

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу

Титовой Ксении Александровны «Лабораторные модели на основе мышей для оценки защитной эффективности препаратов от натуральной оспы», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. – вирусология

Актуальность проблемы. Натуральная оспа во всём мире побеждена более полувека назад. Однако в последние десятилетия отмечается увеличение частоты эпидемических вспышек других ортопоксвирусных инфекций: оспы коров и оспы обезьян. Существует также и вероятность возникновения вспышек натуральной оспы вследствие потепления климата и связанного с этим таяния грунтов вечной мерзлоты и высвобождения ВНО из останков людей, погибших от натуральной оспы, и заражения им контактирующих лиц: археологи, геологи. Определённую опасность представляют и преднамеренные и случайные утечки ВНО из мест хранения, а также организаций, занимающихся незаконной разработкой биологического оружия. И хотя существуют эффективные противооспенные вакцины, но требуется время для их ускоренного массового производства в случае возникновения эпидемии и создания иммунитета, так как более половины населения Земли не вакцинированы против ВНО.

В то же время по сей день существует только один официально разрешенный (с середины 2018 г.) к применению (и то только в США) химиопрепарат (Tescovirimat на основе ST-246) для защиты людей от ортопоксвирусных инфекций (натуральной оспы). Одним из препятствий быстрому прогрессу в создании медицинских средств защиты от натуральной оспы является отсутствие лабораторных моделей для массового скрининга препаратов по противооспенной активности в экспериментах с использованием вируса натуральной оспы (ВНО) и животных. В связи с этим диссертационная работа Титовой К.А., посвящённая разработке таких моделей и исследованию возможности их использования для оценки эффективности разрабатываемых медицинских средств защиты от натуральной оспы, является, несомненно, актуальным исследованием.

Степень разработанности. Основываясь на подходе, связанным с поиском лабораторных моделей, воспроизводящих внешнюю клиническую картину натуральной оспы, до настоящего времени для оценки эффективности исследуемых препаратов от этого заболевания подобрана лишь одна такая модельная система на основе штамма Harper ВНО (с неизвестной величиной вирулентности для человека) и *Macaques (M.) cynomolgus*. Однако данный модельный вид животных является крайне дорогостоящим и применение его в вирусологических экспериментах сопряжено с большой трудоемкостью, что существенно затрудняет его использование в крупномасштабных статистически значимых экспериментах по оценке эффективности разрабатываемых препаратов. Кроме того, несмотря на относительно близкую к человеку клиническую картину заболевания, вызываемого ВНО у этих приматов, они в 1000–100 000 000 раз менее чувствительны к данному патогену при инфицировании через респираторный тракт, чем человек: 50 %-я инфицирующая доза (ИД₅₀) = 0-2 lg БОЕ. Причем этот вид животных используется только для оценки терапевтической (лечебной) эффективности противооспенных препаратов, при этом инфицирование обезьян осуществляется внутривенным методом, введением 8 lg БОЕ ВНО, тогда как основные пути заражения человека этим патогеном реализуются через органы дыхательного тракта.

В рецензируемой работе время диссертантом был использован иной подход по поиску лабораторной модели для оценки защитной эффективности противовирусных препаратов, сориентированный на воспроизведение не внешней клинической симптоматики вирусного заболевания у человека, а инфекционного процесса в первичных и вторичных органах и клетках-мишенях. Ранее автором диссертации с его коллегами было отмечено, что первичные суспензионные культуры клеток легких, полученные от

мышей аутбредной популяции ICR, чувствительны к ВНО и способны продуцировать данный патоген *in vitro*. В связи с этим, основываясь на этом подходе, при разработке дешевых и удобных лабораторных моделей для массового скрининга препаратов по противооспенной активности в экспериментах *in vivo* диссертант сориентировался именно на этот вид животных и ранее изученный высоковирулентный для человека штамм India-3a ВНО: ИД₅₀ = 1,0 (0,6-1,4) lg БОЕ.

Цель исследования: изучение возможности использования лабораторных моделей на основе иммунокомпетентных и иммунодефицитных мышей, а также высоковирулентного для человека штамма ВНО для оценки эффективности препаратов от натуральной оспы.

Научная новизна диссертационного исследования Титовой К.А. определяется тем, что на основании всей совокупности установленных в исследовании новых фактов, их многостороннего анализа, глубокой переработки и теоретического обобщения автором разработано целостное представление о механизмах патогенеза натуральной оспы обезьян у аутбредных мышей популяции ICR и иммунодефицитных линий SCID. Результаты этих исследований продемонстрировали сходство патогенеза этой инфекции у исследованных животных и человека. В связи с этим с использованием мышей и вирулентного для человека штамма ВНО были созданы 2 модельные биосистемы для изучения защитного действия разрабатываемых противооспенных препаратов: «10-14-суточная мышь аутбредной популяции ICR – штамм India-3a ВНО» и «18-21-суточная мышь иммунодефицитной линии SCID - штамм India-3a ВНО».

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы высокая. Данные полученные при изучении лабораторных моделей на основе мышей и высоковирулентного для человека штамма ВНО обеспечили благополучное выполнение в 2014-2016 годах:

- темы «Создание лабораторной модели для оценки эффективности лечебно-профилактических препаратов против натуральной оспы» (Шифр 03-5-14) ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора в рамках Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории РФ;

- международных обязательств, касающихся данного направления, принятых Сотрудничающим центром Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по диагностике ортопоксвирусных инфекций и музея штаммов и ДНК вируса оспы, располагающимся на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора;

С применением выбранных лабораторных моделей «10-14-суточная мышь аутбредной популяции ICR – штамм India-3a ВНО» и «18-21-суточная мышь иммунодефицитной линии SCID штамм India-3a ВНО», включая соответствующие методические рекомендации по их использованию (МР 4.2.005-16 и 4.2.003-16 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, были успешно проведены доклинические и клинические исследования российского противооспенного химически синтезированного соединения НИОХ-14, что открывает перспективу его дальнейшего продвижения в направлении регистрации в Министерстве здравоохранения РФ; результаты этих исследований были использованы при выполнении Госконтрактов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009-2014 годы)».

Основная информация, приведенная в методических рекомендациях (МР 4.2.005-16 и 4.2.003-16 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) по использованию лабораторных моделей «10-14-суточная мышь аутбредной популяции ICR – штамм India-3a ВНО» и «18-21-суточная мышь иммунодефицитной линии SCID штамм India-3a ВНО», вошла в

учебное издание (Сергеев, А.А. Практикум по изучению в экспериментах *in vivo* защитного действия препаратов от натуральной оспы, оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) / А.А. Сергеев, Л.Н. Шишкина - Новосибирск: ЗАО «Кант», 2016. - 61 с.), которое активно используется в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора с целью подготовки аспирантов очной формы обучения, научных сотрудников и лаборантов.

Методология исследования. С целью проверки применимости выбранных видов животного в качестве модельных для натуральной оспы в работе использовали методологию оценки показателей их инфицирования ВНО через респираторный тракт в сравнении с таковыми у человека (или известного модельного вида животных - *M. cynomolgus*), основанную на изучении у них инфекционного процесса.

Степень достоверности результатов исследования. Достоверность результатов работы определяется применением традиционных вирусологических, культуральных, гистологических, электронно-микроскопических и серологических методов анализа. 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 натуральной оспы 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.

Общая характеристика работы. Диссертационная работа Титовой К.А. оформлена в соответствии Национальным стандартом РФ (ГОСТ Р 7.0.11-2011), изложена на 142 страницах машинописного текста, 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, раздела с описанием материалов и методов исследования, раздела, в который входят 5 подразделов, где представлены результаты собственных исследований и их обсуждения, заключения с выводами, списка литературы, включающего 163 работы из них 37 отечественных. Диссертация очень хорошо оформлена, написана хорошим литературным языком. Текст проиллюстрирован наглядными рисунками и фотографиями, в том числе цветными. Содержание диссертации характеризуется четким, последовательным изложением, текст работы хорошо проиллюстрирован большим числом рисунков (14) высокого качества, количественные данные представлены в многочисленных таблицах (15). Выводы логически следуют из полученных данных. Результаты исследования достаточно полно апробированы, докладывались на 7 отечественных и международных научных форумах, проходивших с 2014 по 2016 г.

Все это позволяет высоко оценить диссертационное исследование Титовой К.А. Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы нет, но **имеются некоторые замечания, касающиеся оформления работы:**

- п.4 раздела «Научная новизна» целесообразно переформулировать и разбить на два отдельных пункта следующим образом: п.4 «Исследованы и доказаны защитные действия химически синтезированных соединений (НИОХ-14 и ST-246) и вакцины оспенной живой сухой для кожного применения, произведенной в Акционерном обществе «Научно-производственное объединение «Микроген» (АО «НПО

«Микроген»), г. Томск » с использованием выбранных лабораторных моделей: «10-14-суточная мышь аут-бредной популяции ICR – штамм India-3a ВНО» и «18-21-суточная мышь иммунодефицитной линии SCID - штамм India-3a ВНО» (в отношении лечебных соединений НИОХ-14 и ST-246); а «18-21-суточная мышь аутбредной популяции ICR – штамм India-3a ВНО» (в отношении противооспенной вакцины).

п.5. Разработанные способы оценки активности лечебно-профилактических препаратов от натуральной оспы с помощью выше упомянутых лабораторных моделей были запатентованы в Российской Федерации (РФ) [32, 33].

- Пункты №3 и №6 «Выводов» желательно было бы более чётко конкретизировать:

п.3. «При интраназальном заражении мышей аутбредной популяции ICR (10-14-суточные и 6-7-недельные) и иммунодефицитных линий SCID и Nude (18-21-суточные) вирусом натуральной оспы (штамм India-3a) 25-80 ИД50 инфекция, ограничивается в основном органами респираторного тракта. Органами регулярного накопления патогена у этих животных являются легкие и нос, где в ряде случаев его концентрация превышала 4 lg БОЕ/мл гомогената».

п.6 «Выбранные в данной работе лабораторные модели (мышь аутбредной популяции ICR (10-14-суточные) и иммуно-дефицитной линии SCID (18-21-суточные), а также вирус натуральной оспы штамма India-3a) могут быть использованы для оценки защитного действия исследуемых химиопрепаратов от натуральной оспы .

- В тексте диссертации и автореферата имеются 2-3 стилистические ошибки.

Высказанные замечания не снижают общего очень хорошего впечатления от работы. Диссертация представляет собой законченное научное исследование. Выводы и научные положения, сформулированные в диссертации адекватны результатам исследования и хорошо аргументированы. По результатам работы опубликовано 3 научных статьи в отечественных журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований, 3 научных статьи в зарубежных рецензируемых журналах, в том числе с высоким импакт-фактором (более 3), а также получено 2 патента РФ на изобретение. Материалы, представленные в автореферате диссертации Титовой К.А., соответствуют основной информации изложенной в самой диссертационной работе, в том числе приведённые в обоих документах выводы. Всё выше изложенное позволяет сделать следующее заключение.

Заключение

Кандидатская диссертация Титовой Ксении Александровны «Лабораторные модели на основе мышей для оценки защитной эффективности препаратов от натуральной оспы», выполненная под руководством к.м.н. Сергеева Александра Александровича, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей важное значение для развития вирусологической отрасли знаний, в частности, для создания и характеристики противооспенных лечебных препаратов, и изложены новые научно обоснованные разработки, предназначенные для оценки эффективности создаваемых лекарственных препаратов от натуральной оспы, имеющие существенное значение для развития здравоохранения страны.

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 кандидатским диссертациям, критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства РФ

от 24.09.2013 г. №842) в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а её автор, без сомнения, заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. – вирусология.

Официальный оппонент:

заведующий лабораторией генной инженерии,

главный научный сотрудник

Федерального государственного

бюджетного научного учреждения «Федеральный

исследовательский центр фундаментальной

и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ)

(Россия, 630117 г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2)

доктор биологических наук, профессор

эл. почта: beklem@niibch.ru

.....А.Б. Беклемишев

Личную подпись А.Б. Беклемишева заверяю

Начальник ОК ФГБНУ ФИЦ ФТМ



..... О.М. Минеева

М.П

25.11.2021 г.