

УТВЕРЖДАЮ



Директор федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации
доктор медицинских наук, профессор

_____ Д.А. Лиознов

«27» мая 2025 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Файзулоева Евгения Бахтиеровича на тему: «Биологическое разнообразие и факторы вирулентности вирусов – возбудителей вакциноуправляемых инфекций», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология

Актуальность темы диссертационного исследования и ее связь с планами отраслевой науки

Диссертационная работа Файзулоева Е.Б. посвящена исследованию генетического разнообразия ротавирусов группы А и папилломавирусов и разработке научных основ создания живых аттенуированных вакцин против краснухи и COVID-19.

Одним из наиболее эффективных подходов к снижению заболеваемости и смертности от вирусных инфекций является вакцинопрофилактика. Ротавирусные и папилломавирусные заболевания характеризуются высокой клинической значимостью, убиквитарностью возбудителей, и в соответствии с рекомендацией ВОЗ относятся к приоритетным вакциноуправляемым инфекциям. Однако в российском национальном календаре иммунизации отсутствуют вакцины против данных инфекций. В то же время, клинически значимые ротавирусы и папилломавирусы отличаются широким

генетическим и антигенным разнообразием, что определяет необходимость проведения эпидемиологического мониторинга распространенности разных генотипов этих вирусов. В связи с этим, актуальность выполненных Файзуловым Е.Б. исследований по оценке генетического разнообразия ротавирусов группы А и папилломавирусов, циркулирующих на территории РФ, не вызывает сомнений.

Актуальной проблемой здравоохранения остается повышение эффективности вакцинопрофилактики COVID-19. Несмотря на окончание пандемии COVID-19 и сформировавшийся высокий уровень популяционного иммунитета против новой коронавирусной инфекции, сохраняется риск появления новых эпидемически значимых вариантов SARS-CoV-2, способных привести к подъему заболеваемости COVID-19. Кроме того, сохраняется вероятность передачи от животных человеку других SARS-CoV-подобных коронавирусов и возникновения новых эпидемий. Лабораторные прототипы живых аттенуированных вакцин против COVID-19 показали высокую эффективность исследованиях на животных моделях, однако их потенциал в профилактике заболевания остался нереализованным. В связи с этим, проведенные диссертантом исследования по получению аттенуированных мутантов SARS-CoV-2 и выявлению факторов, маркеров и детерминант аттенуации этого вируса также представляются весьма актуальными.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций

В ходе выполнения диссертационного исследования разработан новый подход к специфической ПЦР-амплификации сегментированного ротавирусного РНК-генома, что позволяет использовать полученные ампликоны для последующего нанопорового секвенирования. Установлены ключевые тенденции в изменении генетической структуры ротавирусов, циркулировавших на территории московского региона в период с 2009 по 2020 гг. Так, период с 2018 по 2020 гг. в московском регионе выявлена

циркуляция не встречавшегося ранее DS-1-подобного реассортантного PBA G3P[8]I2, имеющего высокий эпидемический потенциал. Выявлена циркуляция на территории московского региона всех четырех сезонных коронавирусов человека - HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-NKU1. В геноме аттенуированного мутанта штамма C-77 вируса краснухи выявлен набор мутаций, определяющих его аттенуационный фенотип. Получены не имеющие отечественных аналогов аттенуированные мутанты SARS-CoV-2, показавшие высокую иммуногенность и протективную активность в экспериментах по иммунизации золотистых сирийских хомячков.

Теоретическая и практическая значимость полученных автором результатов

На основе метода мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ автором разработаны экспериментальные тест-системы для дифференциального выявления широкого спектра респираторных и кишечных вирусов и генотипирования ротавирусов. Разработанные тест-системы представляют интерес для эпидемиологического мониторинга вирусных инфекций, а также при проведении клинических испытаний специфических противовирусных препаратов и вакцин. Разработанные технические решения защищены двумя патентами РФ, а на набор реагентов «ОРВИ-Монитор» получено регистрационное удостоверение.

Особый интерес представляет предложенный подход к генетической характеристике ротавирусов методом нанопорового секвенирования. Автором успешно решена проблема пробоподготовки сегментированного РНК-генома ротавирусов для последующего нанопорового секвенирования. Использование в исследовании штаммов ротавирусов, относящихся к разным эволюционным линиям, а также штаммов, предположительно имеющих происхождение от ротавирусов животных, показывает, что разработанный подход можно успешно использовать для характеристики новых ротавирусов, в том числе штаммов, появившихся в человеческой популяции

в результате межвидовой передачи. Созданный научный задел может быть использован для создания современной и высокопроизводительной тест-системы для эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции.

Полученные данные о генетической структуре ротавирусов и папилломавирусов, выявляемых на обследуемой территории, представляют ценность для разработчиков соответствующих вакцин, поскольку позволяют учесть в составе вакцины региональные особенности распространенности разных генотипов вируса. Кроме того, проведенные исследования позволили подтвердить важную роль ротавирусов животных в появлении патогенных для человека ротавирусов, имеющих эпидемический потенциал.

Автором получены изоляты SARS-CoV-2, относящиеся к разным эпидемически значимым вариантам вируса (Ухань-, Delta- и Omicron-подобные), адаптированы к выращиванию в культуре клеток, охарактеризованы полногеномным секвенированием. Полученные в результате лабораторные штаммы вируса представляют ценность для проведения вирусологических исследований, разработки диагностических тест-систем и моделирования новой коронавирусной инфекции *in vitro* и *in vivo*, что востребовано при оценке эффективности лечебно-профилактических препаратов.

Определены условия получения аттенуированных мутантов SARS-CoV-2, сохраняющих высокую иммуногенность и протективную активность для чувствительных к вирусу животных. Для полученных мутантов выявлен набор нуклеотидных и аминокислотных замен, детерминирующих их аттенуационный фенотип. Установлено, что в снижении вирулентности нового коронавируса важную роль сыграло как приобретение им температурочувствительного фенотипа, так и адаптация к новому хозяину. Определены условия выявления маркеров аттенуации упомянутых вирусов в условиях *in vitro*, что может быть использовано для контроля стабильности аттенуационного фенотипа вакцинных штаммов. Таким образом, разработаны методические подходы к получению аттенуированных штаммов

SARS-CoV-2, представляющих интерес для получения на их основе вакцинного штамма или донора аттенуации для создания живой аттенуированной вакцины против COVID-19. Выбор автором холодовой адаптации как стратегии аттенуации SARS-CoV-2 обоснован высокой эффективностью живых гриппозных вакцин, основанных на холодоадаптированных штаммах вируса гриппа. Живые гриппозные вакцины сочетают высокую протективную активность как при гомологичном, так и при гетерологичном заражении, простоту интраназального введения, формирование мукозального иммунитета во входных воротах инфекции, что ограничивает распространение возбудителя заболевания. Применение живых вакцин оправдано не только их высокой иммунологической эффективностью, но и экономической целесообразностью, поскольку они отличаются низкой себестоимостью производства.

Степень обоснованности и достоверности сформулированных в диссертации научных положений, выводов и рекомендаций

Выводы и положения, выносимые на защиту, аргументированы и отражают научную новизну и практическую значимость работы. Достоверность экспериментальных данных обеспечена использованием комплекса современных методов исследования и статистического анализа, использованием корректных контролей, воспроизводимостью результата в независимых экспериментах, критической оценкой полученных результатов при сравнении с данными современной научной литературы.

Материалы диссертационного исследования были доложены, обсуждены и рекомендованы к защите на заседаниях Ученого совета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» и Научной экспертной комиссии ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

По теме диссертационного исследования в журналах, индексируемых в международных базах Scopus, Springer, RSCI и рекомендованных ВАК

(Перечень ВАК), были опубликованы 33 научные статьи. Получено 2 патента РФ на изобретение. По материалам диссертации сделано более 30 докладов на российских и международных научных конференциях и конгрессах. В процессе выполнения диссертации в базе данных GenBank было депонировано 160 полных или частичных последовательностей геномов вирусов краснухи, ротавирусов группы А, коронавируса SARS-CoV-2.

Содержание диссертации и её оценка

Диссертация изложена на 305 страницах, построена по традиционному плану и состоит из следующих основных разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы, включающий 640 источников, в том числе 65 отечественных и 575 зарубежных. Работа содержит 61 рисунок, 46 таблиц и два приложения.

Первая глава представляет собой обзор литературы по основной теме работы, включающий описание современных подходов к генетической характеристике возбудителей приоритетных вакциноуправляемых вирусных инфекций - ротавирусов, папилломавирусов и SARS-CoV-2. В обзоре литературы рассмотрены также существующие подходы к аттенуации вирусов при конструировании живых аттенуированных вакцин против гриппа, краснухи и COVID-19. Изложение материала этого раздела помогает глубже познакомиться с проблемой.

Во второй главе представлена информация об использованных в работе материалах и методах исследования. В работе использован широкий спектр современных вирусологических, молекулярно-биологических, биоинформационных и иммунологических методов исследования. Набор методов адекватен поставленным задачам исследования.

В третьей главе, состоящей из трех подразделов, представлены полученные результаты и их обсуждение. В первом подразделе описана разработка и оптимизация методов исследования. В частности, описано создание тест-систем для качественного и количественного определения

нуклеиновых кислот использованных в диссертации вирусов и оптимизация методических подходов к генетической характеристике ротавирусов. Во втором подразделе изложены результаты исследования генетического разнообразия ротавирусов, папилломавирусов и сезонных коронавирусов человека, циркулирующих на территории России. Третий подраздел включает результаты исследований, направленных на получение аттенуированных мутантов вирусов краснухи и SARS-CoV-2, изучение их биологических свойств и иммуногенности.

Диссертационная работа Файзулоева Е.Б. выполнена в соответствии с основными направлениями современных научных исследований. Полученные результаты сопоставлены с данными, полученными другими авторами в аналогичных исследованиях.

В главе «Заключение» резюмированы и интерпретированы представленные в диссертации результаты, обсуждена их теоретическая и практическая значимость. Отдельно отмечено как выполненное исследование повлияло на выбор направления дальнейших исследований диссертанта.

Выводы составлены четко и логично вытекают из результатов диссертации. Автореферат диссертации адекватно отражает её основные положения. Апробацию результатов работы следует признать достаточной.

Из достоинств диссертации следует отметить глубокое понимание автором проблемы, хороший уровень владения литературным языком и очевидную орфографическую грамотность при изложении материала.

Хочется особо подчеркнуть результаты, представленные в разделе 3.3. посвященном разработке научных основ для создания живых аттенуированных вакцин против вирусных инфекций. Приятно отметить интерес автора к живым вакцинам. Пункты 3.3.2. и 3.3.3. данного раздела посвящены решению актуальной задачи, а именно разработке, получению и характеристике холодоадаптированных вирусов SARS-CoV-2. Результаты исследований подтверждают иммуногенность и протективную активность полученных штаммов в экспериментальной модели *in vivo*, что, по-видимому,

указывает на возможность создания на их основе кандидатных вакцинных препаратов.

Научная специальность, которой соответствует диссертация

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 6: Проблемы патогенности вирусов, цитопатологии инфицированных вирусом клеток и тканей, изучение патогенеза вирусных инфекций, путей проникновения вируса в организм и распространения вирусов в организме; 7: Изучение противовирусного иммунитета, иммунохимические исследования вирусных антигенов, изучение гуморального, клеточного иммунитета и иммунопатологических реакций; 10: Разработка мер предупреждения, диагностики и лечения вирусных заболеваний, совершенствование лабораторной диагностики, терапии, и иммунопрофилактики вирусных инфекций, проблемы санитарной вирусологии и 11: Противовирусные препараты. Интерфероны и индукторы интерферона: изучение механизма действия, получение и применение. Вирусные вакцины, в том числе живые (аттенуированные), инактивированные, субъединичные, рекомбинантные (реплицирующиеся и нереплицирующиеся), векторные и вакцины на основе вирусоподобных частиц – паспорта специальности.

Из недочетов работы следует указать следующие.

– В России при производстве живой аттенуированной вакцины против краснухи используется разработанный в США вакцинный штамм Wistar RA27/3, при этом заболеваемость краснухой в стране в последние годы неуклонно снижалась. В связи с этим актуальность проведенных диссертантом работ по получению отечественного аттенуированного штамма вируса краснухи представляется неочевидной.

– В диссертации на стр. 208-210 представлено сравнение геномных последовательностей штамма D SARS-CoV-2 и его холодоадаптированных мутантов D-D2 и D-B4 и выявлен набор нуклеотидных и аминокислотных замен, приобретённых в процессе холодовой адаптации. К сожалению, обсуждение выявленных мутаций проведено очень лаконично, при этом среди выявленных замен не установлены конкретные мутации, отвечающие за формирование аттенуационного фенотипа этих штаммов. В рамках изучения генетического разнообразия некоторых вирусов отсутствуют данные об их первичной последовательности, полученных с использованием современных методов высокопроизводительного секвенирования.

– В изложенном материале не хватает логической связки между частями выполненной работы. Результаты в разделах 3.1.1 и 3.1.2 представлены излишне подробно, в частности, описание создания тест-систем. Некоторые выводы носят частный характер, возможно, стоило их объединить, и добавить обобщение полученных результатов.

– Вопрос в рамках научной дискуссии. В разделе 3.1.1.1. детально описано получение тест-систем для дифференциального выявления нуклеиновых кислот 12 респираторных вирусов, включая грипп. При этом, далее в работе грипп не рассматривается в разделах, посвященных биоразнообразию и разработке вакцин. Интересно узнать мнение автора о разработке живых вакцин против гриппа, каким образом автор видит возможности создания универсальной противогриппозной вакцины.

Перечисленные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку работы.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные в работе результаты можно будет использовать для внедрения в практику эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции и при разработке отечественных вакцин против ротавирусных и

папилломавирусных заболеваний. Результаты проведенных исследований представляют собой важный научный задел для создания живой аттенуированной вакцины против COVID-19. В качестве развития темы представляется целесообразным исследовать возможность использования полученного *ts* мутанта SARS-CoV-2 в качестве штамма - донора аттенуации, по аналогии сезонными живыми гриппозными вакцинами.

Заключение

Диссертационная работа Файзулоева Евгения Бахтиеровича на тему: «Биологическое разнообразие и факторы вирулентности вирусов - возбудителей вакциноуправляемых инфекций», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных задач, имеющих существенное значение для вирусологии: разработаны экспериментальные тест-системы для этиологической диагностики острых респираторных и кишечных вирусных инфекций, а также генетической характеристики ротавирусов группы А; исследована распространенность на территории Российской Федерации разных геновариантов ротавирусов группы А, клинически значимых папилломавирусов и сезонных коронавирусов; разработаны методические подходы к получению аттенуированных мутантов вирусов краснухи и SARS-CoV-2, выявлены фенотипические маркеры аттенуации и определен набор мутаций, детерминирующих формирование аттенуационного фенотипа; показана высокая иммуногенность и протективная активность аттенуированных мутантов SARS-CoV-2 для модельных лабораторных животных – золотистых сирийских хомячков.

Диссертационная работа Файзулоева Е.Б. полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 в редакции постановления Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. № 748, от

29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. № 751, от 20.03.2021 г. №426, от 11.09.2021 г. №1539, от 26.09.2022 г. №1690, 26.01.2023 г. №101, 18.03.2023 г. №415, 26.10.2023 г. №1786, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 №1382), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Файзулов Евгений Бахтиерович, заслуживает присуждения ему ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Отзыв утвержден на заседании отдела вакцинологии и иммунотерапии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, протокол № 2 от 27.05.2025.

Отзыв составил:

Ведущий научный сотрудник лаборатории векторных вакцин,
отдела вакцинологии и иммунотерапии

ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»

Минздрава России, доктор биологических наук

e-mail: elena.varyushina@influenza.spb.ru

тел. +7 (906) 244-95-19

Варюшина Елена Анатольевна

«27» мая 2025 г.

Подпись д.б.н. Варюшиной Е.А. заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»

Минздрава России, кандидат медицинских наук



Лобова Тамара Геннадиевна

«27» мая 2025 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова 15/17, тел.: +7 (812) 499-15-00, <https://www.influenza.spb.ru/>