

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, заведующей лабораторией этиологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации Бурцевой Елены Ивановны на диссертационную работу Сорокина Евгения Валентиновича на тему: «ЭПИТОПНОЕ КАРТИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСОВ ГРИППА В ЯМАГАТСКОЙ И ВИКТОРИАНСКОЙ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ЛИНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – «вирусология»

Актуальность темы. Вирусы гриппа известны своим многообразием с разделением на типы А, В, С и D, каждый из которых уникален по своим характеристикам. Диссертационная работа Сорокина Евгения Валентиновича посвящена изучению антигенной структуры молекулы гемагглютинаина вируса гриппа В.

Вирус гриппа В способен инфицировать в основном человека и не имеет природного резервуара. Однако с 1983г. стало очевидным существование двух эволюционных линий – В/Виктория/2/87-подобных и В/Ямагата/16/88-подобных, которые различаются между собой по антигенным и генетическим свойствам. Наиболее активно одновременную циркуляцию представителей обеих эволюционных линий начали регистрировать с 2001г., при этом их активность и доленое участие в период эпидемических подъемов может различаться от сезона к сезону. В связи с этим, на сегодняшний день стоит вопрос о включении обоих вариантов вируса гриппа В в состав гриппозных вакцин.

Эпидемическая значимость вирусов гриппа В заключается в их изменчивости, «антигеном дрейфе», который прослеживается реже по сравнению с вирусом гриппа А. Инфицирование человека вызывают варианты со значительными отличиями в антигенных свойствах, которые появляются и

становятся доминирующими в популяции циркулирующих штаммов в период 2-5 лет, вытесняя при этом своих предшественников. Механизм «антигенного дрейфа» вирусов гриппа заключается в непрерывно происходящем процессе возникновения точечных мутаций в генах (замены, делеции и инсерции), кодирующих как поверхностные, так и внутренние белки. Кроме того, данные филогенетического анализа показали, что частота таких замен определяет скорость эволюционной изменчивости вирусов гриппа, и, следовательно, их активность в эпидемическом процессе. Однако эволюционная динамика вирусов гриппа В на общегеномном уровне в глобальном масштабе еще мало исследована.

В связи с вышесказанным, определенный интерес представляли исследования, направленные на изучение механизмов возникновения новых антигенных вариантов вируса гриппа В с применением эпитопного картирования гемагглютиниона вируса гриппа, что способствует решению как практических, так и фундаментальных вопросов вирусологии.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: получить и охарактеризовать панели моноклональных антител к представителям обеих эволюционных линий вируса гриппа В; получить эскейп-мутанты, провести их секвенирование и определить иммунодоминантные антигенные детерминанты; выполнить эпитопное картирование с построением трехмерных моделей гемагглютиниона; определить влияние отдельных замен на рецепторные функции вируса.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, а также их достоверность и новизна не вызывают сомнений. Они базируются на комплексном использовании адекватных поставленным задачам современных методов молекулярной биологии и вирусологии. Автором были разработаны панели вируснейтрализующих моноклональных антител, которые в дальнейшем были успешно использованы для эпитопного картирования

молекулы гемагглютинина вирусов гриппа В обеих эволюционных линий. Полученные результаты были проанализированы и обоснованы с учетом существующих в современной литературе сведений. Выводы и научные положения логично вытекают из результатов исследования и являются корректными.

Значимость для науки и практики состоит в том, что впервые в России разработаны панели вируснейтрализующих моноклональных антител, направленных к антигенным детерминантам в составе гемагглютинина вирусов гриппа типа В эволюционных линий В/Виктория-подобных и В/Ямагата-подобных. В большой субъединице гемагглютинина (НА1) вирусов гриппа В обеих линий впервые выявлен ряд новых детерминант, ответственных за выработку вируснейтрализующих антител и изменения антигенных свойств вируса.

Экспериментально подтверждена роль отдельных аминокислотных остатков в составе НА1 в реализации рецептор-связывающих свойств вирусов гриппа В.

В целом работа расширяет представления о структуре-иммунодоминантных сайтов в составе молекулы гемагглютинина вирусов гриппа В обеих линий.

Очевидно, что работа имеет преимущественно теоретический характер. Тем не менее, анализ полученных в лабораторных условиях эскейп-мутантов позволяет оценивать антигенную изменчивость гемагглютинина вируса гриппа В на эпителиальном уровне, что может быть полезно при выборе эталонных штаммов для включения в состав диагностических тест-систем и вакцин. Так, полученные моноклональные антитела оказались полезными для более тонкого антигенного анализа циркулирующих вирусов гриппа в сравнении с поликлональными сыворотками, а некоторые из них – перспективными иммунореагентами для конструирования высокочувствительных и специфичных диагностических тест-систем.

13 эскейп-мутантов вируса гриппа В были депонированы в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ №№2886, 2907-2918).

Полнота изложения материалов. Диссертация Сорокина Е.В. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, обсуждения, выводов и списка использованных источников, включающего 217 статей, а также 5 приложений. Работа иллюстрирована 16 таблицами и 68 рисунками, которые существенно облегчают восприятие материала. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК. Получен 1 патент на изобретения РФ.

Во введении отмечена актуальность темы и степень разработанности проблемы, поставлены цели и задачи работы, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, приведены положения, выносимые на защиту и вклад автора в выполнение данного исследования.

В главе «Обзор литературы» на основании материалов отечественных и зарубежных исследователей подробно изложены данные по структуре и функции белков вируса гриппа В, в том числе, гемагглютинина и рецептор-связывающего сайта, эволюционной изменчивости и антигенном картировании с помощью моноклональных антител.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны методы, структура и объем проведенных исследований, представлены подходы к обработке полученных результатов.

Глава 3 посвящена результатам собственных исследований. В частности, получены и охарактеризованы новые гибридомы-продуценты моноклональных антител к вирусам гриппа В линии В/Ямагата-подобных - В/Массачусетс/2/12 и В/Флорида/04/06; подтверждена их специфичность в отношении конформационной структуры гемагглютинина вируса гриппа В линии В/Ямагата-подобных разных лет выделения. Исключением стали моноклональные антитела 10F4, которые не взаимодействовали со штаммами,

выделенными в период 1988-1998гг. Изучена панель 20 эскейп-мутантов к вышеуказанным штаммам вируса гриппа В; результаты секвенирования позволили выявить в молекуле гемагглютинина иммунодоминантные эпитопы и идентифицировать аминокислотные остатки, которые вовлечены в формирование рецептор-связывающего кармана и влияют на антигенную специфичность. Локализация аминокислотных замен в молекуле гемагглютинина разных эскейп-мутантов была представлена на трехмерной структуре HA1.

Получена и охарактеризована панель из 16 моноклональных антител к вирусу гриппа В линии В/Виктория-подобных – В/Брисбен/46/15 в РТГА, реакции нейтрализации и иммуноблотинге, которая была специфична к вирусам разных лет выделения; антитела обладали выраженной гемагглютинирующей и вируснейтрализующей активностью к большой субъединице гемагглютинина (HA1). Выявлена гетерогенность по степени реагирования с другими референс-штаммами, такими как, В/Брисбен/60/08, В/Гонконг/330/01, В/Шандонг/7/97 и В/Малайзия/2506/04. Данные иммуноблотинга показали, что ряд моноклональных антител были специфичны как в отношении конформационной структуры гемагглютинина, так и в отношении его первичной последовательности. Одним из предположений автора стало также заключение о том, что моноклональные антитела распознают антигенные области гемагглютинина, которые подвержены изменениям в результате культивирования в различных чувствительных системах и имеют различную рецепторную специфичность, что важно учитывать при выборе вакцинных штаммов.

Для изучения антигенной изменчивости вируса гриппа В линии В/Виктория-подобных была разработана панель из 5 моноклональных антител к более ранним вирусам – В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04. Получены результаты их реагирования в РТГА со спектром эпидемических штаммов, выделенных в разных странах мира, в том числе и России; данные подтвердили их выраженную вируснейтрализующую активность.

Автором проведено антигенное картирование гемагглютинина вирусов гриппа обеих эволюционных линий с использованием полученных моноклональных антител, в результате чего получено представление о новых иммунодоминантных эпитопах. В частности, с помощью панели из 30 эскейп-мутантов к вирусу гриппа В/Брисбен/46/15 были выявлены аминокислотные замены, расположенные в петле-120, петле-160, петле-240, спирали-190 и прилегающих к этим регионам областях; большинство из них вовлечены в формирование рецептор-связывающего кармана. Впервые был идентифицирован новый эпитоп в положении 317 гемагглютинина вирусов гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/25/09. Полученные результаты позволили объяснить способность вирусов гриппа линии В/Виктория-подобных ускользать от специфического связывания с антителами. Автор указывает на важность одной из замен (K203T), которая ответственна за резистентность к взаимодействию с разнонаправленными нейтрализующими моноклональными антителами и обеспечивает вирусу большие перспективы длительной циркуляции.

Сорокиным Е.В. проведены исследования влияния аминокислотных замен в гемагглютинине вирусов гриппа В обеих эволюционных линий на рецептор-связывающие свойства. Показано, что аминокислотные замены в положении N202K и S242R гемагглютинина эскейп-мутантов вируса гриппа В линии В/Ямагата-подобных оказывают влияние на рецептор-связывающие свойства; наличие основных аминокислот (лизина или аргинина) определяет способность взаимодействовать с SA α 2,3-Gal рецепторами. Такие же результаты были получены в отношении эскейп-мутантов вируса гриппа В линии В/Виктория-подобных, несущих замены A202E и A317V.

В главе «Обсуждение» Сорокин Е.В. подводит итоги проведенных исследований и приводит данные по изученным направлениям, опубликованные отечественными и зарубежными учеными.

Выводы обоснованы и в целом логически вытекают из результатов проведенных исследований.

В автореферате в традиционно сжатой форме приведены: актуальность исследования, степень разработанности проблемы, цель работы и основные задачи исследований, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследований, основные положения, выносимые на защиту, апробация работы, а также изложены основные результаты экспериментальных исследований, обосновывающих выводы диссертации.

Однако при детальном ознакомлении с материалами диссертации возникли некоторые вопросы, замечания и пожелания.

1. С чем был связан выбор штаммов вируса гриппа В для получения моноклональных антител.
2. Есть ли у соискателя предположения по полученному результату в отношении моноклональных антител 10F4, которые не взаимодействовали с ранее циркулировавшими штаммами линии В/Ямагата-подобных (1988-1998гг.), но реагировали со штаммами более позднего периода выделения (2004-2012гг.):
3. По выводу 6. Вывод представлен скорее утвердительно, чем предположительно; для его подтверждения необходимо провести детальное изучение с применением синтетических аналогов рецепторов, о чем сам автор указывает в «Перспективах дальнейшей разработке темы». Кроме того, информативными были бы результаты секвенирования нейраминидазы.
4. Есть отдельные опечатки, а также желательно написание линий вируса гриппа как «эволюционные линии вируса гриппа В - В/Виктория-подобные и В/Ямагата-подобные».

Сделанные замечания не снижают научной и практической ценности диссертационной работы и не влияют на общую положительную оценку полученных результатов.

Заключение. Диссертационная работа Сорокина Евгения Валентиновича на тему «Эпитопное картирование молекулы гемагглютинаина вирусов гриппа В Ямагатской и Викторианской эволюционных линий с использованием моноклональных антител» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной задачи – расширение знаний по антигенной изменчивости вируса гриппа В, что представляет актуальность при выборе вакцинных штаммов, разработке высокочувствительных и специфичных тест-систем.

Диссертационная работа Сорокина Е.В. по актуальности темы, новизне и практической значимости полученных результатов, объему выполненных исследований, степени внедрения в научно-исследовательскую практику отвечает требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г., № 842 (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Автор представленной диссертационной работы, Сорокин Е.В., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 – вирусология.

Заведующая лабораторией этиологии и эпидемиологии гриппа
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России
д.м.н. Бурцева Елена Ивановна
Москва 123098, ул. Гамалеи д.18
тел.8 499 190 3046
e-mail: elena-burtseva@yandex.ru

Подпись Бурцевой Е.И. заверяю. Ученый секретарь ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18 Тел. 193-71-71, e-mail: info@riem.ru)

к.б.н. Кожевникова Л.К.

