



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВАКЦИН И СЫВОРОТОК ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
(ФГБУ «НИИВС им. И.И.Мечникова» РАМН)

Российская Федерация
105064, г. Москва
М. Казенный пер., 5А

Телефон/факс: (495) 917-49-00
Телефон/факс: (495) 917-54-60
E-mail: mec.inst@mail.ru

на № _____ от _____ № _____

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 2014 ГГ.»**,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

Актуальность темы.

Грипп и другие острые респираторные вирусные инфекции остаются одной из самых актуальных медицинских и социально экономических проблем. Подробный антигенный и молекулярно-генетический анализ современных изолятов вирусов гриппа позволяет определять основные тенденции изменчивости вирусов гриппа, что чрезвычайно важно для прогнозирования будущих эпидемий, разработки противогриппозных вакцин и определения тактики лечения гриппа.

В 2009г. мы стали свидетелями первой в 21 веке пандемии гриппа, вызванной реассортантным вирусом гриппа подтипа А(Н1N1)pdm09, имеющим

происхождение от свиных, птичьих и человеческих вирусов гриппа. Несмотря на то, что пандемический штамм А(Н1N1)pdm09 практически вытеснил из циркуляции вирусы гриппа других типов и подтипов в эпидемический сезон 2009-2010 гг., уже в последовавшем за ним эпидемическом сезоне на территории РФ, как и в мире, наблюдалась социркуляция вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) и В. С момента своего появления в мае 2009 г. на территории России, вирусы А(Н1N1)pdm09 остаются важными этиологическими агентами ежегодных гриппозных эпидемий, регистрируемых на территории нашей страны. Исключение отмечено лишь для сезона 2011-2012 гг. В этой связи тщательный мониторинг за изменчивостью антигенных, биологических и молекулярно-биологических свойств циркулирующих вирусов А(Н1N1)pdm09 необходим для своевременного обнаружения дрейф-вариантов вирусов пандемического гриппа, и позволит оценить степень распространенности таких вариантов в вирусной популяции, и дать своевременные рекомендации по обновлению штаммового состава противогриппозных вакцин и диагностикумов.

Выраженная изменчивость вирусов гриппа затрудняет создание эффективных противогриппозных средств и делает прогнозирование гриппозных эпидемий труднопредсказуемым. Эти факторы обуславливают важность непрерывного этиологического мониторинга, изучения процессов эволюционной изменчивости возбудителей гриппозной инфекции, проводимых на базе Национальных центров по гриппу.

Выбранная диссертантом тема посвящена особенностям циркуляции вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, их антигенным, биологическим и молекулярно-биологическим свойствам. В связи с вышеизложенным выполненное Даниленко Д.М. исследование соответствует современной постановке задач, актуальность темы диссертации сомнений не вызывает, работа важна и с практической точки зрения.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. Для выполнения поставленных научных задач, диссертантом были использованы современные методы антигенного анализа, а также молекулярно-

биологические методы и методы компьютерного анализа. Полученные в ходе выполнения работы данные позволили оценить изменчивость вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, циркулировавших на территории России и сравнить эти данные с данными, предоставляемыми референс-центрами ВОЗ по гриппу. В ходе проведенных исследований было отмечено, что за исследуемый период в России наблюдалась циркуляция всех наиболее распространенных в мире генетических групп и подгрупп вирусов А(Н1N1)pdm09. Объем и тщательность проводимых экспериментов также подтверждают обоснованность полученных выводов.

Оценка новизны и достоверности исследования.

В диссертационной работе Даниленко Д.М. впервые проанализировано свыше 900 штаммов вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, изолированных на базе ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России и в 49 опорных базах Национального Центра по гриппу на территории России в период с 2009 по 2013 гг. Подробно описаны особенности выделения данного возбудителя на разных модельных системах, включающих в себя как традиционные (куриные эмбрионы, клетки MDCK), так и экспериментальные (клеточные линии CaCo-2, MDCK-Siat1) подходы. Особый интерес представляет раздел, в котором приведены особенности выделения вирусов А(Н1N1)pdm09 из секционных материалов.

Автором впервые проведено антигенное картирование российских изолятов 2009-2013 гг. выделения, позволяющее убедительно продемонстрировать антигенную однородность исследованных штаммов на протяжении всего периода исследования. Стоит отметить наглядность представленных карт, значительно упрощающих читателем восприятие данных антигенного анализа вирусных штаммов, полученных в традиционной реакции торможения гемагглютинации.

В работе проведено исследование биологических свойств вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в сравнении с широким спектром эпидемических вирусов гриппа человека прошлых лет, а также вирусами гриппа свиней и птиц. Представле-

ны данные по сравнительному изучению нейраминидазной активности широкого спектра вирусов гриппа птиц, свиней и человека.

Проведенный подробный анализ аминокислотного состава молекул поверхностных белков вируса гриппа HA и NA российских изолятов A(H1N1)pdm09 2009-2013 гг выделения позволил определить основные аминокислотные позиции, подверженные изменениям в ходе циркуляции вируса за пятилетний период. Особый интерес представляют данные о сайтах в молекулах HA и NA, находящиеся под действием позитивной селекции, позволяющие формулировать гипотезы о дальнейшей эволюции вирусов гриппа A(H1N1)pdm09.

Полученные автором экспериментальные результаты обработаны статистически, трактуются однозначно и не вызывают сомнений в их достоверности, изложены достаточно четко и логично.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 228 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (материалов и методов, результатов исследования), обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка литературы, списка иллюстративного материала и приложения. Работа иллюстрирована 29 таблицами и 30 рисунками. Библиографический перечень включает 234 источника, в том числе 20 на русском языке и 214 на иностранных языках соответственно. Из 234 приведенных в указателе источников, 94 опубликованы за последние 5 лет.

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

Обзор литературы занимает значительный объем диссертации – 52 страницы, и может быть условно поделен на три основных раздела. В первой части

ны данные по сравнительному изучению нейраминидазной активности широкого спектра вирусов гриппа птиц, свиней и человека.

Проведенный подробный анализ аминокислотного состава молекул поверхностных белков вируса гриппа HA и NA российских изолятов A(H1N1)pdm09 2009-2013 гг выделения позволил определить основные аминокислотные позиции, подверженные изменениям в ходе циркуляции вируса за пятилетний период. Особый интерес представляют данные о сайтах в молекулах HA и NA, находящиеся под действием позитивной селекции, позволяющие формулировать гипотезы о дальнейшей эволюции вирусов гриппа A(H1N1)pdm09.

Полученные автором экспериментальные результаты обработаны статистически, трактуются однозначно и не вызывают сомнений в их достоверности, изложены достаточно четко и логично.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 228 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (материалов и методов, результатов исследования), обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка литературы, списка иллюстративного материала и приложения. Работа иллюстрирована 29 таблицами и 30 рисунками. Библиографический перечень включает 234 источника, в том числе 20 на русском языке и 214 на иностранных языках соответственно. Из 234 приведенных в указателе источников, 94 опубликованы за последние 5 лет.

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

Обзор литературы занимает значительный объем диссертации – 52 страницы, и может быть условно поделен на три основных раздела. В первой части

приводится описание прошедших пандемий, подробно рассматриваются гипотезы о причинах возникновения и вымирания пандемических штаммов, включая пандемические события 2009 г. Вторая часть обзора посвящена анализу литературы, рассматривающей биологические свойства нового возбудителя A(H1N1)pdm09 в сравнении с уже охарактеризованными вирусами гриппа А человека и животных. Третий раздел посвящен эволюции вирусов гриппа A(H1N1) и пандемического гриппа A(H1N1)pdm09, в частности. В нем подробно охарактеризованы антигенные и молекулярно-биологические свойства вирусов A(H1N1), излагается имеющаяся в литературе информация о молекулярной эволюции поверхностных белков вирусов гриппа HA и NA. В этом разделе проведен подробный сравнительный анализ вирусов A(H1N1)pdm09 с циркулировавшими ранее вирусами A(H1N1), выявлены сходства и различия их биологических и молекулярно-биологических свойств.

Раздел собственных исследований традиционно начинается с описания материалов и методов, используемых при выполнении работы. Автором подробно приведены вирусологические, иммунологические и молекулярно-биологические методы, примененные в ходе выполнения работы.

Центральной частью работы являются полученные диссертантом собственные результаты исследования, которые можно разделить на четыре полноценных раздела. В первом разделе подробно изучены особенности выделения вирусов пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 как из клинических образцов, так и постмортальных материалов. Результатом этой работы стало выделение 559 вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 за пятилетний период. Автору удалось убедительно продемонстрировать, что при работе с секционными материалами, содержащими РНК вируса A(H1N1)pdm09 наиболее эффективное выделение происходит из фрагментов легких и трахеи. При этом, выделение вирусов из таких материалов эффективно лишь на системе куриных эмбрионов, в то время как использование различных клеточных моделей не дает положительных результатов.

Второй раздел собственных исследований посвящен биологическим свойствам вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 в сравнении с эпидемическими вирусами гриппа человека, вирусами гриппа свиней и птиц. В данной части работы приведены интересные данные о сравнительных особенностях репликации вирусов A(H1N1)pdm09 в клеточных линиях различного происхождения, показана их более низкая инфекционная активность по сравнению с эпидемическими вирусами гриппа человека и вирусами гриппа птиц. В то же время вирусы гриппа свиней демонстрировали схожую с вирусами A(H1N1)pdm09 тенденцию к репродукции в исследуемых культурах клеток. Подобная же зависимость была отмечена и при изучении индукции апоптоза вирусами гриппа A(H1N1)pdm09, A(H1N1), A(H3N2) и A(H5N1). Характеристика нейраминидазной активности широкого спектра современных штаммов A(H1N1)pdm09 в сравнении с другими вирусами гриппа птиц, животных и человека позволила продемонстрировать, что вирусы гриппа птиц подтипа A(H5N1), также как и вирусы гриппа птиц и человека A(H2N2) имели статистически более высокую активность NA, чем вирусы гриппа свиней и вирусы пандемического гриппа A(H1N1)pdm09.

Новаторской частью работы является применение метода антигенной картографии для анализа эволюционной изменчивости современных российских изолятов вируса гриппа A(H1N1)pdm09. Надо отметить, что до настоящего исследования этот метод применялся с использованием хорьковых антисывороток, однако автором проведены убедительные сравнительные исследования о возможности применения крысиных антисывороток взамен хорьковых. Антигенная карта, построенная для российских изолятов, отражает в графической форме результаты антигенного анализа вирусных штаммов, полученных в ходе реакции торможения гемагглютинирующей активности. Такой вариант представления результатов наглядно и убедительно демонстрирует антигенную однородность большинства выделенных и проанализированных за указанный период изолятов. Более того, карта дает возможность продемонстрировать ан-

тигенное родство вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 и вирусов гриппа свиней под-
типа A(H1N1).

Заключительным разделом собственных исследований является молекулярно-генетический анализ поверхностных белков вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных в 2009-2013 гг. и проанализированных в предыдущих главах диссертации.

Проведённый молекулярно-биологический и филогенетический анализ вирусов гриппа позволил установить основные аминокислотные позиции в HA и NA, в которых произошли изменения в ходе циркуляции вируса за пятилетний период. При этом, большинство мутаций в HA не были антигенно значимыми, хотя многие из них и были локализованы в известных антигенных сайтах. На основе анализа российских образцов в базе Genbank была подтверждена гипотеза о том, что вирусы, несущие замену в 222 положении HA, вызывали более тяжелое течение заболевания, с возможной последующей гибелью больного.

Анализ сайтов позитивной селекции в HA позволил подтвердить данные молекулярно-генетического анализа вирусов A(H1N1)pdm09, выделенных в России в период с 2009 по 2013 гг. В то же время при оценке сайтов в NA, находящихся под действием позитивной селекции, было показано, что давление отбора на NA обладает меньшей интенсивностью по сравнению с HA, что выразилось в меньшем количестве регистрируемых АК замен и сайтов, подверженных действию позитивной селекции.

Филогенетический анализ HA и NA позволил продемонстрировать, что в период с 2009 по 2013 гг. в России была зарегистрирована циркуляция всех наиболее распространенных в мире генетических групп и подгрупп вирусов A(H1N1)pdm09.

Практическая значимость работы.

В период с 2009 по 2013 гг. проводилась изоляция и идентификация вирусов гриппа, на основании которых была определена этиология эпидемий гриппа в России. В результате проведенных исследований было проанализиро-

вано свыше 900 штаммов вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09. Изучение антигенных и молекулярно-биологических свойств этих изолятов позволило установить, что абсолютное большинство вирусов данного подтипа, выделенных в России, были антигенно схожи с эталонным вирусом А/Калифорния/07/09. Эти данные были важны для оценки необходимости обновления штаммового состава гриппозных диагностикумов и вакцин.

Результаты работы использовались при проведении практических занятий по выделению и идентификации вирусов гриппа учебных курсов ВОЗ по повышению квалификации врачей-вирусологов в мае 2011 г. и ноябре 2013г.

В рамках сотрудничества с ВОЗ за пятилетний период передано 137 штаммов вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в референс-лаборатории (CDC&P, Атланта, Джорджия, США и NIMR, Лондон, Великобритания) с целью международного мониторинга за гриппом, 3 из которых были выбраны в качестве репрезентативных штаммов.

Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях, а также опубликованы в рецензируемых российских и международных журналах. Автореферат и опубликованные работы отражают основное содержание диссертации.

Замечания и вопросы. Автору диссертационной работы в целом удалось избежать серьезных погрешностей, а отдельные опечатки и неточности не носят принципиальный характер и не влияют на высокое качество проведенных исследований и хорошее восприятие работы.

Заключение.

В целом можно констатировать, что представленная Д.М. Даниленко диссертация является законченной научно-исследовательской работой, содержащей решение актуальной научной задачи- анализ эволюционной изменчивости

и биологических свойств вирусов пандемического гриппа, циркулировавших в России в период с 2009 по 2013 гг.

Диссертационная работа ДАНИЛЕНКО Дарьи Михайловны «АНАЛИЗ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВИРУСОВ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ГРИППА А(Н1N1)pdm09, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В РОССИИ В ПЕРИОД С 2009 ПО 2014 ГГ.» соответствует профилю 03.02.02, 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 Даниленко Дарья Михайловна заслуживает присуждения ей искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Академик РАН,
Профессор, д.б.н.

Зверев В.В.

Подпись В.В. Зверева заверяю
Ученый секретарь ФГБУ «НИИВС
им. И.И. Мечникова» РАМН, к.б.н.



Андропова Н.И.