

ОТЗЫВ

официального оппонента члена-корреспондента РАН, профессора, доктора биологических наук Гребенниковой Татьяны Владимировны на диссертацию Файзулоева Евгения Бахтиеровича на тему: «Биологическое разнообразие и факторы вирулентности вирусов - возбудителей вакциноуправляемых инфекций», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология

Актуальность исследования

Ротавирусы и папилломавирусы, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, относятся к возбудителям приоритетных вакциноуправляемых инфекций. Опыт вакцинопрофилактики ротавирусного энтерита, папилломавирусных заболеваний и COVID-19 показывает, что вакцинация защищает человека от тяжелых форм данных заболеваний, но не всегда предотвращает распространения вируса. Одной из причин этого является широкое генетическое разнообразие возбудителей перечисленных заболеваний и тенденция к появлению новых антигенных вариантов вируса. Способность к периодическому появлению новых эпидемически значимых геновариантов ротавирусов и SARS-CoV-2 определяется высокой изменчивостью их РНК-генома, наличием природных резервуаров инфекции, возможностью межвидовой трансмиссии, а для ротавирусов еще и сегментированным вирусным геномом. Эффективность вакцин против данных заболеваний в большой степени определяется соответствием антигенных характеристик вакцины и циркулирующих штаммов вирусов. Это обуславливает необходимость мониторинга генетического и антигенного разнообразия возбудителей вакциноуправляемых вирусных инфекций. Выявление антигенных детерминант и маркеров вирулентности штаммов вирусов имеет важное научно-практическое значение для разработки иммунобиологических лекарственных препаратов.

Таким образом, диссертационная работа Файзулосева Евгения Бахтиеровича, направленная на оценку генетического разнообразия ротавирусов и папилломавирусов, циркулирующих на территории России, и на выявление маркеров аттенуации вирусов краснухи и SARS-CoV-2, безусловно, актуальна.

Соответствие темы диссертации указанной научной специальности

Научные положения и результаты представленной диссертации соответствуют паспорту специальности в пунктах 6, 7, 10 и 11 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

Основные результаты диссертации

В данной работе на основе молекулярно-биологических методов разработаны экспериментальные наборы реагентов для выявления 12 групп респираторных «ОРВИ-Монитор» и 11 групп кишечных вирусов «ОКИ Монитор» методом мультиплексной ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). Проведена международная интеркалибрация экспериментальных наборов реагентов на семи контрольных панелях зашифрованных образцов респираторных и кишечных вирусов QCMD (Великобритания). Результаты исследования образцов панелей совпали с данными QCMD на 87%.

Разработана мультиплексная ПЦР с детекцией в агарозном геле и последующим секвенированием фрагментов генов G и P ротавируса. Исследована распространенность разных G/P-генотипов ротавирусов и видовое разнообразие «сезонных» коронавирусов человека на территории московского региона в 2009-2020 гг. Генотипирование 170 образцов ротавируса А, выявленных в клинических образцах в период с 2009 по 2014 гг., показало доминирование генотипа G4P[8] (48,2%), частота выявления генотипов G1P[8], G2P[4], G3P[8], G9P[8] была значительно ниже (от 14,7% до 4,1%). Генотипирование 131 образца ротавируса А, выявленных в клинических образцах от детей с острым гастроэнтеритом в период с 2015 по 2020 гг., позволило установить G/P-генотип в 118 случаях (90,1%), в 7

случаях (5,3%) определить только вариант гена Р (Р[8]), в 6 случаях (4,6%) генотип установить не удалось. В период с 2015 по 2020 гг. РВА с генотипом G9P[8]I1 доминировали в общей структуре – 37%, второе место занимали G3P[8]I2 (новый DS-1-подобный геновариант) – 18%, далее - G4P[8]I1 – 15%, G2P[4]I2 – 11%, G1P[8]I1 – 5%, G3P[8]I1 – 2%. Также был обнаружен единичный случай смешанной инфекции (G9P[8]I1 и G2P[4]I2) и РВА с редким генотипом G4P[6]I1.

Исследована распространенность разных генотипов папилломавирусов высокого и низкого онкогенного риска на территории Российской Федерации. Генотипирование вирусов папилломы человека (ВПЧ) показало, что самые высокие ранговые значения по удельному весу занимают ВПЧ16 - 13,8% (13,0-14,5), ВПЧ6 - 10,6% (10,0-11,3), ВПЧ51 и ВПЧ44 - 6,8% (6,3-7,3), ВПЧ53 - 6,3% (5,8-6,8), доля которых в общей структуре составляет - 44,3%. Наименьшее количество случаев выявлено для типов ВПЧ59 и ВПЧ35 - по 2,4% соответственно, ВПЧ82 – 2,1 %, ВПЧ11 - 1,2%, ВПЧ26 - 0,3%. Полученные результаты представляют также интерес для разработчиков ВПЧ-вакцин, поскольку позволяют формулировать их состав с учетом региональных особенностей распространенности разных типов ВПЧ.

Исследовано видовое разнообразие сезонных коронавирусов человека на территории Московского региона до пандемии COVID-19 на клинических образцах из лабораторного музея. Установлено, что на территории Московского региона в период с 2009 по 2014 гг. циркулировали представители всех четырех известных на тот момент видов сезонных КВ человека – HCoV-NL63 (вид *Alphacoronavirus amsterdamense*), HCoV-229E (вид *Alphacoronavirus chicagoense*), HCoV OC43 (вид *Betacoronavirus gravedinis*) и HCoV-НКУ1 (вид *Betacoronavirus hongkongense*). Все выявленные случаи коронавирусной моноинфекции, сопровождавшиеся госпитализацией пациента, были связаны с инфицированием детей в возрасте от 1 до 5 лет HCoV-NL63 и HCoV-OC43.

Выявлены вероятные генетические и фенотипические маркеры аттенуации холодаадаптированного (*ca*, cold-adapted) мутанта штамма С-77 вируса краснухи.

Во фрагменте, кодирующем ORF неструктурных белков (ORF NSP), было обнаружено 8 нуклеотидных замен, 4 из которых ведут к замене аминокислоты. Во фрагменте, кодирующем ORF структурных белков (ORF SP), было обнаружено 5 нуклеотидных замен, 2 из которых оказались несинонимичные. Выявлено четыре уникальные аминокислотные замены.

Для штамма SARS-CoV-2 Dubrovka (D), филогенетически близкого к штамму Wuhan-Hu-1 получены холодоадаптированный вариант D-са и мутанты коронавируса D-B4 и D-D2, обладающие аттенуационным фенотипом, определены вероятные маркеры их аттенуации. Полученные мутанты охарактеризованы в опытах *in vivo*. Репродуктивная активность штаммов D-B4 и D-D2 в легких и головном мозге у золотистых хомячков была достоверно более низкой по сравнению со штаммом D. Инфекционная активность вируса в легких животных на 4 сутки после заражения мутантами D-B4 и D-D2 была на 1,2 lg ниже, чем в контрольной группе. Через 21 день после однократной интраназальной иммунизации золотистых хомячков штаммом D и мутантами D-B4 и D-D2 в сыворотках крови иммунизированных животных вырабатывались IgG к антигенам SARS-CoV-2 в титре 51200 ± 31353 , 8960 ± 3505 и 20480 ± 7011 , соответственно. Титр вируснейтрализующих антител (ВНА) в сыворотке крови иммунизированных штаммами D-B4 и D-D2 золотистых хомячков (титр ВНА 1012 ± 740 и 1408 ± 701) лишь незначительно уступал таковому в группе, зараженной родительским штаммом D (2304 ± 572). Активность вируснейтрализующих антител в сыворотках золотистых хомячков, иммунизированных штаммом D-D2, была снижена в 2,6 раза для варианта Delta (штамм Podolsk) и более чем в 60 раз для варианта Omicron по сравнению с гомологичным штаммом D. Для оценки протективной активности золотистых хомячков, иммунизированных штаммом D и мутантами D-B4 и D-D2, а также животных группы контроля через 21 после иммунизации заражали штаммом D в дозе 4,0 lg ТЦД₅₀/голову. У животных, иммунизированных штаммом D, стерильный иммунитет не сформировался - в легких животных данной группы на 4-

й день после иммунизации выявлена вирусная РНК и инфекционный вирус (в среднем $3,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$). В органах неиммунизированных животных вирусная РНК также определялась, причем наибольшее содержание вируса было обнаружено в легких – в среднем $5,6 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ и $7,8 \lg$ копий РНК/мл. Выраженность воспалительных изменений в легких иммунизированных хомячков на 4 сутки после иммунизации штаммом D была значительно ниже, чем в контрольной группе. Площадь очагов альвеолита у животных, иммунизированных штаммом D-B4, составила 15-20%, тогда как у иммунизированных штаммом D-D2 достигала 30%.

В другом эксперименте по иммунизации хомячков *ts* мутантом D-D2 степень патологических изменений в лёгких иммунизированных животных после заражения штаммом D выражали в баллах. У иммунизированных животных совокупный балл тяжести пневмонии составил в среднем 3,2 балла, в то время как у неиммунизированных животных 49,8, при максимально возможном количестве баллов 60. Таким образом, иммунизация золотистых хомячков штаммом D-D2 снижала совокупный балл тяжести при заражении родительским штаммом D в 15,7 раз. Таким образом, была проанализированы иммунологические и протективные свойства полученных мутантов.

Научная новизна исследования

Научная новизна исследований состоит в разработке экспериментальных наборов реагентов на основе мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ для дифференциального выявления широкого спектра возбудителей острых респираторных и кишечных вирусных инфекций, а также методики специфической ПЦР-амплификации сегментированного ротавирусного РНК-генома с последующим секвенированием генома ротавируса А методом нанопорового секвенирования. Получены приоритетные данные о циркуляции на территории РФ «сезонных» коронавирусов человека - Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63), Human coronavirus 229E (HCoV-229E), Human coronavirus OC43 (HCoV-OC43) и Human coronavirus HKU1 (HCoV-HKU1). В геноме аттенуированного мутанта штамма C-77 вируса краснухи выявлен

набор мутаций, возникших в процессе культивирования и адаптации вируса к новому хозяину и росту при пониженной температуре, определяющие его *sa* и аттенуационный фенотип. Получены аттенуированные *sa* мутанты Ухань-подобного штамма SARS-CoV-2 Dubrovka, исследованы маркерные мутации, охарактеризована их иммуногенность и протективная активность, и изучен набор мутаций, ответственных за проявление аттенуационного фенотипа.

Научная новизна исследований подтверждена двумя патентами Российской Федерации: № Патент № RU2506317 «Способ выявления кишечных вирусов в клинических образцах и воде методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени и перечень последовательностей для его осуществления», Патент № RU 2460803 С2 «Способ дифференциальной диагностики респираторных вирусных инфекций методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени и перечень последовательностей для его осуществления».

Теоретическая и практическая значимость работы.

Экспериментальные наборы реагентов на основе мультиплексной ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) для дифференциального выявления широкого спектра возбудителей острых респираторных и кишечных вирусных инфекций имеют важное научно-практическое значение для осуществления мониторинга данных заболеваний. На набор реагентов «ОРВИ-Монитор» получено регистрационное удостоверение Росздравнадзора. Генетическая характеристика ротавирусов методом нанопорового секвенирования является эффективным инструментом эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции.

Получены данные о генетической структуре циркулирующих в России клинически значимых ротавирусов и папилломавирусов, необходимые для разработки отечественных вакцин с учетом региональных особенностей.

Установлена важная этиологическая роль коронавирусов HCoV-OC43 и HCoV-NL63 в возникновении у детей в возрасте до 5 лет тяжелых респираторных заболеваний, требующих госпитализации.

На различных этапах пандемии в культуре клеток изолированы и охарактеризованы Ухань-, Delta- и Omicron-подобные штаммы SARS-CoV-2, представляющие интерес при разработке средств диагностики, специфической профилактики и лечения COVID-19.

Определены маркеры аттенуации вирусов краснухи и SARS-CoV-2, что поможет оптимизировать подходы для аттенуации данных вирусов.

В процессе выполнения диссертации было депонировано в базе данных GenBank 160 полных или частичных последовательностей геномов вирусов краснухи, ротавирусов и SARS-CoV-2.

Оценка содержания работы

Диссертация Файзулоева Е.Б. «Биологическое разнообразие и факторы вирулентности вирусов - возбудителей вакциноуправляемых инфекций» построена по традиционному плану, состоит из введения, описания материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, описания перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, двух приложений. Работа изложена на 305 страницах, содержит 61 рисунок, 46 таблиц, 640 источников литературы, включая 65 отечественных и 575 зарубежных источников.

Глава 1 «Обзор литературы» достаточно полно отражает современные представления о современных подходах к эпидемиологическому мониторингу инфекций, вызванных ротавирусами, папилломавирусами и SARS-CoV-2, с акцентом на современные молекулярно-биологические методы исследования. Отдельный раздел обзора литературы посвящен проблеме эволюции, биологического разнообразия и субвидовой характеристики SARS-CoV-2 в условиях пандемии. Рассмотрены традиционные и современные методические подходы к аттенуации респираторных вирусов при разработке живых аттенуированных вакцин на примере возбудителей гриппа, краснухи и COVID-19.

В главе 2 «Материалы и методы» дана характеристика клеточных линий различного происхождения, использованных в работе, лабораторных штаммов вирусов и панелей клинических образцов. Подробно описаны использованные в работе вирусологические (культивирование и титрование вирусов, реакция микронеutralизации, оценка фенотипических свойств вирусов *in vitro*, трансмиссивная электронная микроскопия), молекулярно-биологические (дизайн праймеров и зондов для ОТ-ПЦР-РВ, условия пробоподготовки, выявление и количественное определение вирусного генома в реакции ОТ-ПЦР-РВ, генотипирование, секвенирование вирусных геномов), иммунохимические (определение антител к вирусу методом ИФА), биоинформационные (филогенетический анализ вирусных геномов), гистологические (патоморфологическое исследование легких) и статистические методы, а также методы работы с животными (оценка иммуногенности, вирулентности и протективной активности SARS-CoV-2). Соискатель использует современные методы исследования, которые соответствуют поставленным задачам.

Результаты собственных исследований и их обсуждение представлены автором в главе 3, состоящей из трех разделов.

В первом разделе автор изложил результаты разработки методологии исследования, включая разработку лабораторных тест-систем для дифференциального выявления широкого спектра респираторных и кишечных вирусов, оптимизацию условий количественного определения вируса краснухи методом ОТ-ПЦР-РВ и конструирование тест-систем для генетической характеристики ротавирусов.

Во втором разделе описаны результаты исследования субвидового разнообразия ротавирусов, папилломавирусов и видового разнообразия «сезонных» коронавирусов человека, циркулировавших на территории Российской Федерации.

Третий подраздел посвящен разработке научных основ создания живых аттенуированных вакцин против краснухи и COVID-19, включая выявление

фенотипических и генетических маркеров аттенуации вирусов, получение и характеристику *sa* мутантов SARS-CoV-2 и оценку их вирулентности, иммуногенности и протективной активности на животной модели COVID-19.

Выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований, соответствуют поставленным задачам и положениям, выносимым на защиту

Обоснованность и достоверность полученных результатов

Достоверность экспериментальных данных обеспечена использованием обширного комплекса современных методов исследования (вирусологических, молекулярно-биологических, иммунохимических, гистологических) и статистического анализа, корректных положительных и отрицательных контролей, проверкой воспроизводимости результатов в независимых экспериментах, оценкой полученных результатов при сравнении с данными современной научной литературы.

Полученные результаты достоверны, выводы сформулированы в соответствии с полученными результатами, обоснованы и соответствуют поставленным задачам.

Результаты диссертационной работы Файзулова Е.Б. представлены в ведущих иностранных и отечественных журналах, а также на международных и всероссийских научных конференциях.

Так, по теме диссертационного исследования опубликованы 33 научных статьи в изданиях, рекомендованных ВАК для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук, а также индексируемых в международных базах Scopus, Springer, RSCI. Получено 2 патента на изобретение РФ. По материалам диссертации сделано более 30 докладов на российских и международных научных конференциях и конгрессах.

Материалы диссертации были доложены, обсуждены и рекомендованы к защите на заседаниях Ученого совета ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова и Научной экспертной комиссии ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»

(Институт полиомиелита).

Результаты работы могут быть рекомендованы к более широкому дальнейшему практическому применению. Так, разработанные методические подходы к генетической характеристике ротавирусов на основе метода нанопорового секвенирования могут быть рекомендованы для внедрения в практику эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции. Результаты оценки генетического разнообразия ротавирусов и папилломавирусов могут быть использованы при разработке соответствующих отечественных вакцин с учетом региональных особенностей антигенного разнообразия возбудителей. Результаты исследований по выявлению факторов, маркеров и детерминант аттенуации вирусов краснухи и SARS-CoV-2 представляют собой важный задел в разработке вакцин нового поколения против краснухи и COVID-19 с использованием методов обратной генетики.

Совокупность научных положений, выносимых на защиту, обоснована приведенным теоретическим и обширным экспериментальным материалом, который обуславливает и подтверждает достоверность положений, выносимых на защиту, и представленных выводов.

Рукопись диссертации и автореферат оформлены в соответствие с требованиями ГОСТ.

Автореферат диссертации изложен на 48 листах в полностью отражает содержание диссертации.

Принципиальных замечаний по диссертации Файзулова Евгения Бахтиеровича нет. В качестве замечания можно отметить отсутствие в первом выводе конкретных характеристик чувствительности и специфичности разработанных тест-систем, эти данные есть только в тексте диссертации.

Есть вопросы уточняющего характера, на которые хотелось бы получить ответы:

1. Автором разработаны экспериментальные наборы реагентов для выявления

12 групп респираторных и 11 групп кишечных вирусов методом мультиплексной ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). В каждом наборе используется по 4 реакционных смесей (вероятно для повышения аналитической чувствительности выявления каждого вируса). Как в будущем планируется использовать наборы реагентов – в представленном варианте или разбив на несколько тест-систем?

2. Есть ли план исследования безопасности полученных аттенуированных мутантов, такие как стабильность аттенуационного фенотипа и генотипа, как будут определяться условия и вероятность реверсии к вирулентному фенотипу?

3. В работе отмечено, что «Нейтрализующая активность сывороток хомячков, иммунизированных штаммом D-D2, была снижена в 2,6 раза для варианта Delta и более чем в 60 раз для варианта Omicron по сравнению с гомологичным штаммом D». Планируется ли дальнейшая корректировка свойств мутанта D-D2, чтобы обеспечить гетерологичную защиту?

Заключение

Диссертация Файзулова 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 законченной научно-квалификационной работой, в которой решены научные проблемы вирусологии: разработан комплекс методов и подходов определения генетического разнообразия возбудителей вакциноуправляемых вирусных заболеваний, получены аттенуированные штаммы вирусов, характеризующиеся высокой иммуногенностью. В диссертации изложены научно-обоснованные решения, направленные на оптимизацию методов эпидемиологического мониторинга вирусных инфекций и повышения эффективности профилактических вирусных вакцин, имеющие существенное значение для развития страны.

Работа Файзулова Евгения Бахтиеровича по своей актуальности, новизне научно-практической значимости соответствует требованиям, предъявляемым к

диссертациям на соискание ученой степени доктора наук согласно п. 9-14 «Положение о присуждении ученых степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 и последующих редакций (включая редакции постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016 г., № 748 от 02 августа 2016 г., № 650 от 29 мая 2017 г., № 1024 от 28 августа 2017 г., № 1168 от 01 октября 2018 г., № 751 от 26.05.2020 г., № 1690 от 26.09.2022 г., № 842 от 23.09.2023 г., № 415 от 18.03.2023, N 1786 от 26.10.2023, № 62 от 25.01.2024 и № 1382 от 16.10.2024), а соискатель Файзулов Е.Б. заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Официальный оппонент:

заместитель директора по научной работе

Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, руководитель испытательного центра, руководитель лаборатории молекулярной диагностики

ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» МЗ РФ,

член-корреспондент РАН, доктор биологических наук,

профессор (03.00.06. Вирусология)

e-mail: t_grebennikova@mail.ru

тел.: +7 (916) 505-18-75

Гребенникова Т.В.

Подпись чл.-корр. РАН, д.б.н., профессора Гребенниковой Т.В. заверяю:

Учёный секретарь ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» МЗ РФ

кандидат биологических наук



Сысолятина Е. В.

« 19 » Май 2025 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации Адрес: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, дом 18, Тел.: +7 (499) 193-30-01, E-mail: info@gamaleya.org