

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу 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 темы диссертационного исследования и ее связь с планами отраслевой науки

Вирусные инфекции занимают приоритетное место в структуре заболеваемости человека, как в целом, так и в отношении инфекционных заболеваний. Основным средством контроля вирусных инфекций является вакцинация. Этот способ позволяет как обеспечить защиту конкретного индивидуума, так и сформировать среди населения прослойку лиц, невосприимчивых к инфекции и препятствующую таким образом распространению вирусов в человеческой популяции.

Возбудители вирусных инфекций характеризуются огромным генетическим разнообразием, высокой степенью изменчивости, что ведет к появлению новых антигенных вариантов, а также дивергенцией в процессе эволюции под влиянием различных селективных факторов. Помимо высокой изменчивости (в первую очередь среди РНК-геномных вирусов), наличие природных резервуаров инфекции, возможность преодоления межвидового барьера, а в ряде случаев сегментированная природа вирусного генома обуславливают способность к периодическому появлению антигенно новых и эпидемически значимых вариантов вирусов. Яркими примерами являются вспышки и пандемии таких вирусов, как грипп H1N1 («испанка»), грипп H1N1pdm09 («свиной» грипп), коронавирусная инфекция, вызванная вирусами SARS-CoV, MERS и SARS-CoV-2, и др. Важно, что вследствие перечисленных особенностей элиминация таких клинически важных патогенов человека, как рота-, папиллома- и коронавирусы в ближайшее время

не представляется возможной. Это делает неспецифическую и специфическую профилактику, эпидемиологический мониторинг и совершенствование специфических вакцин исключительно актуальными задачами, хотя и в долгосрочной перспективе.

Целью диссертационной работы была оценка генетического разнообразия возбудителей приоритетных вакциноуправляемых вирусных инфекций и создание научной основы для оптимизации профилактических вирусных вакцин. В ходе работы были разработаны тест-системы для дифференциального выявления широкого спектра возбудителей острых респираторных и кишечных вирусных инфекций, а также методические подходы к генетической характеристике ротавирусов группы А человека. Были изучены распространенность разных генотипов и видовое разнообразие ротавирусов группы А, папилломавирусов и коронавирусов человека, циркулирующих на территории московского региона и РФ. Были получены холодоадаптированные мутанты коронавируса SARS-CoV-2 и выявлены вероятные генетические и фенотипические маркеры его аттенуации, а также аттенуации холодоадаптированного варианта штамма C-77 вируса краснухи. Наконец, с использованием животной модели COVID-19 была оценена вирулентность, иммуногенность и протективная активность холодоадаптированных мутантов коронавируса SARS-CoV-2.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций

В результате проведенных исследований разработана оригинальная методика амплификации сегментированного генома ротавирусов для последующего нанопорового полногеномного секвенирования. Экспериментально обоснована высокая эффективность предложенного подхода для генетической характеристики штаммов ротавирусов, относящихся к разным эволюционным линиям. Установлена ключевая роль ротавирусов группы А в структуре заболеваемости госпитализированных пациентов с

острым гастроэнтеритом, а также случаев внутрибольничного заражения детей в возрасте до 5 лет. Детально определена динамика генотипов ротавирусов группы А человека, циркулировавших в московском регионе в 2009 - 2020 гг. Примечательно, что в ходе реализации этого направления исследования была впервые выявлена циркуляция реассортантного ротавируса, широко распространившегося в мире в последние годы.

Также получены приоритетные данные о циркуляции на территории России всех известных сезонных коронавирусов человека - HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-HKU1. Установлено, что у детей в возрасте до 5 лет коронавирусы HCoV-OC43 и HCoV-NL63 могут являться причиной тяжелых респираторных заболеваний, требующих госпитализации.

В геноме аттенуированного мутанта штамма С-77 вируса краснухи идентифицирован набор мутаций, возникших в процессе адаптации вируса к клеткам Vero и росту при пониженной температуре. Среди них выявлено 4 уникальные аминокислотные замены - Y1042C и S1106T в домене протеазы открытой рамки считывания неструктурных белков и L27F и A564T в доменах рамки считывания С-белка и Е2-белка, соответственно, роль которых в аттенуации штамма С-77 представляется ключевой.

Получены не имеющие отечественных аналогов аттенуированные мутанты Ухань-подобного коронавируса человека SARS-CoV-2, штамм Dubrovka. С помощью набора вирусологических и молекулярно-биологических методов разработаны подходы к оценке генетической и фенотипической стабильности аттенуированных мутантов, основанные на идентификации мутаций, ответственных за проявление аттенуационного фенотипа, и выявлении *in vitro* наличия *ca/ts* фенотипа и способности заражать клетки легких человека. Показано, что в результате адаптации к выращиванию в культуре клеток Vero при пониженной до +23°C температуры вирус приобретает ряд несинонимичных мутаций в генах неструктурных (nsp3, nsp4, nsp5, nsp6, nsp9, nsp10, nsp12, nsp16) и структурных (S, E, M) белков, что

определяет его аттенуационный фенотип. На животной модели коронавирусной пневмонии установлена высокая иммуногенность и протективная активность холодаадаптированных вариантов SARS-CoV-2. Таким образом, разработаны научные основы аттенуации SARS-CoV-2 и получения кандидатных вакцинных штаммов для создания живой вакцины против COVID-19.

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

Достоверность экспериментальных данных обеспечена использованием обширного комплекса современных методов исследования и статистического анализа, корректных положительных и отрицательных контролей, проверкой воспроизводимости результата в независимых экспериментах, критической оценкой полученных результатов при сравнении с данными современной научной литературы.

По материалам диссертации сделано более 30 докладов на профильных российских и международных научных конференциях и конгрессах.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационного исследования опубликовано 35 научных работ, из них статей, опубликованных в Перечне рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук (Перечень ВАК), а также индексируемых в международных базах Scopus, Springer, RSCI - 33. Получено патентов на изобретение РФ – 2.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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), инаktivированные, субъединичные, рекомбинантные (реплицирующиеся и нереплицирующиеся), векторные и вакцины на основе вирусоподобных частиц – паспорта специальности.

Содержание диссертации и её оценка

Диссертационная работа построена по традиционному плану и включает введение, три главы основной части, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы и 2 приложения. Работа изложена на 305 страницах текста, содержит 61 рисунок, 46 таблиц и 640 русско- и англоязычных источников литературы.

Первая глава посвящена обзору данных литературы по основной теме работы на основании анализа научных публикаций. Автором проведен анализ развития классических методов вирусологии и их роль в открытии и детальном изучении вирусов разных групп, а также современные представления о разнообразии и эволюции SARS-CoV-2 в условиях природной циркуляции и пандемического распространения среди популяции человека. Автором достаточно полно проанализированы описанные на сегодняшний день методические подходы и генетические основы аттенуации респираторных вирусов при разработке живых аттенуированных вакцин.

Изложение материала помогает глубже познакомиться с проблемой и потому специальных комментариев не требует.

Во второй главе приводится описание использованных методик. Из приведенной информации следует, что в работе использован комплексный подход к проблеме. Так, в работе использована обширная панель референс-вирусов, различающихся по филогенетической принадлежности и штаммовому составу. В работе применены релевантные поставленным задачам вирусологические, цитологические, морфологические, морфометрические, молекулярно-биологические, биохимические, электронно-микроскопические и иммунологические методики. Результаты исследования подвергнуты адекватной статистической обработке. Полученные при помощи различных методических подходов результаты гармонично подтверждают и дополняют друг друга, что позволяет говорить о высокой достоверности основных результатов работы, выводов и положений диссертации.

В третьей главе описаны полученные в ходе исследования результаты. При этом первая часть главы посвящена разработке методологических подходов к проведению исследования: ПЦР-методики дифференциального выявления возбудителей респираторных и кишечных вирусных инфекций, оптимизации условий количественного определения вируса краснухи методом ПЦР в реальном времени, разработки тест-системы для генотипирования ротавирусов группы А человека методом мультиплексной ПЦР в реальном времени, а также нового подхода к генетической характеристике ротавирусов методом нанопорового секвенирования. Во второй части главы приведены результаты исследования видового и субвидового разнообразия возбудителей вирусных заболеваний человека, включая рота-, папиллома- и коронавирусы. Наконец, третья часть главы посвящена разработке научных основ создания живых аттенуированных вакцин против краснухи и COVID-19. Автором выявлены фенотипические и генетические маркеры аттенуации вируса краснухи, получены и охарактеризованы холодадаптированные мутанты

коронавируса человека SARS-CoV-2, начиная с изоляции вируса в культуре клеток, а также проведена оценка вирулентности, иммуногенности и протективной активности полученных холодадаптированных штаммов вируса на животной модели коронавирусной инфекции.

Выводы составлены четко и логично вытекают из материалов диссертации. Автореферат диссертации адекватно отражает её основные положения. Апробацию результатов работы следует признать достаточной: по материалам диссертационной работы опубликовано 33 статьи в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК, из которых 26 статей входят в международные базы данных Web of Science и/или Scopus. Основные результаты диссертационной работы представлены на многочисленных конференциях и симпозиумах в 2020–2023 гг.

К представленной работе есть ряд замечаний.

При представлении результатов гистологического исследования легких животных, зараженных коронавирусом (эксперименты по оценке протективного действия вакцинного штамма), для восприятия материала кажется более логичным сначала привести морфологическую картину легкого интактного животного, затем – животного контрольной группы, зараженного коронавирусом, и лишь затем – животных, зараженных вирусом и предварительно получивших вакцинные штаммы.

При представлении результатов изучения динамики массы тела животных в ходе экспериментальной коронавирусной пневмонии весовые показатели корректнее выражать не в абсолютных величинах (граммы), а в процентах от исходной массы тела в начале эксперимента.

В разделе «Методы целенаправленной модификации генома вируса гриппа» при перечислении видов вируса гриппа следует в дополнение к трем перечисленным упомянуть вирус гриппа D.

Перечисленные замечания носят технический характер, относятся к оформительским сторонам работы и ни в коей мере не умаляют научных и содержательных достоинств исследования.

Вопросы по диссертации.

С момента в человеческой популяции коронавируса SARS-CoV-2 несколько раз произошла смена генетического варианта вируса, от уханьского варианта до циркулирующего в настоящее время варианта Омикрон. Насколько, по мнению автора, аттенуированная живая вакцина на основе уханьского штамма будет обеспечивать защиту от современных вариантов вируса? Если антигенное сходство этих вариантов невелико, то в какие временные рамки, по мнению автора, может уложиться создание вакцинного штамма на основе эпидемически актуальных изолятов?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Файзулоева Евгения Бахтиеровича «Биологическое разнообразие и факторы вирулентности вирусов - возбудителей вакциноуправляемых инфекций» представляет собой самостоятельно выполненную и законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение актуальных задач, имеющих существенное значение для вирусологии: разработаны экспериментальные тест-системы для дифференциальной диагностики респираторных и кишечных вирусных заболеваний и подходы к генотипированию ротавирусов группы А; исследовано генетическое разнообразие циркулирующих на территории Российской Федерации геновариантов ротавирусов, папилломавирусов и сезонных коронавирусов человека; разработаны научные основы получения аттенуированных штаммов вирусов краснухи и SARS-CoV-2, обладающих высокой иммуногенностью для чувствительных лабораторных животных; установлены маркеры аттенуации этих вирусов. По актуальности, объему проведенных исследований, методическому уровню, научной ценности и практической значимости диссертация отвечает

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.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера,

доктор биологических наук

тел. (812) 644-6379

e-mail: zarubaev@pasteurorg.ru

Владимир Викторович Зарубаев

Подпись д.б.н. Зарубаева В.В. заверяю.

Ученый секретарь

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера,

кандидат медицинских наук



Трифонов Г.Ф.

« 16 » мая 2025 г.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, т. 8 (812) 644-63-17, e-mail: pasteur@pasteurorg.ru, <https://www.pasteurorg.ru/>