

УТВЕРЖДАЮ

Вр.и.о директора Федерального  
государственного бюджетного научного  
учреждения «Научно-исследовательский  
институт фундаментальной и  
клинической иммунологии»

д.м.н., профессор

С.В.Сенников

«27» октября 2015 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертационной работы ПРОКОПЬЕВОЙ ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНЫ «Фенотипические и генотипические свойства пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 при адаптации к мышам различного генотипа», представленной к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 - вирусология

**Актуальность темы.** Адаптация вируса к новому хозяину часто используемый методический прием, позволяющий создать животную модель оценки эффективности средств профилактики и лечения. Основным моментом в процессе адаптации, как правило, является селекция вирионов, способных преодолеть иммунную защиту нового хозяина.

В следствие способности своего генома к постоянным изменениям вирус гриппа А (ВГА) ежегодно вызывает у человека сезонные эпидемии, характеризующиеся высоким уровнем заболеваемости и значительным уровнем смертности (показатель смертности в разных странах 0,01 – 0,2 %), особенно в случаях, осложнённых вирусной пневмонией или вторичной бактериальной инфекцией. Кроме того, периодически ВГА вызывает пандемии с соответствующим возрастанием количества заболеваемости и смертности, главным образом из-за отсутствия у популяции человека специфического иммунитета к новому варианту вируса.

Первая пандемическая инфекция XXI века была вызвана вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 в 2009 году и была зарегистрирована более чем в 214 странах, став результатом от 151,700 до 575,400 смертей по всему миру. Данный патоген был охарактеризован высокой степенью трансмиссии, однако его вирулентные и летальные свойства остаются сравнительно низкими. При этом известен ряд более тяжёлых и смертельных случаев инфицирования вирусом A(H1N1)pdm09, при которых отмечали симптомы заболевания, схожие с высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1, такие как пневмония и острый респираторный дистресс-синдром. Молекулярные механизмы, с помощью которых пандемический вирус гриппа 2009 года смог преодолеть межвидовой барьер от свиней к людям, затем адаптироваться в популяции человека и приобрести высоко контагиозные свойства, до сих пор остаются неизвестными. Одной из актуальнейших проблем современной вирусологии является изучение адаптации вируса гриппа как опаснейшего инфекционного заболевания к новым хозяевам, в том числе, к человеку. Понимание механизмов адаптации и эволюции ВГА к новым хозяевам позволит изучить процесс преодоления вирусом межвидового барьера и превращения в пандемический штамм. Изучение течения заболевания в лёгких экспериментальных животных позволяет лучше понять патогенез вирусной инфекции и механизм адаптации ВГА. Мышиная модель является наиболее распространенной для изучения механизмов вирусной адаптации и изменений вирулентности ранее непатогенных штаммов. Целесообразность изучения патологических процессов в лёгких, происходящих при адаптации ВГА к мышам, является адекватным методическим подходом, поскольку патологические изменения, возникающие в лёгких мышей, сходны с изменениями при вирусных пневмониях у человека. Кроме того, изучение молекулярно-генетических закономерностей адаптации ВГА к мышам позволяет подойти к решению актуальных фундаментальных проблем: определению генетических маркёров патогенности и механизмов их возникновения, изучению роли отдельных генов вируса в патогенезе инфекции, а также выявлению молекулярных основ преодоления межвидового барьера.



Вышеизложенные обстоятельства определяют актуальность и востребованность диссертационной работы Е.А. Прокопьевой в сфере вирусологии.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Диссертационная работа Е.А. Прокопьевой выполнялась на базе Федерального бюджетного учреждения науки государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор», в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины», а также на базе Новосибирского государственного университета и в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов Института цитологии и генетики СО РАН. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, полностью обоснованы объемом исследований и проанализированной литературы, полученными результатами и адекватны поставленным задачам исследования. По дизайну экспериментов, объектам исследования, набору использованных материалов и методов, значимости и востребованности, полученных результатов научно-классификационная работа Е.А. Прокопьевой «Фенотипические и генотипические свойства пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 при адаптации к мышам различного генотипа» полностью соответствует заявленной отрасли науки (специальность 03.02.02 - вирусология).

**Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** В рамках диссертационной работы Е.А. Прокопьевой были получены три адаптированных штамма пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 к мышам различных генотипов: линии BALB/c, линии C57Bl/6z и аутбредным мышам CD1. Показано усиление вирулентных свойств пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 при последовательном пассировании через лёгкие мышей, вне зависимости от генотипа животных. Показано, что пандемический вирус гриппа A(H1N1)pdm09 способен быстро адаптироваться к генетически

различным лабораторным мышам, вызывая летальность до 100% благодаря селекционному накоплению аминокислотных замен в геноме. Несомненным достоинством работы является детальное изучение данные о роли отдельных сегментов генома вируса гриппа в повышении вирулентности при адаптации в лёгких экспериментально инфицированных мышей. Особую ценность в работе придает сравнительный анализ первичной структуры всех белков пандемического ВГ неадаптированного варианта (штамм Tomsk/2010) и трех адаптированных вариантов (штамм MA-BALB/c, MA-C57BL/6z и MA-CD1) выявил 19 аминокислотных замен в шести белках (НА, NA, NP, NS2, PB2, PB1) и наличие потенциальной экспрессии факультативного неструктурного белка PB1-F2 у адаптированных вариантов вируса.

Положения, выносимые на защиту, и выводы научно-квалификационной работы Е.А. Прокопьевой подтверждены использованием комплекса современных вирусологических, молекулярно-биологических, серологических методов, а также применением светового и электронно-микроскопического методов анализа.

**Качество оформления диссертационного исследования.** Работа состоит из введения, основной части, включающей обзор литературы, описание материалов и методов, собственные исследования, обсуждения результатов, заключения и списка литературы, включающего 260 источников. Общий объём диссертации - 183 страницы. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 26 рисунками. Автореферат адекватно отражает суть работы, диссертация и автореферат оформлены в соответствии с требованиями, предъявляемыми к кандидатским диссертациям.

**Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научных изданиях.** Положения, выносимые на защиту, и выводы диссертационного исследования опубликованы в 17 работах, 3 из которых полнотекстовые статьи в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ, и 1 патент. Результаты работы доложены на конференциях международного и всероссийского уровня.



**Значимость для науки и практики результатов диссертации соискателя и возможность конкретных путей использования.** По совокупности полученных результатов диссертационная работа Е.А. Прокопьевой имеет фундаментальное значение для вирусологии и биологии в области исследований моделирования летальной гриппозной инфекции с целью изучения биологических свойств пандемического вируса гриппа типа А. Из прототипного штамма Tomsk/2010 были получены три адаптированных варианта к генетически различным мышам: МА-BALB/c - к мышам линии BALB/c, МА-C57BL/6z - к мышам линии C57Bl/6z, МА-CD1 - к аутбредным мышам CD1. Определены полные геномные последовательности всех вариантов пандемического ВГ A(H1N1)pdm09, а также изучены их вирулентные свойства и влияния на структуры внутренних органов (лёгкое, головной мозг, печень, почка и тонкая кишка). Из штаммов МА-BALB/c, МА-C57BL/6z и МА-CD1 создана панель пандемических штаммов ВГ A(H1N1)pdm09 с оценкой действия противовирусных химиопрепаратов.

Работа имеет и высокую практическую значимость для медицины, поскольку полученный в ходе выполнения работы адаптированный вариант вируса гриппа A(H1N1)pdm09 штамм МА-CD1 (A/Tomsk/273-MA3/2010(H1N1pdm09) использовали в доклиническом исследовании специфической противовирусной активности окисленных декстранов "Исследование профилактической эффективности окисленных декстранов с молекулярной массой 40 кДа (декстраналь 40, диальдегид декстран 40, ОД - 40) и 70 кДа (декстраналь 70, диальдегид декстран 70, ОД - 70) при интраназальном введении на модели гриппа у мышей", производимых в АО «ФНПЦ «Алтай» г. Бийск. С использованием адаптированного штамма МА-CD1 A(H1N1)pdm09 было показано, что окисленные декстраны снижают смертность экспериментального гриппа у мышей до 60% в зависимости от молекулярной массы окисленного декстрана.

**Рекомендации по использованию результатов и выводов, приведенных в диссертации.** Полученные в ходе данной работы

адаптированные варианты пандемического ВГА A(H1N1)pdm09 могут быть использованы в общей и медицинской вирусологии для моделирования летальной гриппозной инфекции с целью изучения биологических свойств пандемического ВГА. Сравнительный анализ первичной структуры белков адаптированных вариантов ВГА и исходных (диких) дают добротный материал для понимания процессов изменчивости ВГА.

Похвально, что некоторые результаты уже нашли применение, например в доклиническом исследовании специфической активности окисленных декстранов. "Исследование профилактической эффективности окисленных декстранов с молекулярной массой 40 кДа (декстраналь 40, диальдегид декстран 40, ОД - 40) и 70 кДа (декстраналь 70, диальдегид декстран 70, ОД - 70) при интраназальном введении на модели гриппа у мышей" было выполнено в АО "ФНПЦ "Алтай" г. Бийск.

**Положительные и отрицательные стороны работы.** Принципиальных замечаний к диссертации и автореферату нет. В целом работа производит хорошее впечатление самостоятельного и завершенного исследования.

**Заключение о соответствии диссертации требованиям Положения о присуждении ученых степеней.** Диссертационное исследование Прокопьевой Елены Александровны «Фенотипические и генотипические свойства пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 при адаптации к мышам различного генотипа», выполненное под руководством доктора биологических наук, профессора Шестопалова Александра Михайловича, является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, проведенной на высоком научно-методическом уровне, в которой получен фактический материал и содержится решение научной задачи - изучено изменение фено- и генотипических свойств пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 при адаптации к мышам различного генотипа, что имеет важное значение для вирусологии. Практическая значимость работы заключается в создании панели пандемических штаммов ВГ A(H1N1)pdm09 из адаптированных вариантов - MA-BALB/c, MA-C57BL/6z и MA-CD1 - с оценкой



действия противовирусных химиопрепаратов, а также в использовании штамма МА-CD1 в доклиническом исследовании специфической противовирусной активности окисленных декстранов.

Диссертационное исследование по актуальности, методическому уровню, значимости полученных результатов и выводов, количеству публикаций в рецензируемых научных изданиях соответствует требованиям пп. 9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842), а соискатель Прокопьева Елена Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 - вирусология.

Официальный отзыв обсужден одобрен на заседании ученого совета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (протокол № 9 от «27» октября 2015 года).

Ведущий научный сотрудник  
лаборатории регуляции иммунопоза  
НИИФКИ  
доктор биологических наук, профессор  
по специальности вирусология

А.А. Чепурнов

Подпись проф., д.б.н. А.А. Чепурнова заверяю,  
Ученый секретарь «НИИФКИ»  
Гаврилова Елена Давидовна, к.б.н.

27 октября 2015 года.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»  
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14,  
Рабочий телефон +7(383) 222-26-74  
e-mail: [niiki01@online.nsk.su](mailto:niiki01@online.nsk.su)