

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента на диссертацию Сергеева Артемия Александровича  
«Модельные биосистемы для оценки защитной эффективности препаратов от оспы  
обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) у человека», представленную на соискание ученой  
степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.02 – вирусология**

**Актуальность проблемы.** В настоящее время интерес к возбудителям особо опасных инфекций, вызванных вирусом оспы обезьян и гриппа птиц А/Н5N1, продолжает сохраняться в связи со следующими обстоятельствами:

- с высокой патогенностью вирусов гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 и оспы обезьян (ВОО) для человека (летальность среди людей достигает 60 и 17 %, соответственно);
- с низким иммунитетом или его отсутствием у людей к гриппу птиц (А/Н5N1) и оспе обезьян: вакцинация от первого заболевания не проводится, а от натуральной оспы, которая защищает и от оспы обезьян, была прекращена более 30 лет тому назад;
- с продолжающимися эпидемическими вспышками гриппа птиц (А/Н5N1) и оспы обезьян;
- с отсутствием исчерпывающей информации о резервуарах ВОО и высокопатогенного (в/пат) ВГП А/Н5N1 в природе;
- с существующей возможностью распространения ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1 по всему миру и выраженной генетической изменчивостью особенно последнего, которая в любой момент может существенно увеличить контагиозность вызываемого им заболевания среди людей, приведя к пандемии.

Для успешного проведения противоэпидемических мероприятий, направленных на борьбу с оспой обезьян и гриппом птиц (А/Н5N1), необходимы высокоэффективные средства медицинской защиты. В настоящее время отсутствуют или ограничен спектр разрешенных к применению эффективных лечебно-профилактических химиопрепаратов против оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1), а также вакцин против последнего. При этом испытания протективных свойств данных средств на начальных этапах (научно-исследовательская работа и доклинические исследования) должны проводиться в экспериментах *in vivo* на модельных биосистемах, включающих в себя актуальные вирулентные для людей штаммы ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1, а также доступные виды животных, воспроизводящие соответствующий инфекционный процесс у человека. Регулярное появление новых штаммов этих вирусов во время вспышек заболеваний среди людей и животных делает актуальной проблему совершенствования таких модельных биосистем.



**Степень разработанности.** К началу данного исследования были известны модельные биосистемы для оспы обезьян на основе шести видов животных (иммунодефицитных мышей, сусликов, чернохвостых луговых собачек, сонь Келлена и низших приматов), которые имеют те или иные существенные недостатки с точки зрения возможности их выращивания в неволе, дороговизны, удобства и адекватности их применения при моделировании оспы обезьян у людей. Из числа мелких лабораторных животных, удобных для оценки эффективности разрабатываемых для человека препаратов против гриппа птиц (A/H5N1), чаще всего использовали инбредных мышей (BALB/c), а также вирусные штаммы, которые не являются актуальными для России, так как они были выделены на территории зарубежных стран.

Все это свидетельствует о чрезвычайной актуальности и несомненной значимости проблемы разработки модельных биосистем для оценки защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (A/H5N1) у человека, в рамках которой выполнялось диссертационное исследование Сергеева А.А.

**Научная новизна диссертационного исследования.** На основании всей совокупности установленных в исследовании новых фактов, их многостороннего анализа, глубокой переработки и теоретического обобщения Сергеевым А.А. разработано целостное представление о механизмах патогенеза оспы обезьян у аутбредных мышей популяции ICR и степных сурков, а также гриппа птиц (A/H5N1) у аутбредных мышей популяции ICR. Результаты этих исследований продемонстрировали сходство патогенеза этих инфекций у исследованных животных с таковым у человека.

**Теоретическая и практическая значимость** диссертационной работы высокая. С использованием разработанных модельных биосистем «аутбредная мышь популяции ICR - ц/афр штамм V79-1-005 ВОО» и «степной сурок - ц/афр штамм V79-1-005 ВОО» были успешно проведены доклинические испытания российского противооспенного препарата НИОХ-14, что открывает перспективу его дальнейшего изучения в клинических исследованиях. Эксперименты с другой разработанной модельной биосистемой «аутбредная мышь популяции ICR - российский штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП A/H5N1» продемонстрировали высокую эффективность противогриппозного российского препарата Реаферон-ЕС-липид®<sup>®</sup>, что открывает перспективу его возможного применения при профилактике и лечении людей, инфицированных в/пат ВГП (A/H5N1).

Разработана методология поиска модельных видов животных для вирусных инфекций, основанная на изучении показателей взаимоотношения подопытных животных с патогеном в сравнении с таковыми у людей (известных модельных видов животных), учитывающих не только воспроизведение клинических признаков заболевания, но и других



стадий инфекционного процесса, в том числе начальных. Данная методология, может быть использована при поиске модельных видов животных не только для оспы обезьян и гриппа птиц (A/H5N1) с целью оценки защитной эффективности препаратов, но и для других инфекций вирусной природы, и уже применялась для создания модельных биосистем («морская свинка – адаптированный к ней штамм GPA вируса вакцинии» и «аутбредная мышь популяции ICR - российский штамм A/Salekhard/01/2009 ВГ A/H1N1pdm») с целью изучения протективной активности различных препаратов.

Методология прогнозного определения величины 50 %-й инфицирующей дозы ( $ID_{50}$ ) вируса, основанная на использовании первичных клеточных культур человека и животных, продемонстрировала при ее применении адекватность результатов таковым, полученным в прямых экспериментах на животных. В связи с этим данная методология может быть взята для оценки чувствительности того или иного макроорганизма к исследуемым вирусным патогенам. Теоретические и прогнозные величины  $ID_{50}$  вируса натуральной оспы, ВОО и в/пат ВГП A/H5N1 для людей, определенные на основе экспериментов (*in vitro*), могут быть полезными при поиске новых модельных биосистем не только для оценки защитной эффективности препаратов от соответствующих инфекций, но и для изучения показателей их контагиозности, патогенеза и происходящих эпидемических процессов.

В настоящее время в организациях, проводящих работы с возбудителями особо опасных инфекций, используется разработанная при участии автора методология приготовления фрагментов органов и тканей от животных инфицированных этими патогенами для проведения патоморфологического изучения (МУ 1.3.3103-13 Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека – Роспотребнадзор), которая при исследовании на остаточную инфекционность обеспечивала гарантированную инактивацию жизнеспособного ВОО в этих биоматериалах.

С применением мышей и сурков для оценки защитной эффективности химиопрепаратов от оспы обезьян были разработаны соответствующие методические рекомендации (МР 4.2.001-16 и МР 4.2.002-16) Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). С учетом исследований, проведенных в процессе разработки модельных биосистем «аутбредная мышь популяции ICR – ц/афр штамм V79-1-005 ВОО» и «степной сурок - ц/афр штамм V79-1-005 ВОО», а также их испытаний, были определены пределы их практического применения. При работе с сурками, мышами, первичными культурами клеток животных и человека с использованием ВОО были применены методы, описанные в разработанной инструкции № 1/02 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.



Некоторые материалы данной диссертационной работы, касающиеся гриппа птиц (А/Н5N1), нашли практическое применение в рамках изданных Роспотребнадзором временных методических указаний. С применением мышей для оценки защитной эффективности препаратов от гриппа птиц (А/Н5N1) были разработаны соответствующие методические рекомендации (МР 4.2.004-16 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). С учетом исследований, проведенных в процессе разработки модельной биосистемы «аутбредная мышь популяции ICR – российский штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1», и ее испытаний были определены пределы ее практического применения.

**Методология и методы исследования.** С целью поиска модельных видов животных для оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) в работе применяли методологию, основанную на оценке ряда показателей взаимоотношения подопытных животных с возбудителями этих заболеваний при заражении через респираторный тракт в сравнении с таковыми у человека (известных видов модельных животных).

Для проведения оценки чувствительности первичных клеток-мишеней людей и подопытных животных к патогенным ортопоксвирусам и в/пат ВГП А/Н5N1 применяли ранее разработанный при участии автора подход по приготовлению этих клеток и проведению экспериментов *in vitro*. В ряде случаев была взята методология прогнозной оценки величин ID<sub>50</sub> ВОО, ВНО и в/пат ВГП А/Н5N1 для животных и людей, основанная на использовании в экспериментах *in vitro* их первичных клеток-мишеней для этих патогенов (первичные клетки-мишени для ВНО - макрофаги и эпителиоциты респираторных органов). В работе также были применены традиционные вирусологические, серологические, гистологические, электронно-микроскопические, молекулярно-генетические, аэрозольные и статистические методы исследований.

**Степень достоверности.** Все результаты исследований обработаны с использованием стандартных статистических методов и с помощью пакета компьютерных программ «Statistica 6.0» (StatSoft Inc. 1984-2001) с оценкой достоверности отличий на 5 %-м уровне значимости.

Всё выше изложенное свидетельствует о высоком профессиональном и методическом уровне исследования. Большой объем экспериментального материала, применение многопланового подхода и использование современных информативных методов анализа при исследовании патогенеза оспы обезьян и гриппа птиц А/Н5N1 у модельных видов животных и теоретическое обобщение полученных данных позволили автору сформулировать основные научные положения и выводы диссертационной работы, объективность и высокая степень достоверности которых не вызывают сомнений.



Диссертационная работа Сергеева А.А. оформлена в соответствии Национальным стандартом РФ (ГОСТ Р 7.0.11-2011) имеет общепринятую структуру и состоит из введения, в котором обосновывается **актуальность** темы исследования и степень ее разработанности, формулируются **цель** и **задачи** работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, 3 глав, в которых представлены результаты собственных исследований и их обсуждения, заключения с выводами, списка литературы, включающего 464 работы из них 59 отечественных. Диссертация очень хорошо оформлена, написана понятным литературным языком. Текст проиллюстрирован наглядными рисунками и фотографиями, в том числе цветными. Содержание диссертации характеризуется четким, последовательным изложением, текст работы имеет большое число рисунков (46) высокого качества, количественные данные представлены в многочисленных таблицах (39). Выводы логически следуют из полученных данных. Результаты исследования достаточно полно апробированы, докладывались на 19 международных научных форумах и конференциях, проходивших с 2007 по 2015 г.

По материалам диссертации опубликовано 20 научных статей, в отечественных журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований, 8 статей в зарубежных рецензируемых журналах, в том числе с высоким импакт-фактором (более 3), 2 монографии и получено 7 патентов РФ на изобретение.

Все это позволяет высоко оценить диссертационное исследование Сергеева А.А. Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы нет, **есть лишь замечание, касающиеся оформления работы:**

- для более легкого восприятия большого объема информации, приведенной в выводах диссертации, лучше было бы их сгруппировать по результатам, полученным по каждому виду модельной биосистемы.

Однако отмеченный недостаток не снижает общего очень хорошего впечатления от работы. Основной материал работы достаточно полно представлен в автореферате, а выводы диссертации соответствуют выводам, приведённым в автореферате.

### **Заключение**


Докторская диссертация Сергеева Артемия Александровича «Модельные биосистемы для оценки защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) у человека», выполненная при научной консультации д.б.н. Шишкиной Ларисы Николаевны, является законченной научной квалификационной работой, в которой на основании

выполненных автором исследований изложены новые научно обоснованные технические, технологические или иные решения, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие страны, связанный с созданием новых модельных биосистем перспективных для оценки защитной эффективности разрабатываемых препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) у человека.

Диссертационная работа по актуальности изучаемой проблемы, степени научной новизны, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте публикаций материалов в научных печатных изданиях соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к докторским диссертациям, критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842) с изменениями постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а автор, без сомнения, заслуживает искомой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

**Официальный оппонент:**

Зав. лабораторией генной инженерии  
ФГБНУ «НИИ биохимии» (Россия, 630117  
г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2),  
доктор биологических наук, профессор  
эл. почта: [beklem@niibch.ru](mailto:beklem@niibch.ru)



А.Б. Беклемишев

Личную подпись А.Б. Беклемишева заверяю  
Начальник ОК ФГБУ НИИ биохимии

Н.И. Логинова

М.П.

15.11.2016 г.

