливает возможность реассортации, которая может приводить к появлению новых вариантов вируса, в том числе наиболее опасных для человеческой популяции пандемических штаммов. Таким образом, особенности генома вируса гриппа позволяют этому патогену ежегодно вызывать сезонные эпидемии, несмотря на профилактическую вакцинацию и наличие специфических лекарственных препаратов.

Кроме того, постоянно увеличивающаяся численность человеческой популяции наряду с возможностью быстрого перемещения на значительные расстояния, создают благоприятные условия для циркуляции и распространения вируса гриппа.

Несмотря на то, что мировым научным сообществом накоплено большое количество информации о распространении и изменчивости вируса гриппа в человеческой популяции – возникающие каждый эпидемический сезон штаммы представляют собой новые варианты вируса, отличающиеся не только от циркулировавших ранее, но и от циркулировавших одновременно с ними. Кроме того, появление в 2009 г. пандемического варианта вируса гриппа обусловило уникальную возможность изучить влияние пандемии на генетическое разнообразие эпидемических (сезонных) вариантов вируса гриппа. При этом эпидемический грипп представлен двумя типами (А и В), которые отличаются динамикой генетической изменчивости. При общем обилии вариантов вируса гриппа, зачастую, на конкретной территории циркулируют вирусы, относящиеся к ограниченному числу генетических групп и характеризующиеся наличием определенных мутаций. Именно по этой причине изучение в динамике изменчивости вируса, циркулирующего на конкретной территории, имеет большое значение. В силу вышесказанного Азиатская часть России является очень интересным регионом для изучения генетических особенностей вируса гриппа, т.к. эта территория характеризуется малой населенностью (относительно европейской части РФ), при этом население, в основном, компактно сосредоточено в городах,

которые разделены значительными расстояниями. Это позволяет изучать генетическое разнообразие вируса как на локальном (городском и областном) уровне, так и в более значительных масштабах. Кроме того, азиатская часть РФ географически близка к странам Юго-Восточной Азии, которые крайне плотно заселены и на территориях которых, в основном, начинается ежегодный сезонный подъем заболеваемости гриппом.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна.

Обоснованность и достоверность результатов, научных положений и выводов не вызывает сомнений. Исследование выполнено на высоком методическом уровне с использованием современных методов и подходов: вирусологических, серологических, молекулярно-биологических, а также компьютерного анализа данных.

Научная новизна работы заключается в привязке проведенных исследований по изучению изменчивости и распространенности вируса гриппа к конкретной территории. В ходе исследования:

- Определены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих гемагглютинин и нейраминидазу 29 штаммов вируса гриппа А(Н3N2) и 33 штаммов гриппа В, выделенных в азиатской части РФ;

- Выявлены паттерны накопления мутаций в поверхностных гликопротеинах вируса гриппа и обнаружены позиции, по которым происходило накопление аминокислотных замен, ассоциированных с изменением антигенных свойств вируса, а следовательно, с уклонением от иммунного ответа организма-хозяина;

- Определена степень генетической идентичности поверхностных гликопротеинов всех исследованных штаммов и вакцинных штаммов рассматриваемых эпидемических сезонов;

- Выявлена гетерогенность (по поверхностным гликопротеинам) пула циркулировавших вариантов вируса гриппа;

- Показана динамика изменчивости вирусов гриппа А(Н3N2) и В, изолированных на территории Азиатской части России.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.

В ходе работы определены первичные структуры генов HA и NA сезонных вирусов гриппа, изолированных в Азиатской части РФ в предпандемический и постпандемические сезоны. Эти последовательности являются важным дополнением к существующему пулу известных геномов вирусов гриппа и, благодаря размещению в открытых международных базах данных GenBank и GISAID, включаются в глобальную картину эволюционной изменчивости вирусов гриппа, циркулировавших в человеческой популяции.

Немаловажным фактом является выявление корреляции между появлением пандемического варианта вируса и изменением генетического разнообразия эпидемических вирусов, т.к. изменение состава пула циркулировавших вирусов напрямую связано с составом вакцин от гриппа.

Соискателем был проведен большой объем работ с применением современных молекулярно-биологических и вирусологических методов.

Все полученные результаты оформлены должным образом, их достоверность не вызывает сомнений. Выводы соответствуют полученным экспериментальным данным.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Результаты и выводы диссертационной работы имеют большое фундаментальное значение и могут быть использованы при дальнейшем изучении эволюции вирусов гриппа и их участия в эпидемических процессах.

Депонированные в международную базу данных GenBank и международную специализированную (по вирусу гриппа) базу данных GISAID последовательности сегментов генома, кодирующих поверхностные гликопротеины HA и NA, могут быть в дальнейшем использованы при выполнении работ в области вирусологии, молекулярной биологии и филогении сезонных вирусов гриппа.

Создана и принята на патентное депонирование в Коллекцию микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» коллекция штаммов вируса сезонного гриппа различных типов/субтипов, циркулировавших в азиатской части РФ в 2008-2013 гг., которые могут быть использованы для приготовления диагностических препаратов, а также для сравнительного анализа биологических свойств новых штаммов.

Содержание диссертации.

Диссертационная работа Соболева Ивана Андреевича имеет традиционную структуру и состоит из введения, списка сокращений, главы обзора литературы, главы материалов и методов, главы результатов собственных исследований, главы обсуждения результатов собственного исследования, выводов, списка литературы, приложения. Изложение диссертационной работы осуществлено по монографическому типу, объем работы составляет 225 страниц, включает 48 рисунков, 46 таблиц, 228 библиографических ссылок (из них 222 – работы зарубежных авторов).

Во введении автор лаконично излагает актуальность темы, степень ее разработанности, цели и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, методологию и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробации результатов.

Глава 1 «Обзор литературы» содержит структурированный материал о существующей в настоящее время классификации вируса гриппа, его морфологии, организации генома, репликации вируса, строения поверхностных гликопротеинов, изменчивости вируса гриппа и изменениях в первичной структуре HA и NA вирусов гриппа А(Н3N2) и В в период с 2008 по 2013 гг.

Глава 2 «Материалы и методы» содержит информацию об использовавшихся в работе реактивах, средах, линиях клеток, оборудовании. Работа выполнена с помощью стандартных вирусологических, молекулярно-биологических и иммунологических методов. Использованные методологические подходы адекватны поставленным задачам.

Собственные результаты представлены в Главе 3 «Результаты собственных исследований». В данной главе приведены результаты изучения изменчивости поверхностных гликопротеинов вируса гриппа А(Н3N2) и В, циркулировавших на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг. За указанный период были собраны 2640 проб от пациентов с проявлением симптомов ОРВИ. Из этих проб было выделено 416 изолятов вирусов гриппа различных типов и субтипов. В итоге в исследовании было включено 29 изолятов вируса гриппа А(Н3N2) и 36 изолятов вируса гриппа типа В.

В пределах отдельных эпидемических сезонов выявлено сходство последовательностей HA большинства штаммов, за исключением штамма A/Novosibirsk/02d/2012 эпидемического сезона 2011-2012 гг., который отличается от остальных штаммов данного сезона и по анализу аминокислотных замен, относится к другой генетической подгруппе.

При анализе дистанций между последовательностями HA штаммов разных эпидемических сезонов обнаружено, что штаммы постпандемического сезона 2010-2011 гг. значительно отличаются от штаммов двух последующих сезонов, как по нуклеотидным, так и аминокислотным последовательностям (средние значения дистанций по нуклеотидным последовательностям составляют $0,0230 \pm 0,0012$ и $0,0265 \pm 0,0011$, а по аминокислотным - $0,0296 \pm 0,0026$ и $0,0332 \pm 0,0022$). При этом дистанции между HA штаммов сезона 2008-2009 гг. и сезонов 2010-2011, 2011-2012 гг. схожи: $0,0131 \pm 0,0012$, $0,0139 \pm 0,0016$ по нуклеотидным последовательностям, $0,0173 \pm 0,0019$ и $0,0205 \pm 0,0021$ – по аминокислотным. Таким образом, штаммы эпидемического сезона 2008-2009 гг. по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям HA равноудалены от штаммов эпидемических сезонов 2010-2011 и 2011-2012 гг.

При анализе последовательностей NA тех же штаммов автором установлено, что штаммы предпандемического сезона 2008-2009 гг. значительно отличаются от штаммов трех последующих сезонов, а штаммы, изолированные в 2010-2011 гг., соответственно – от двух следующих сезонов. Наибольшая гетерогенность по структуре NA отмечена у штаммов предпандемического сезона 2008-2009 гг. Аминокислотные последовательности NA этих штаммов дифференцируются между собой по эволюционному расстоянию от более поздних изолятов вируса гриппа: A/Novosibirsk/628/2009, A/Novosibirsk/707/2009 и A/Novosibirsk/1211/2009 дистанцированы от штаммов сезонов 2010-2011, 2011-2012 и 2012-2013 г. в большей степени, чем A/Novosibirsk/31/2009 и A/Novosibirsk/319/2009. При этом, последовательности NA штаммов эпидемических сезонов 2011-2012 и 2012-2013 гг., незначительно дистанцированы как в пределах сезонов, так и между ними. Попарные дистанции между штаммами эпидемических сезонов 2008-2009 гг. и 2011-2012 гг. в среднем равны $0,0156 \pm 0,0017$ для нуклеотидных последовательностей NA и $0,0195 \pm 0,0043$ – для аминокислотных. Следовательно, по структуре NA, так же, как и в случае с HA, штаммы двух постпандемических эпидемических сезонов эволюционно равноудалены от штаммов предпандемического сезона. При этом

последовательности NA штаммов сезона 2011-2012 гг. значительно дистанцированы от NA штаммов предыдущего сезона 2010-2011 гг.

Проведя анализ эволюционных дистанций автор сделал заключение, что штаммы эпидемического сезона 2010-2011 гг. значительно отличались от других исследованных штаммов и относились к иной генетической кладе.

Среди изолятов вируса гриппа В в ходе исследования 29 относились к линии Виктория и 7 – к линии Ямагата.

При анализе эволюционных дистанций между последовательностями NA штаммов *линия В/Victoria* разных эпидемических сезонов обнаружено, что штаммы, изолированные в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг., по первичной структуре гена NA более дистанцированы от штаммов постпандемического сезона 2010-2011 гг. (среднее значение эволюционных дистанций составило $0,0127 \pm 0,0010$), чем от штаммов предпандемического сезона 2008-2009 гг. ($0,0076 \pm 0,0009$). Кроме того, эволюционные дистанции между штаммами, выделенными в предпандемический сезон 2008-2009 гг. и постпандемический сезон 2010-2011 гг. превышают расстояния между штаммами эпидемических сезонов 2008-2009 и 2011-2012 гг. По первичной структуре белка NA штаммы постпандемического сезона 2010-2011 гг. также эволюционно дистанцированы от более схожих между собой штаммов эпидемических сезонов 2008-2009 гг. и 2011-2012 гг. Дистанции между штаммами сезонов 2008-2009 и 2011-2012 гг. составляют $0,0034 \pm 0,0010$, между штаммами сезонов 2008-2009 и 2010-2011 – $0,0051 \pm 0,0012$ и между штаммами сезонов 2010-2011 и 2011-2012 – $0,0044 \pm 0,0012$. В целом, на аминокислотном уровне, NA исследованных изолятов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria дистанцированы друг от друга на различные эволюционные расстояния, в том числе и в пределах отдельных эпидемических сезонов. Это обуславливает значительную величину стандартного отклонения среднего значения эволюционных дистанций. Таким образом, в пределах отдельных эпидемических сезонов изолировались как штаммы схожие между собой по первичной структуре NA (до полной идентичности), так и штаммы, содержащие различное количество аминокислотных замен.

По структуре NA штаммы эпидемического сезона 2011-2012 гг. в большей мере схожи не со штаммами предыдущего сезона 2010-2011 гг., а со штаммами, изолированными в течение эпидемического сезона 2008-2009 гг. (до пандемии А/Н1N1pdm09). Эволюционные дистанции в среднем составляют:

- между последовательностями NA штаммов эпидемических сезонов 2008-2009 и 2010-2011 гг.: $0,0101 \pm 0,0006$ на нуклеотидном уровне и $0,0197 \pm 0,0019$ – на аминокислотном;

- между последовательностями NA штаммов эпидемических сезонов 2008-2009 и 2011-2012 гг.: $0,0082 \pm 0,0009$ на нуклеотидном уровне и $0,0148 \pm 0,0025$ – на аминокислотном;

- между последовательностями NA штаммов эпидемических сезонов 2010-2011 и 2011-2012 гг.: $0,0137 \pm 0,0012$ на нуклеотидном уровне и $0,0244 \pm 0,0028$ – на аминокислотном.

Интересным является результат, полученный автором, что после пандемии вируса гриппа А/Н1N1pdm09 произошло увеличение

эволюционных дистанций между сибирскими штаммами вируса гриппа В генетической линии В/Victoria и предыдущим вакцинным штаммом В/Malaysia/2506/2004 и в дальнейшем изменения генетических дистанций не происходило. Штаммы вируса гриппа В «накопили» нуклеотидные замены, обусловившие значительные отличия от прежнего вакцинного штамма. На аминокислотном уровне эволюционные дистанции от штамма В/Malaysia/2506/2004 в среднем уменьшились в эпидемический сезона 2011-2012 гг., главным образом за счет изолятов, выделенных в Магадане.

В дальнейшем (на протяжении двух эпидемических сезонов) сегмент генома, кодирующий НА, при неизменной эволюционной дистанции относительно НА штамма В/Malaysia/2506/2004, изменялся относительно НА вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008. Таким образом, динамику изменения эволюционных дистанций относительно В/Malaysia/2506/2004 автор охарактеризовал как увеличение с последующей стабилизацией. Иной паттерн изменчивости оказался характерен для генетических дистанций относительно штамма В/Brisbane/60/2008. После пандемии (эпидемический сезон 2010-2011 гг.) произошло значительное увеличение эволюционных расстояний НА исследованных штаммов от НА В/Brisbane/60/2008, а штаммы следующего эпидемического сезона 2011-2012 гг. по первичной структуре гена НА оказались менее дистанцированы от этого вакцинного штамма, чем штаммы предыдущего эпидемического сезона.

Наибольшей гетерогенностью аминокислотных последовательностей НА отличаются штаммы, выделенные в эпидемический сезон 2010-2011 гг.. В аминокислотных последовательностях НА исследованных штаммов за рассмотренные эпидемические сезоны обнаружены варибельные позиции, в которых со сменой эпидемического сезона происходили неоднократные замены аминокислот. Выявлено большее количество (по сравнению с НА) аминокислотных замен между последовательностями НА штаммов выделенных в разные эпидемические сезоны. По структуре НА штаммы различных сезонов значительно отличаются между собой. Именно для этого поверхностного гликопротеина выявлена значительная изменчивость при смене эпидемических сезонов.

При анализе эволюционных дистанций между последовательностями НА штаммов *линия В/Yamagata* разных эпидемических сезонов -2011-2012 и 2012-2013 гг автором установлено, что невозможно выявить корреляцию между характером их изменчивости и пандемией А/Н1N1pdm09. Согласно попарным эволюционным дистанциям, можно отметить большие, чем в случае с вирусами гриппа линии В/Victoria, значения дистанций между НА российских изолятов эпидемического сезона 2012-2013 гг. и вакцинным штаммом предыдущего сезона. Кроме того, дистанции между штаммами последовательных эпидемических сезонов ($0,0249 \pm 0,0008$ на нуклеотидном уровне и $0,0199 \pm 0,0008$ на аминокислотном) также превышают аналогичные значения для вирусов линии В/Victoria.

Российские штаммы вируса гриппа В линии В/Yamagata, изолированные в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг., по первичной структуре НА схожи с вакцинным штаммом В/Wisconsin/01/2010 и дистанцированы от пре-

дыдущего вакцинного штамма В/Florida/4/2006. Штаммы следующего эпидемиологического сезона 2012-2013 гг. схожи со штаммом В/Massachusetts/02/2012 и значительно дистанцированы от штамма В/Wisconsin/01/2010. При этом NA вирусов, изолированных в 2012-2013 гг. характеризуется уменьшением эволюционных дистанций от вакцинного штамма В/Florida/4/2006. Эволюционные расстояния между штаммами двух последовательных эпидемиологических сезонов максимальны и превышают дистанции между исследованными изолятами и вакцинными штаммами разных сезонов. Автором установлено, что штаммы вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, изолированные в азиатской части РФ в течение последовательных эпидемиологических сезонов 2011-2012 и 2012-2013 гг. по структуре NA принадлежали к двум различным генетическим группам и штаммы эпидемиологического сезона 2012-2013 гг. не являлись результатом эволюции вирусов гриппа, циркулировавших на рассматриваемой территории в 2011-2012 гг.

Интересными являются заключения автора, что изоляты, выделенные в изучаемые эпидемиологические сезоны значительно отличаются по паттернам распределения аминокислотных замен, что коррелирует с дальнейшими изменениями в составе вакцины и что штаммы вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, изолированные в течение двух последовательных эпидемиологических сезонов, формировали два различных кластера, что коррелирует со сменой вакцинных штаммов.

В Главе 4 «Обсуждение результатов собственного исследования» автор проводит обсуждение собственных результатов с известными литературными данными, проводит анализ материалов в соответствии с задачами работы.

Анализируя научный труд Соболева Ивана Андреевича, можно заключить, что успешно были решены все поставленные задачи, все это позволило достигнуть заявленной цели в полном объеме.

Работа написана доступным грамотным языком, в достаточной степени иллюстрирована экспериментальными данными, полученными лично или при участии автора.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах.

Результаты диссертации отражены в 20 печатных работах, в том числе в 6 статьях в 4 реферируемых российских журналах из списка ВАК и в 2 международных журналах, а также в тезисах докладов на российских и международных конференциях.


Автореферат Соболева Ивана Андреевича полностью отражает содержание диссертационной работы и изложен на 28 страницах.

Замечания

В работе присутствуют некоторое число опечаток и «неудачных» формулировок. В Главе 4 автор мог привести сравнительный филогенетический анализ со штаммами, циркулировавшими в соседних с азиатской частью РФ странах (Китай, Япония). Отмеченные недостатки не ставят под сомнение научную ценность и практическую значимость работы в целом.

Выполненная работа по своей теоретической и практической значимости, новизне и актуальности соответствует п.9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г., а автор представленной диссертации Соболев Иван Андреевич заслуживает присвоения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Заместитель директора
ФГУП СПбНИИВС ФМБА России
д.м.н., профессор



Г.М. Игнатьев

Почтовый адрес: 198320, Санкт-Петербург, г. Красное село, ул. Свободы, 52
Тел.: +7 8126600611
e-mail: marburgman@mail.ru

Подпись Игнатьева Г.М. заверяю

Начальник отдела кадров
ФГУП СПбНИИВС ФМБА России



Дмитриева Н.В.

