

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, заведующей лабораторией этиологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации Бурцевой Елены Ивановны на диссертационную работу Ларионовой Натальи Валентиновны «Возбудитель гриппа: изменчивость в природе и эксперименте», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 – «вирусология»

Диссертационная работа Ларионовой Н.В. посвящена актуальной проблеме вирусологии - изучению механизмов эволюционной изменчивости вирусов гриппа А и В с целью совершенствования подходов и методов эффективной разработки живых гриппозных вакцин (ЖГВ). Работа является продолжением приоритетных исследований отечественных ученых А.А. Смородинцева и Г.И. Александровой, первыми предложившими метод подготовки холодоадаптированных (*ca*) штаммов путем пассажей вирусов гриппа в куриных эмбрионах при пониженной температуре, а также коллектива отдела вирусологии Института экспериментальной медицины (ФБГНУ «ИЭМ») во главе с проф. Л.Г. Руденко.

Современный вакцинный штамм в составе ЖГВ представляет собой реассортантный вирус, безвредность которого для людей обеспечивается внутренними белками, унаследованными от донора аттенуации (*att*) – холодоадаптированного, температурочувствительного (*ts*) лабораторного мутантного вируса, а эпидемическая актуальность – белками гемагглютинином (НА) и нейраминидазой (НА) от эпидемически актуального родителя (формула генома 6:2). В качестве доноров аттенуации в ЖГВ используют отечественные штаммы - А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (A17) и В/СССР/60/60 (B60). Стратегия получения реассортантов с вакцинной формулой генома разработана на использовании биологических различий *ts/ca* доноров аттенуации и эпидемических вирусов, не способных к репродукции при температурах за пределами оптимальных значений. Селекция реассортантов при пониженной до 25°C температуре приводит к преимущественному накоплению реассортантов с внутренними белками от

донора *att*, а встраивание белков HA и NA от эпидемического родителя обеспечивается присутствием в селективных пассажах и клонировании гипериммунной сыворотки против донора аттенуации.

С 1977 г. безопасность и эффективность ЖГВ была подтверждена многократными клиническими наблюдениями с участием 150 тыс. детей и 500 тыс. взрослых и в настоящее время вакцина рекомендована для профилактики гриппа для всех возрастных групп населения, начиная с 3-х летнего возраста.

Необходимо отметить, что при разработке ЖГВ американскими исследователями была выбрана стратегия отечественных исследователей на основе х.а. доноров – А/Энн Арбор/1/60 (H2N2) и В/Энн Арбор/1/66; вакцину начали применять с 2003г. с возрастными рекомендациями для здоровых детей и подростков 2-17 лет и взрослых 18-49 лет.

В последние годы получены новые молекулярно-генетические характеристики донора А17, свидетельствующие об определяющей роли мутантных генов белков полимеразного комплекса в его аттенуации (Klimov A. et al., 2000; Isakova-Sivak I. et al., 2011).

В тоже время, определены проблемы получения реассортантов для живой гриппозной вакцины, связанные с эволюционной изменчивостью вирусов гриппа. Отмечены факты циркуляции штаммов с нехарактерными для высоковирулентных вирусов признаками, у которых диапазон репродукции по температурочувствительности или/и холодоустойчивости приближен к лабораторно полученным донорам аттенуации; выявлено влияние признака чувствительности эпидемических штаммов к неспецифическим температуроустойчивым ингибиторам сыворотки крови на эффективность получения вакцинных реассортантов; появилась необходимость в создании коллекции кандидатных вакцинных вирусов гриппа с пандемическим потенциалом (вирусы гриппа птиц подтипа А/Н5, вирус гриппа свиней А/Н3v). Остается актуальным и вопрос разработки методов быстрого анализа состава генома новых вакцинных реассортантов вирусов гриппа А и В.

В связи с вышесказанным, проблема, предлагаемая к решению Натальей Валентиновной, является актуальной, о чем свидетельствует **цель исследования**: изучить изменчивость биологических свойств вирусов гриппа А и В в природе и эксперименте.

Для достижения цели были поставлены **задачи**, которые включали в себя изучение молекулярно–генетических механизмов направленной изменчивости фенотипических признаков вируса гриппа в эксперименте; закономерностей эволюционной изменчивости биологических признаков, а также анализ проблем подготовки вакцинных штаммов

(сезонных и с пандемическим потенциалом) для живой гриппозной вакцины, поиск путей их преодоления.

Диссертационная работа Ларионовой Н.В. состоит из введения, трех разделов, включающих, обзор литературы, материалы и методы, трех глав результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, указателя литературы. Работа изложена на 336 страницах машинописного текста; включает 89 таблиц, 23 рисунка и 3 приложения. Указатель литературы включает 548 источников, в том числе 130 – отечественных авторов.

В главе «Обзор литературы» достаточно подробно и интересно представлен анализ научных работ отечественных и зарубежных исследователей по структуре и репродукции вирусов гриппа; экологии и эволюционной изменчивости; разработке живых гриппозных вакцин в России; характеристике доноров аттенуации; безопасности и эффективности в разных возрастных группах по таким параметрам, как генетическая стабильность, высокая иммуногенная активность и длительность поствакцинального иммунитета, эффективность в отношении дрейф-вариантов, факторы неадаптивного иммунитета, формирование коллективного иммунитета, клинические преимущества и недостатки; результаты доклинических и клинических исследований штаммов ЖГВ к имеющим пандемический потенциал вирусам гриппа птиц подтипов А/Н5N1/ Н5N2/ Н7N3/ Н7N9/ Н2N2. Обзор заканчивается кратким заключением, определяющим актуальность проведения исследований, которые поставил диссертант для выполнения настоящей работы.

В главе «Материалы и методы» подробно представлены объекты исследований (широкий спектр эталонных и эпидемических штаммов вирусов гриппа А(Н1N1)/А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) и В, циркулировавших с 1933г. по настоящее время; Приложение В), методы (вирусологические, серологические, исследования на лабораторных животных (мыши, крысы, куры, хорьки), молекулярно-генетические, в том числе в модификации автора, изоляция вакцинных вирусов от привитых лиц при клинических исследованиях, статистической обработке полученных результатов).

Глава 5 посвящена изучению роли отдельных генов в аттенуации вирусов гриппа А и В. С этой целью была определена роль генов донора аттенуации А17 в формировании *ts* фенотипа реассортантных вирусов гриппа А, полученных на его основе, а также подтверждена стабильность *ts*-признака, сопряженного с его мутантными генами при их окружении генами различных эволюционно удаленных современных эпидемических вирусов. Анализ *ts* фенотипа реассортантов между донором аттенуации А17 и штаммами эпидемических вирусов гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2) показал обязательное участие белка РВ2 донора аттенуации в проявлении признака температурочувствительности, а также,

его комплексное взаимодействие с одним из белков полимеразного комплекса (PB1 или PA). Автор показала, что как установленная на одной паре скрещиваемых вирусов конstellация мутантных белков полимеразного комплекса донора PB2+PB1, так и мутантные белки в сочетании PB2+PA, способны обуславливать температурочувствительный фенотип реассортантов вируса гриппа А.

В главе представлены новые данные по изучению роли генов и мутаций донора В60, ответственных за его аттенуацию. Проведен анализ роли мутантных генов коллекции из 36 реассортантов вируса гриппа В обеих эволюционных линий и показано, что приобретение *ts* фенотипа связано с обязательным наследованием одного из мутантных генов полимеразного комплекса PB2 или PA от донора В60.

Независимо от количества и комплекса генов, унаследованных от донора В60 (формулы генома 7:1, 2:6, 3:5, 4:4, 5:3 и 6:2), для проявления *ca* фенотипа достаточно было присутствия в их составе гена PA. Результаты получены при анализе 35 реассортантов вируса гриппа В.

Интересные данные были получены автором в попытке поиска исходного вируса-предшественника донора аттенуации В60. Была установлена цепочка изменчивости фенотипических свойств лабораторных мутантных вирусов на пути от «дикого» до аттенуированного варианта: *non-ts/non-ca* → *ts/non-ca* → *ts/ca*.

Полученные результаты позволяют предположить, что молекулярные основы формирования *ts/ca* фенотипа реассортантных вакцинных вирусов гриппа А и В едины и определяются генами, кодирующими белки полимеразного комплекса.

Глава 6 посвящена изучению репродукции вирусов гриппа человека при разных температурах и ингибиторочувствительности, как факторов отражающих их эволюционную изменчивость. Ретроспективно был изучен фенотип 65 штаммов вируса гриппа А(Н1N1), 23 штаммов вируса гриппа А(Н2N2), 84 штаммов вируса гриппа А(Н3N2) и 62 штаммов вируса гриппа В (представителей двух эволюционных линий), выделенных в разные эпидемические, пандемические циклы и в периоды локальных вспышек. Автор предполагает, что появление новых пандемических штаммов, а также дрейф-вариантов вирусов гриппа А и В характеризуется термоустойчивостью возбудителей, с последующим ростом числа термочувствительных штаммов и их окончательным доминированием, что, в определенной степени, позволяет оценить их эпидемический потенциал и использовать при прогнозировании эволюционной изменчивости. Причем, существует определенная цикличность (волнообразность) проявления *ts* признака вирусов гриппа, и температурный диапазон их репродукции меняется в ходе естественного дрейфа. При этом изменчивость свойства

термочувствительности в популяции циркулирующих штаммов может опережать дрейфовую изменчивость.

В результате сравнения ингибиторочувствительности эпидемических штаммов вирусов гриппа (48 штаммов вируса гриппа А и 76 штаммов вируса гриппа В) выявлено, что все штаммы вируса гриппа А(Н1N1) были устойчивыми к термостабильным ингибиторам сыворотки крови лошади и морской свинки, штаммы вирусов гриппа А(Н2N2) и А(Н3N2) обладали вариабельностью по ингибиторочувствительности. Эволюция вируса гриппа В привела к разделению этих вирусов по признаку чувствительности к термостабильным сывороточным ингибиторам на две линии – В/Виктория-подобных и В/Ямагата-подобных.

Особый интерес вызвали результаты по комплексному участию гемагглютинина и нейраминидазы в проявлении штаммами вирусов гриппа ингибиторочувствительного фенотипа. Установлена причастность нейраминидазы к формированию чувствительности/устойчивости к сывороточным ингибиторам и низкая эффективность получения 6:2 реассортантов вируса гриппа на основе ингибиторочувствительных эпидемических вирусов гриппа. Наиболее высокий процент получения реассортантных штаммов ЖГВ с вакцинной формулой генома 6:2 и 5:3 достигался при скрещивании доноров аттенуации с «дикими» вирусами, устойчивыми к неспецифическим ингибиторам. Кроме того, было показано, что включение NA устойчивого к ингибиторам донора в состав ингибиторочувствительного эпидемического вируса вносит определенный вклад в снижение его ингибиторочувствительности. Автор делает заключение, что процесс подготовки ЖГВ выиграет от лучшего понимания генетических особенностей и механизмов неспецифической ингибитороустойчивости вирусов гриппа. Такие исследования должны продолжаться, чтобы установить механизмы этого явления.

Глава 7 посвящена вопросам подготовки и характеристики холодаадаптированных реассортантных штаммов для ЖГВ. С 1995г. автором было подготовлено, запатентовано и передано в производство 19 холодаадаптированных реассортантных вакцинных штаммов ЖГВ, включая вакцину к пандемическому А(Н1N1)pdm09 и сезонным вирусам гриппа. Разработаны экспериментальные вакцины к потенциально-пандемическим вирусам гриппа свиней А(Н3N2)v и высокопатогенным штаммам вируса гриппа птиц А(Н5N1), проведены их доклинические и клинические исследования. Представлены результаты разработки модификаций мультиплексной ПЦР для анализа состава генома различных реассортантных штаммов вируса гриппа типа А и В, что позволяет быстро и четко установить принадлежность генов одному из родительских вирусов. Все вакцинные штаммы обладали признаком высокой репродуктивности, размножаясь в РКЭ при

оптимальной температуре до 8,0-8,5 lg ЭИД₅₀/0,2 мл; признаком холодоустойчивости (*ca* маркер) в опытах на РКЭ; признаком температурочувствительности в опытах на РКЭ (*ts* маркер), были полностью нетоксичными для мышей при интраназальном введении массивных доз вируса. Прививочные свойства реассортантных штаммов соответствовали требованиям, предъявляемым к вакцинным вирусам на живую гриппозную вакцину для взрослых и для детей.

В главе представлены результаты подготовки реассортанта А/17/Калифорния/2009/38 на основе пандемического вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09 с формулой генома 6:2, изучения его свойств, доклинические и клинические исследования, которые позволили зарегистрировать вакцинный штамм в Российской Федерации. Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития выдано регистрационное удостоверение ЛСР-007988/09 Федеральному государственному унитарному предприятию «НПО «Микроген» МЗ РФ. Технология разработки вакцины получила лицензию ВОЗ для подготовки к пандемии в развивающихся странах.

Представлены данные по разработке вакцинного штамма на основе потенциально пандемического вируса гриппа свиней А/Индиана/10/11 (H3N2)v и его доклинические исследования.

Подготовлены реассортанты с формулой генома 7:1 на основе высокопатогенных вирусов гриппа птиц А/Н5: в скрещивании с донором аттенуации А17 использовали генно-инженерные штаммы на основе А/Н5N1/PR8-RG штаммы: VN-PR, INDO-PR, NIBRG-23 (Turkey-PR) на основе вирусов гриппа птиц Н5N1 А/Вьетнам/1203/2004, А/Индонезия/05/2005 и А/индюк/Турция/1/2005 соответственно. Проведены доклинические исследования (токсичности, безвредности, иммуногенности и протективной активности), изучена генетическая и фенотипическая стабильность ЖГВ против вируса гриппа птиц с пандемическим потенциалом для человека, результаты которых выявили соответствие требованиям «Фармакопейной статьи на вакцину гриппозную аллантоисную живую для интраназального применения для взрослых и для детей».

В главе представлены результаты подготовки реассортантов на основе эпидемически актуальных вирусов гриппа, различающихся по биологическим свойствам - природной холодоустойчивости, температурочувствительности, чувствительности к ингибиторам сыворотки крови. В качестве методических приемов автор предлагает индивидуально подбирать оптимальное соотношение инфекционной множественности родительских вирусов, рабочую концентрацию антисыворотки к донору, клонирование *ts* вируса с целью возможного выделения температуроустойчивого клона, подбор температуры

селективных пассажей в зависимости от биологических особенностей эпидемического компонента скрещивания.

Глава 8 «Обсуждение результатов» включает данные, полученные автором и другими исследователями по предметам исследований.

В разделе **«Заключение»** Ларионова Н.В. кратко представляет полученные данные, которые отражают результаты исследований, что соответствует поставленной цели и задачам. В этом разделе также приведены ссылки на научные публикации автора по каждому пункту заключения, которые в соответствии с требованиями ГОСТ Р 7.0.11-2011 к оформлению диссертаций необходимо представить в тексте диссертации.

В главе отражены основные **перспективы дальнейшей разработки темы и рекомендации**, в частности, планируется проведение анализа роли выявленных мутаций донора В/СССР/60/69 в аттенуации; исследование влияния аминокислотных замен в гемагглютинине, связанных с адаптацией к куриным эмбрионам, на рецепторные взаимодействия штаммов ЖГВ с клетками млекопитающих и индукцию иммунного ответа; выявление мутаций, связанных с природной температурочувствительностью изолятов; получение новых реассортантных штаммов для ЖГВ.

Теоретическое и практическое значение работы состоит в формировании представления о едином механизме аттенуации вирусов гриппа А и В, связанном с изменением температурного диапазона функционирования белков полимеразного комплекса, в установлении существования закономерностей эволюции вирусов гриппа А и В по признаку температурочувствительности репродукции, чувствительности к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови, выявлении комплексного участия гемагглютинина и нейраминидазы в проявлении свойства чувствительности/устойчивости к сывороточным ингибиторам, регистрации живой гриппозной вакцины на основе пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09 (в 2010г. присвоен диплом Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам в номинации «100 лучших изобретений»), депонировании в Государственную коллекцию вакцин ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Минздрава России и Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России реассортантных штаммов для живой гриппозной вакцины. Предложены методики, позволяющие эффективно готовить реассортанты на основе эпидемических штаммов с различными биологическими свойствами, в том числе, с пандемическим потенциалом. С 1995г. 19 штаммов, подготовленные с участием автора, были переданы во ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России для промышленного производства интраназальной живой гриппозной аттенуированной вакцины для взрослых

и для детей. В соответствии с договором о сотрудничестве с ВОЗ, переданы вакцинные штаммы для производства живой гриппозной вакцины в ряд развивающихся стран (Индия, Таиланд, Китай).

Новизна полученных результатов подтверждена 19 патентами на изобретение.

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

Необходимо отметить личный вклад Ларионовой Н.В., который прослеживается во всех разделах настоящей работы. По результатам диссертации опубликовано 49 статей в отечественных и зарубежных изданиях. Из них 30 - в журналах, рекомендованных ВАК, 14 – в зарубежных рецензируемых журналах. Получено 19 патентов РФ. Результаты работы были доложены на Российских и международных конференциях (45 раз).

В целом диссертация Ларионовой Н.В. выполнена на современном методическом уровне и является квалификационным трудом, результаты которого объясняют молекулярно-генетические механизмы аттенуации холодоадаптированных штаммов вирусов гриппа А и В, доноров для производства живых гриппозных вакцин, что способствует повышению эффективности подготовки вакцинных штаммов на основе актуальных эпидемических вирусов, обладающих различными фенотипическими свойствами.

При детальном ознакомлении с материалами диссертации возникли некоторые замечания и пожелания.

1. Название диссертационной работы, на мой взгляд, было бы лучше определить как «Вирус гриппа: изменчивость....», так как «Возбудитель гриппа: изменчивость...» больше относят к инфекционному процессу.

2. В главах собственных результатов есть элементы обсуждения и ссылок на литературу.

3. Некоторые из выводов представлены в «тезисном» формате.

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

Вопросы.

1. Хотелось бы узнать мнение автора, в чем различия холодоадаптированных доноров, используемых в нашей стране и США, и в чем причина низкой эффективности ЖГВ в США, что стало причиной принятия решения об отзыве рекомендаций по ее применению в последние годы.

2. Вы убедительно продемонстрировали, что за температурочувствительный фенотип доноров аттенуации для живых гриппозных вакцин и реассортантных штаммов на их основе ответственны гены, кодирующие белки полимеразного комплекса. Вы также проследили циклическую изменчивость температурочувствительности в эволюции вирусов гриппа. Не кажется ли Вам, что молекулярно-генетические основы температурочувствительности репродукции у полученных в лаборатории и естественно циркулирующих вирусов гриппа едины?

Заключение.

Диссертационная работа Ларионовой Натальи Валентиновны «Возбудитель гриппа: изменчивость в природе и эксперименте», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 – «вирусология» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной задачи здравоохранения – подготовки актуальных вакцинных штаммов для живой гриппозной вакцины. Работа имеет научно-практическое значение, направленное на снижение ущерба, наносимого ежегодными эпидемиями и риска формирования с последующим распространением вирусов гриппа с пандемическим потенциалом. Исследование представляет собой совокупность высококвалифицированных научных и практических разработок, которые являются новыми научными достижениями, способствующими пониманию и обоснованию эволюционной изменчивости вирусов гриппа с последующим применением полученных знаний для подготовки и практического применения реассортантов в составе живых гриппозных вакцин. Полученные результаты получили международное признание со стороны ВОЗ.

Диссертационная работа Ларионовой Н.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 докторским диссертациям, так как она решает научную проблему совершенствования подготовки и обновления штаммового состава живых гриппозных вакцин для взрослых и детей, а ее автор, Ларионова Наталья Валентиновна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 – «вирусология».

Руководитель лабораторией этиологии и эпидемиологии гриппа
Института вирусологии им. Д.И.Ивановского
ФГБУ "ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи" Минздрава России
доктор медицинских наук

Е. И. Бурцева

Адрес: ул. Гамалеи 18, 123098, Москва, Россия
Телефон: тел. (499) 190-3046
E-mail: elena-burtseva@yandex.ru

