

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Курашовой Светланы Сергеевны «Оценка эффективности адъювантов различного происхождения, методов инактивирования вирусов и контроля специфической активности хантавирусных вакцинных препаратов», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.10 (03.02.02) – «Вирусология».

### **Актуальность темы диссертационного исследования**

В Российской Федерации геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) занимает ведущее место среди всех природно-очаговых заболеваний человека. ГЛПС – острое вирусное заболевание, вызываемое хантавирусами семейства *Bunyaviridae*. При ГЛПС поражаются мелкие сосуды всего организма и, кроме того, хантавирусы вызывают расстройства свёртывающей системы, нарушают кровообращение, работу почек, её выделительной функции, белковый обмен организма, вызывают выраженные кровотечения (геморрагический синдром), стойкое снижение артериального давления, вплоть до коллапса, одышку, вызванную острым респираторным дистресс-синдромом, при тяжёлом течении наблюдается длительный период выздоровления, проявляющийся астено-невротическими признаками, в зависимости от формы заболевания летальность от ГЛПС колеблется от 1% до 15%.

В бывшем СССР, первые случаи ГЛПС были зарегистрированы в 1934 г. на Дальнем Востоке. Однако, вопрос об этиологическом агенте новой инфекции решался больше 10-ти лет. Виновниками называли диплококки, риккетсии, бактерии рода *Leptospira* и даже связывали с недостатком витаминов. Интересно, что определение ГЛПС как вирусной болезни было предложено в 1944 г. выдающимся русским вирусологом Анатолием Александровичем Смородинцевым, и это – более чем за 30 лет до открытия хантавирусов у животных (1976) и человека (1978). А название ГЛПС было

предложено в 50-е годы 20-го столетия академиком Михаилом Петровичем Чумаковым.

Прошло более 80 лет, по данным Роспотребнадзора в РФ в 69 из 85 объектов зарегистрировано более 150 тыс. случаев ГЛПС, из которых 97% вызваны вирусом Пуумала, а 3% - вирусами Хантаан, Сеул, Амур и двумя подтипами Куркино и Сочи вируса Доброва/Белград. Кроме того, отсутствует тенденция к снижению заболеваемости, происходит расширение распространения инфекции, в ряде случаев растёт тяжесть клинического течения, а это – и общая инфекционная интоксикация, нарушение деятельности ЦНС, почечный синдром, ДВС-синдром, а в тяжёлых случаях разрывы почки, отёки мозга и лёгких.

До сих пор, отсутствуют специфические средства лечения и профилактики ГЛПС. В Российской Федерации несмотря на то, что работы по созданию профилактических препаратов ведутся, нет вакцин, разрешённых к применению, а только - вакцины на стадии прохождения доклинических испытаний. Отсутствие специфических средств лечения и профилактики ГЛПС свидетельствует об актуальности и медико-социальной значимости диссертации Курашовой С.С.

Таким образом, диссертационное исследование Курашовой Светланы Сергеевны, посвящённое оценке эффективности адьювантов различного происхождения, методов инаktivирования вирусов и контроля специфической активности хантавирусных вакцинных препаратов (ВП), следует признать актуальным и своевременным.

### **Научная новизна исследования**

Результатом выполнения диссертации Курашовой С.С. является полученные ею знания, затрагивающие научно-техническую проблему, исследуемую в рамках темы диссертации, включая возможность применения новых перспективных адьювантов различного происхождения, а также высокотехнологичных и безопасных способов инаktivирования хантавирусов, и методов контроля их специфической активности. Курашовой С.С. был разработан перспективный метод контроля специфической активности хантавирусных препаратов на основе ПЦР в реальном времени

(РВ), а также способ определения минимальной и рабочей иммунизирующих доз, для новых разрабатываемых вакцин по показателю соотношения числа копий вирусной РНК/мл и показателей формирования нейтрализующих антител на введение ВП мышам BALB/c.

Кроме того, Курашовой С.С. была проведена сравнительная оценка эффективности наиболее перспективных методов инактивирования хантавирусов по сравнению с классическими способами, используемыми в производстве целого ряда вирусных вакцин. А также, кроме оценки эффективности инактивации хантавирусов, было проведено исследование иммуностимулирующей эффективности адъювантов различного происхождения и определена зависимость стабильности иммуногенной активности экспериментальных вакцин, полученных как разными способами, так и уровень сохранения их стабильности в течение различных сроков хранения от 6-ти до 12-ти и 32-х месяцев.

Важный раздел в исследованиях Курашовой С.С., связан с оценкой иммуномодулирующего эффекта при введении адъювантов различного происхождения, а именно в качестве адъювантов было изучено действие сферических частиц (СФ) в концентрациях – 100, 150 и 300 мкг/мл, термолабильного энтеротоксина Б (в концентрациях – 0,2 и 7,5 мкг/мл) и липополисахарида (в концентрациях 50 мкг и 1 мг/мл) на содержание интерлейкинов крови ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-12 и ИФН- $\gamma$  с целью определения характеристик как силы иммунного ответа, так и для подтверждения их токсического эффекта для иммунизированных мышей BALB/c.

Автором диссертации было показано следующие, так анализ иммуностимулирующей и иммуномодулирующей эффективности адъювантов различного происхождения и оценка эффективности различных способов инактивирования хантавирусов подтвердили способность липополисахарида Ac3-s-LPS *Shigella sonnei*, рекомбинантного термолабильного энтеротоксичного белка В *Escherichia coli* и ремоделированных сферических частиц (СЧ) *Tobacco mosaic virus* повышать иммуногенную активность хантавирусных вакцин. Также, Курашовой С.С. было установлено, что ЛПС Ac3-S-LPS, помимо повышения

иммуногенности, повышает и стабильность ВП при хранении, и активирует как гуморальное, так и клеточное звено иммунитета, стимулируя индукцию ИЛ-12 и ИФН- $\gamma$ .

Курашова С.С. впервые установила способность бета-пропиолактона снижать агрегацию инактивированных вирусных частиц и фрагментов клеточных белков, что в свою очередь снижает концентрацию общего белка в вакцине и приводит к сокращению потерь вирусного компонента. Кроме того, она выявила прямую зависимость между количеством копий вирусной РНК в инактивированном бета-пропиолактоном вакцинном препарате (ВП) и его иммуногенной активностью.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Обоснованность и достоверность научных положений, результатов, выводов и рекомендаций диссертации Курашовой С.С. определяется большим объёмом проведённых исследований, применением современных вирусологических, молекулярно-биологических и иммунологических методов и технологий, использованием высоко технологичного оборудования и статистической обработкой, полученных материалов. Шесть выводов, которыми заканчивается диссертационная работа Курашовой С.С., аргументированы и полностью подтверждены полученными результатами.

### **Теоретическая и практическая значимость работа**

Установленная иммуностимулирующая способность адъювантов, таких как – низкоэндоотоксичный липополисахарид (Ac3-S-LPS) *Shigella sonnei*, рекомбинантный термолабильный энтеротоксичный белок Б (*Escherichia coli*) и ремоделированные сферические частицы вируса табачной мозаики, может быть использована для усовершенствования вирусных вакцин против других инфекций. Применение бета-пропиолактона для инактивации вакцинных штаммов хантавирусов и метода ПЦР в РВ – для контроля специфической активности может значительно повысить технологичность вакцин против ГЛПС при конструировании и освоении промышленного производства хантавирусных вакцин, имеющих важное медико-социальное значение.

## **Достоверность и апробация результатов исследования**

Результаты диссертационной работы представлены в журналах ВАК – 11, в системе РИНЦ опубликовано 25 работ, 14 из которых в виде тезисов, в WebofScience – 4 публикации, в системе Scopus – 7 публикаций. Всего опубликовано 39 печатных работ.

Материалы исследования были представлены и обсуждены на следующих конференциях: конференциях «Фундаментальная и прикладная микробиология» (Москва, 19.04.2017 г.), «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний» (Москва, 17-18.04.2018 г.), конгресс «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 1-3.04.2019 г.), на XI Международной конференции по хантавирусам (Лёвен, Бельгия, 1-4.09.2019 г.), всероссийской конференции «Актуальные проблемы эпидемиологии инфекционных и неинфекционных болезней» (Москва, 24-25.10.2019 г.).

Все выводы и практические рекомендации по диссертации логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и задачам диссертационной работы.

## **Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации**

Целью диссертационной работы Курашовой С.С. было решение ряда сложных и до сих пор нерешённых задач, касающихся выяснения ряда биотехнологических этапов получения вакцин против ГЛПС. Трудности получения вакцинных препаратов связаны с длительным сроком инаktivации вакцинных штаммов ГЛПС, затруднениями с очисткой вирусспецифического антигена, вследствие агломерации вирусных частиц и низкомолекулярных белков (следствие добавления формальдегида) и необходимости оптимизации методов оценки специфической активности на разных технологических этапах поиска наиболее перспективных адъювантов, с целью повышения иммуногенности и стабильности вакцин при хранении.

Диссертация С.С. Курашовой имеет традиционное построение, изложена на 162 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов, методов и четырёх глав собственных

исследований, заключения, где диссертант обсуждает полученные результаты, выводов и списка литературы, который содержит 284 источника на русском и английском языках. Работа содержит 13 таблиц и 21 рисунок. Материалы диссертационного исследования изложены чётко и последовательно. Все полученные в ходе выполнения работы результаты статистически обработаны.

В обзоре литературы автор квалифицировано и информативно представил теоретическое обоснование актуальности проделанной работы. Подробно изложены современные представления о структурно-функциональной организации вириона хантавирусов. Представлены современные сведения о патогенезе, иммуногенезе, клеточных и гуморальных факторах формирования противовирусного иммунитета у хантавирусов, материалы по цитокиновому ответу, клинических проявлениях и методах диагностики. Второй подраздел литературного обзора посвящён вопросам инактивации хантавирусов, а третий – адъювантам и их стимулирующим свойствам. Критический анализ, опубликованных работ, позволил автору обосновать актуальность выбранной темы, выделить ключевые задачи диссертации.

Качественность и достоверность научных результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, во многом определены использованием современных методов исследования, которые описаны в разделе «Материалы и методы». Использование вирусологических, молекулярно-биологических, серологических, иммунологических и статистических методов позволило автору в полной мере решить поставленные задачи.

Изложению полученных результатов посвящены 4 главы собственных исследований. В первой из них, даны экспериментальные материалы по разработке метода определения специфической активности вакцинных препаратов к ГЛПС методом ПЦР в реальном времени. Диссертантом разработан альтернативный метод определения специфической активности вакцин, основанный на соотношении содержания копий РНК и иммуногенной активности ВП, инактивированного бета-пропиолактоном.

Метод ПЦР-РВ показал высокую специфичность и чувствительность количественного определения вирусной РНК, а также возможность анализировать количество РНК каждого отдельного хантавируса в составе поливалентной вакцины.

В следующей главе собственных исследований представлены результаты сравнительной оценки методов инактивации хантавирусов. Автором рассмотрены 4 модели инактивации. Это – инактивация 0,0025% раствором формальдегида при разных температурах, инактивация бета-пропиолактоном в диапазоне от 0,0025% до 0,001%, инактивация УФ-излучением и инактивация перекисью водорода. Было показано, что все применённые инактиваторы инфекционности в разной степени повреждали вирусную РНК, а также была установлена зависимость количественного содержания РНК копий/мл вируса Пуумала в экспериментальных вакцинах, зависящая от способа их инактивирования. Также, Курашовой С.С. был изучен специфический иммунный ответ на введение вакцинных препаратов, инактивированных различными способами в РН и показана сохранность иммуногенности эпитопов в результате разных способов инактивации. Но различия в степени повреждения вирусной РНК позволили выбрать наиболее перспективный инактиватор – бета-пропиолактон, и кроме того, он на порядок снижал содержание балластных белков, за счёт уменьшения их агрегации, что приводило к более эффективной очистке вируса на этапах осветляющей фильтрации и гельфильтрации, а также снижало потери вирусного компонента при стерилизующей фильтрации вакцинного материала, тем самым повышая технологичность процесса производства вакцин против хантавирусов, вызывающих ГЛПС.

В следующей пятой главе собственных исследований, диссертантом была проведена сравнительная оценка иммуногенной активности экспериментальных хантавирусных препаратов, содержащих адьюванты различного происхождения. В качестве адьювантов Курашова С.С. использовала сферические частицы в концентрации 100, 150 и 300 мкг/мл, термолабильный энтеротоксин Б в концентрации 0,2 и 7,5 мкг/мл, липолисахарид (ЛПС) – 50 мкг/мл и классический вариант на модели

полуфабриката экспериментального вакцинного препарата (штамм Пуумала) с гидроксидом алюминия (1 мг/мл). В ответ на введение вакцинных препаратов, с адьювантом в исходном и разведённом 1:2, 1:4, 1:8 виде, определялись титры вируснейтрализующих антител. Наиболее высокое значение титров относительно положительного контроля (вакцина без адьюванта) были выявлены у мышей в группах СЧ/300, ТЛБ/0,2 и ЛПС, особенно с адьювантом ЛПС, где разведение в 8 раз не вызывало снижение иммуногенной активности вакцинного препарата. Исследование стабильности иммуногенной активности в течение 6, 12 и 32 месяцев показало, что препарат ВАК-ЛПС (низкоэндоотоксичный липолисахарид Ас3-S-LPS *Shigella sonnei*) не терял иммуногенной активности. Лиофилизация не влияла статистически значимо на этот показатель. Исследование иммуногенности поливалентных препаратов значимое преимущество имел ВП, где в качестве адьюванта использовался ЛПС, чем при иммунизации поли-ВАК и поли-ВАК-АЛ.

Последняя глава диссертации посвящена анализу цитокинового профиля. В ней с помощью ИФА определяли содержание интерлейкинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-12 и ИФН- $\gamma$  у мышей, иммунизированных моновакциной (штамм Пуумала) и поливалентной (штаммы Пуумала, Хантаан и Сочи) вакцинами с целью оценки иммуномодулирующего эффекта адьювантов после 2-х и 3-х иммунизаций мышей BALB/c. В результате этого наблюдения, Курашова С.С. установила, что использование вакцинного препарата, как без адьюванта, так и с адьювантом (гидроксид алюминия, ЛПС, и сферические частицы в дозе 100мкг/мл) не вызывает провоспалительных реакций у мышей BALB/c. Хотя использование ВП с адьювантом термолабильный энтеротоксин Б в дозе (ТЛБ/7,5) сопровождалось не только ростом провоспалительного цитокина ИЛ-1 $\beta$ , но и токсическими проявлениями в виде потери усов и частичного выпадения шерстного покрова.

Относительно ИФН- $\gamma$ , роль которого в формировании противовирусного иммунитета хорошо известна, это и активация макрофагов во врождённых и адаптивных иммунных реакциях. Диссертантом было показано, что только в группе ВАК-ЛПС уровень интерферона статистически



был выше, чем в других группах, причём в группах ВАК-АЛ и ВАК-ТЛБ/7,5 он был ниже, чем уровень цитокина ИФН- $\gamma$  в группе ВАК. Определение цитокина ИЛ-12, роль которого как ключевого для усиления клеточно-опосредованного иммунитета и инициации эффективной противоинфекционной защиты хорошо известна было показано, что только в группе ВАК-ЛПС его уровень был значительно выше, чем в других группах, а в группе ВАК-АЛ, он был самым низким. Хранение ВП, таких как ВАК, ВАК-ЛПС и ВАК-АЛ в течение 12 месяцев не приводило к значимому снижению как противовоспалительных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-1 $\beta$ , так ИФН- $\gamma$  (ключевого цитокина для усиления клеточного иммунитета).

В главе «ЗАКЛЮЧЕНИЕ» автор на высоком профессиональном уровне анализирует полученные результаты и обсуждает их в контексте с имеющимися литературными данными. Шесть выводов, которыми заканчивается работа, аргументированы и полностью подтверждены полученными результатами.

#### **Соответствие специальности**

Содержание диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности 1.5.10 (03.02.02) - «Вирусология». Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований: пунктам 2, 7, 10 паспорта специальности «вирусология».

#### **Вопросы:**

1. При выборе доз адьювантов, в случае термолабильного энтеротоксина Б использовали только 2 разведения - 0,2 и 7,5мкг/мл?
2. Анализ цитокинов ограничен ИЛ-12, ИЛ-1 $\beta$ , ИФН- $\gamma$ . Как определялся такой выбор?

#### **Заключение**

Диссертационная работа Курашовой Светланы Сергеевны на тему: «Оценка эффективности адьювантов различного происхождения, методов инактивирования вирусов и контроля специфической активности хантавирусных вакцинных препаратов», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.10 (03.02.02) – «Вирусология» является законченной научно-квалификационной работой по

актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований полностью соответствует требованиям, установленным в пп. 9 - 14 Положения «О порядке присуждения учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями в ред. Постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016, № 748 от 02.08.2016, № 650 от 29.05.2017, № 1024 от 28.08 2017, № 1168 от 01.10.2018), предъявляемым к кандидатским и докторским диссертациям, а ее автор - Курашова Светлана Сергеевна заслуживает присуждение искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.10 (03.02.02) - «Вирусология».

**Официальный оппонент:**

Заместитель заведующего отделом  
Вирусологии им. О.Г. Анджаридзе  
ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова»  
главный научный сотрудник  
лаборатории эпидемиологического анализа  
и мониторинга инфекционных заболеваний  
доктор биологических наук  
По специальности - 1.5.10 (03.02.02) - «Вирусология».

Юминова Надежда Васильевна

**Адрес:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Малый Казённый переулок, д.5а. Тел.+7(965) 675-42-51, e-mail:yuminova@mail.ru

Подпись Юминовой Надежды Васильевны удостоверяю,  
Зам. директора по науке ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова  
кандидат медицинских наук



О.В. Артемьева

«*В. Артемьева*» 2021 г.