

«Утверждаю»

Директор ФГБНУ «Научно-исследовательского  
института эпидемиологии и микробиологии  
имени Г.П. Сомова» Роспотребнадзора  
д.б.н., профессор

М.Ю. Щелканов



### ОТЗЫВ

ведущей организации ФГБНУ «Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Роспотребнадзора на диссертацию Курашовой Светланы Сергеевны «Оценка эффективности адьювантов различного происхождения, методов инактивирования вирусов и контроля специфической активности хантавирусных вакцинных препаратов», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по научной специальности 1. 5.10 (03.02.02) — «Вирусология».

#### Актуальность темы исследования

В структуре общероссийской заболеваемости природно-очаговыми инфекциями геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) занимает ведущее место и регистрируется на территории 69 субъектов, при этом, около 98% случаев ГЛПС приходится на Европейскую часть России. В то же время, несмотря на относительно невысокий уровень заболеваемости ГЛПС на Дальнем Востоке, течение болезни отличается превалированием тяжелых случаев с высокой летальностью, что связано с циркуляцией характерных для Восточной Азии хантавирусов Хантаан и Амур. Пейзаж патогенных возбудителей на территории РФ представляют 6 вирусов: Хантаан, Амур, Сеул, Пуумала и два геноварианта ортохантавируса Добрава/Белград (Куркино и Сочи), при этом около 97 % всей заболеваемости ГЛПС ассоциировано с вирусом Пуумала. Отсутствие тенденции к снижению заболеваемости ГЛПС, тяжесть клинического течения болезни, сопровождающейся длительным сроком нетрудоспособности, отсутствие специфических средств лечения свидетельствуют о высокой социальной и медицинской значимости создания эффективных вакцин для контроля этой инфекции. К настоящему времени отсутствуют лицензированные вакцины для профилактики ГЛПС. В процессе изготовления как экспериментальных и кандидатных отечественных, так и коммерческих зарубежных инактивированных хантавирусных вакцин были отмечены технологические сложности, обусловленные длительным сроком инактивирования вируса при обработке вирусосодержащего субстрата формальдегидом, затруднениями с очисткой

вируспецифического антигена, а также снижение иммуногенности вакцины при ее хранении.

В этой связи решение проблем, касающихся выяснения биотехнологических закономерностей, способствующих оптимизации технологии изготовления инактивированных хантавирусных вакцин, включая выбор адъювантов, способ инактивирования хантавирусов, а также разработку методов контроля специфической активности вакцинного препарата относятся к числу наиболее важных, что, в свою очередь, обуславливает актуальность темы исследований данной диссертационной работы.

### **Научная новизна результатов исследования**

Впервые проведен анализ иммуностимулирующей и иммуномодулирующей эффективности 4-х адъювантов различного происхождения в составе экспериментальных хантавирусных вакцинных препаратов. Установлена способность 3-х адъювантов (липополисахарид Ac3-S-LPS *Shigella sonnei*, рекомбинантный термолабильный энтеротоксичный белок В *Escherichia coli* и ремоделированные сферические частицы Tobacco mosaic virus) повышать иммуногенную активность хантавирусных вакцинных препаратов.

Показано, что липополисахарид Ac3-S-LPS, обладает наиболее высокой по сравнению с другими исследованными адъювантами иммуностимулирующей эффективностью, активизирует как гуморальное, так и клеточное звено иммунитета, стимулируя индукцию цитокинов ИЛ-12 и ИФН- $\gamma$ , а также способствует повышению стабильности вакцинных препаратов при хранении.

Впервые дана оценка эффективности различных методов инактивирования хантавирусов и впервые установлено свойство  $\beta$ -пропиолактона снижать агрегацию инактивированных вирусных частиц и фрагментов клеточных белков, что приводит к снижению концентрации общего белка в вакцинном препарате и сокращению потерь вирусного компонента.

Впервые установлена прямая зависимость между содержанием количества копий вирусной РНК в инактивированном  $\beta$ -пропиолактоном вакцинном препарате и его иммуногенной активностью, что позволяет определять иммуногенную дозу вакцины по числу копий вирусной РНК/мл.

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

Обоснованность представленных в диссертационной работе данных обусловлена применением автором различных методических подходов с использованием комплекса современных лабораторных методов исследования, включая вирусологические, иммунологические и молекулярно-генетические. Проанализированный объем научного исследования как в качественном, так и в количественном отношении адекватен поставленным в диссертации задачам. Рисунки и таблицы диссертации в полной мере отражают количественные характеристики выборок и статистическую обработку данных, что соответствует современным принципам статистики. Автором проведен сравнительный анализ собственных данных с результатами мировой литературы. Положения, выносимые на защиту, доказаны результатами. Выводы четко соответствуют поставленным задачам и отражают их решение.

### **Достоверность и апробация результатов исследования**

Достоверность результатов диссертационной работы С.С. Курашовой не вызывает сомнений и обеспечивается применением современных методов иммунологического, иммунохимического и молекулярно-генетического анализа, достаточным числом исследований, длительным сроком наблюдений, комплексным подходом к проведению исследований, выполненным с использованием современных методов и статистической обработкой полученных результатов. Представленные в работе результаты получены на достаточной выборке и проанализированы с использованием современных программ и методов статистической оценки данных.

Основные положения диссертации были представлены и обсуждены на пяти научных конференциях, включая 2 международных. По теме диссертации опубликовано 39 печатных работ, из них в журналах ВАК - 11 публикаций, в системе РИНЦ - 25 публикаций (14 из них – тезисы), в системе Scopus - 7 публикаций, в системе Web of Science - 4 публикации, тезисы, опубликованные за рубежом – 5, тезисы, опубликованные в сборниках российских конференций – 18.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Впервые получены данные, устанавливающие адъювантный эффект трех соединений различной природы (низкоэндогенный липополисахарид Ac3-S-LPS *Shigella sonnei*, рекомбинантный термолабильный энтеротоксичный белок В *Escherichia coli* и ремоделированные сферические частицы Tobacco mosaic virus) в составе хантавирусных вакцин, что может быть использовано для усовершенствования вакцинных препаратов против возбудителей других вирусных инфекций.

Разработан альтернативный метод оценки специфической активности хантавирусных вакцинных препаратов по количественному содержанию вирусной РНК. Установлена корреляция между числом копий РНК/мл в инактивированном вакцинном препарате и уровнем иммунного ответа, что позволяет определять иммуногенную дозу вакцины по числу копий вирусной РНК/мл.

Установлено преимущество применения  $\beta$ -пропиолактона в качестве инактиватора инфекционности хантавирусов по сравнению с формальдегидом, перекисью водорода и ультрафиолетовыми лучами.

Показано, что низкоэндоотоксичный липополисахарид Ac3-S-LPS *Shigella sonnei* в составе вакцинных препаратов усиливает выработку нейтрализующих антител и цитокинов ИЛ-12, ИФН- $\gamma$ , позволяет снизить нагрузку вирусного компонента в вакцинном препарате, не индуцирует выработку провоспалительного цитокина ИЛ-1 $\beta$  и стабилизирует иммуногенную активность при хранении готового препарата при температуре  $6\pm 2$  °С.

На основании экспериментальных исследований на модели мышей BALB/c рекомендована двукратная вакцинация с применением третьей в качестве бустерной через месяц, полгода или год, в зависимости от длительности поствакцинального иммунного ответа.

### **Структура и содержание диссертационной работы**

Диссертационная работа изложена на 162 страницах текста компьютерной верстки, включая 21 рисунок и 13 таблиц. Рукопись диссертации построена по традиционному плану, оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми ВАК к кандидатским диссертациям и состоит из следующих разделов: введения, основной части, состоящей из обзора литературы (глава 1), материалов и методов (глава 2), результатов собственных исследований (главы 3, 4, 5, 6), заключения, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы, содержащего 284 источника.

Во введении диссертант раскрывает актуальность темы, ее научную новизну, теоретическую и практическую значимость. Сформулированы цель и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту. В «Обзоре литературы», представлен логически выстроенный анализ источников литературы по теме исследования. В первом разделе этой главы дана общая характеристика хантавирусов и хантавирусных лихорадок, включая вопросы иммунопатогенеза заболеваний, ассоциированных с хантавирусами, и особенностей иммунного ответа на инфекцию. Приводится информация, касающаяся разработки хантавирусных вакцинных препаратов и поствакцинального иммунного ответа. Во втором разделе описываются известные методы

инактивирования различных вирусов, возможные механизмы воздействия инактиваторов. Третий раздел литературного обзора посвящен описанию адьювантов различных классов, их иммуномодулирующих характеристик. Обзор литературы написан хорошим языком, автор демонстрирует глубокие знания состояния изучаемых проблем. В главе «Материалы и методы» подробно изложены использованные в работе вирусологические, иммунологические и молекулярно-генетические методы, представлен дизайн исследований. Основные результаты, определяющие содержание исследования, представлены в 3, 4, 5 и 6 главах. Глава 3 посвящена разработке контроля специфической активности вакцинных препаратов методом ПЦР в реальном времени. В 4 главе представлены данные, по сравнительной оценке, эффективности методов инактивирования хантавирусов на модели вируса Пуумала. Глава 5 посвящена сравнительной оценке иммуногенной активности экспериментальных хантавирусных вакцинных препаратов, содержащих адьюванты различного происхождения. В главе 6 представлен анализ иммуномодулирующего эффекта адьювантов по содержанию цитокинов в сыворотках крови мышей BALB/c. В заключительном разделе диссертационной работы автор обобщает и обсуждает результаты исследования с привлечением литературных данных. Результаты диссертационного исследования сформулированы в 6 выводах, которые полностью соответствуют цели и задачам исследования. Работа выполнена на высоком методическом уровне и представляет собой завершённое научное исследование. Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Выбор эффективного адьюванта, обладающего иммуностимулирующим и стабилизирующим эффектом в составе хантавирусных вакцин, разработка оптимальных условий применения  $\beta$ -пропиолактона для инактивирования вакцинных штаммов хантавирусов, а также разработка метода ПЦР в реальном времени для контроля специфической активности вакцинных препаратов позволяют значительно повысить технологичность изготовления вакцин против ГЛПС.

Все методические подходы в соответствии с полученными результатами могут быть использованы при конструировании и освоении промышленного производства хантавирусных вакцин.

#### **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».

Заведующая лабораторией, главный научный сотрудник  
лаборатории природно-очаговых инфекций  
ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии  
имени Г.П. Сомова» Роспотребнадзора  
д.м.н., профессор

  
Г.Н. Леонова

Подпись Галины Николаевны Леоновой заверяю:  
Зав. Отдела кадров ФГБНУ  
«НИИЭМ им.Г.П. Сомова» Роспотребнадзора



  
Е.М. Плотникова  
17.08.2017

Почтовый адрес: 690087, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1  
Адрес официального сайта в сети Интернет: <http://www.niiem-vlad.ru/>  
Адрес электронной почты: [niiem\\_somov@mail.ru](mailto:niiem_somov@mail.ru)  
Контактный телефон: приемная директора: (432) 244-14-38