

ОТЗЫВ

**официального оппонента, доктора биологических наук
Зарубаева Владимира Викторовича на диссертационную работу
Крутиковой Елены Витальевны
на тему: «Оптимизация живой гриппозной вакцины для ее применения
у детей в возрасте 1–3 лет», представленной к защите на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности:
03.02.02 – вирусология**

Актуальность темы. Грипп относится к острым респираторным вирусным инфекциям и представляет собой одну из наиболее значимых проблем, стоящих перед современным здравоохранением. Заболеваемость гриппом обуславливает ряд проблем социального и экономического характера: смертность в группах риска, резкое повышение нагрузки на персонал медучреждений, снижение трудовых ресурсов. Наиболее уязвимым контингентом, восприимчивым к гриппозной инфекции, являются маленькие дети (1-3 года), не имеющие протективного иммунитета достаточного уровня. Эпидемический процесс в последние годы определяют четыре вируса гриппа человека – А (H1N1)pdm09, А (H3N2), В/Ямагата-подобный и В/Виктория-подобный, долевое участие которых в период сезонных подъёмов различается в разных странах.

Вакцинация на сегодняшний день остается наиболее эффективным методом защиты от гриппозной инфекции. Применяемые с этой целью противогриппозные вакцины подразделяются на инактивированные (ИГВ) и живые (ЖГВ). С точки зрения развития протективного иммунитета живые вакцины имеют преимущество, поскольку, более адекватно имитируя естественную инфекцию, индуцируют не только гуморальное, но и системное клеточное звено иммунитета, а также местные иммунные реакции, играющие ключевую роль в предотвращении самых ранних стадий развития инфекционного процесса.

В подавляющем большинстве дети от рождения до 12 месяцев защищены, благодаря грудному вскармливанию, пассивным материнским иммунитетом. Вакцинация инактивированными вакцинами разрешена с 6-месячного возраста, а отечественной живой вакциной – с трёх лет. Таким образом, с точки зрения иммунизации группа детей возраста 1-3 года остается практически незащищенной. Противогриппозная вакцинопрофилактика живой гриппозной вакциной детей в

возрасте от 1 до 3 лет позволила бы значительно снизить заболеваемость гриппом в этой группе. В связи с этим, разработка и оптимизация живой гриппозной вакцины, эффективной для детей первых трёх лет жизни, является исключительно важной задачей как медицинской науки, так и практического здравоохранения.

Все изложенное определяет безусловную актуальность представляемых исследований и позволяет сформулировать **основную цель исследования** как усовершенствование донора аттенуации живой гриппозной вакцины типа В для детей в возрасте 1–3 лет.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций. Автором впервые получен и охарактеризован клон В14/710 донора аттенуации ЖГВ, подготовленный на основе холодадаптированного вируса В/Ленинград/14/17/55, с целью его потенциального использования в качестве резервного донора при подготовке вакцинных штаммов для детей в возрасте 1–3 лет. Впервые получены данные о локализации мутаций в его геноме; выявлено 17 уникальных аминокислотных замен в его внутренних генах. Впервые установлена роль полимеразных генов альтернативного донора В14/710 в формировании его ts-фенотипа и аттенуации для животных. Для оценки состава генома реассортантов при подготовке отечественных штаммов ЖГВ типа В модифицирован и впервые применен метод пиросеквенирования. На модели гриппозной инфекции у мышей установлено, что по иммуногенности штаммы, подготовленные на основе донора В14/710, не уступают иммуногенности аналогичных вакцинных штаммов, подготовленных на основе базового донора аттенуации В/СССР/60/69. На модели гриппозной инфекции у хорьков продемонстрирован феномен перекрестной защиты между линиями вируса гриппа В В/Vic и В/Yam, входящими в состав живой гриппозной вакцины.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Выносимые на защиту положения диссертации, отражающие научную новизну и практическую значимость работы, достоверно подтверждены представленными экспериментальными данными. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, основываются на большом объеме экспериментального материала, являются достоверными и логически вытекают из результатов

проведенных исследований. Достоверность полученных данных подтверждается также при помощи использования широкого набора адекватных статистических методов. Характеристика донора аттенуации проведена при помощи современных вирусологических молекулярно-биологических методик, позволяющих однозначную трактовку результатов. В результате убедительно продемонстрирована более высокая степень аттенуации альтернативного донора по сравнению с донором В/СССР/60/69. При этом достоверно установлено, что по иммуногенности альтернативный донор не уступает базовому. В работе также убедительно при помощи использования современных адекватных моделей показано, что иммунизация как моно-, так и трёхвалентной ЖГВ защищает от последующего заражения гетерологичным эпидемическим вирусом гриппа В.

Содержание диссертации и её оценка. Диссертационная работа оформлена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», собственных исследований, изложенных в четырёх главах, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 101 странице текста, оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, содержит 23 таблицы и 10 рисунков. Библиографический указатель включает 193 источника, в том числе 34 на русском и 159 - на иностранных языках.

Введение диссертации посвящено актуальности темы исследования, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе дан исчерпывающий, но занимающий значительную часть диссертации обзор литературных данных по теме исследования за период 1968-2018 гг. Здесь представлены данные об организации вирусного генома, механизмах вирусной реассортации, принципах разработки живых гриппозных вакцин, в том числе создания доноров аттенуации и маркерах аттенуированных штаммов. Автором приведён и детально проанализирован набор животных моделей, используемых при разработке вакцин, и показаны преимущества и недостатки каждой из моделей.

Во второй главе перечислены использованные материалы и методы исследования. Из материалов главы следует, что в работе использован комплексный подход к проводимым исследованиям, в частности, использовались вирусологические, иммунологические, серологические, молекулярно-биологические методы, а также приведён детальный перечень статистических методов, использованных при обработке полученных результатов.

В третьей главе «Альтернативный донор аттенуации В/Ленинград/14/17/55 для подготовки живой гриппозной реассортантной вакцины для детей в возрасте одного года и старше» автором представлены результаты изучения нуклеотидной последовательности резервного донора В14 и его биологических свойств. В частности, показано, что этот штамм оказался более температурочувствительным по сравнению с базовым донором, что сопровождалось также большей степенью аттенуации. В результате исследований в рамках этого фрагмента отобран и фенотипически охарактеризован чистый клон В14/710 холодадаптированного вируса В/Ленинград/14/17/55, более аттенуированный, чем базовый донор В/СССР/60/69, но не уступающий ему по иммуногенности, и установлены механизмы его аттенуации.

В четвертой главе «Экспресс-скрининг реассортантов вируса гриппа типа В методом пиросеквенирования» автором проведена отработка и адаптация к конкретным генам протокола пиросеквенирования для генотипирования реассортантов живой гриппозной вакцины путем анализа коротких участков последовательности. При помощи оптимизированного протокола было проведено генотипирование реассортантов – доноров аттенуации, в частности, определено происхождения сегментов генома реассортантов на основе донора аттенуации В/Ленинград/14/17/55 и эпидемического вируса В/Indiana/25/2015, что позволило выявить чистый клон с формулой генома 6:2, использованный в дальнейших исследованиях.

В пятой главе «Молекулярно-генетические основы аттенуации реассортантных штаммов вируса гриппа В» проведён детальный анализ генного состава реассортантов и изучена корреляция между происхождением сегментов генома и аттенуирующими свойствами штаммов вируса. Показано, что гены полимеразного комплекса (РА, РВ1, РВ2, NP) играют

решающую роль в формировании аттенуированного фенотипа вируса. автором также локализованы аминокислотные замены в этих генах и охарактеризована их роль в формировании аттенуирующих свойств донора. В результате проведения этой части работы автор показал высокую аттенуацию одногенного реассортанта В14–60, достоверно превышающую аттенуацию родительских доноров, а также зависимость между ts- фенотипом холодоадаптированного вируса и степенью его аттенуации.

В шестой главе «Перекрестная протективность живой гриппозной вакцины, содержащей антигенно отличающиеся линии вируса гриппа В» автором проведено изучение протективные свойства вакцин, содержащих антигенно отличающиеся штаммы вируса гриппа В. В ходе исследований в опытах на хорьках исследована степень аттенуации моновалентной живой вакцины, а также оценены протективные свойства моно-, три- и квадριвалентной вакцины при инфицировании животных эпидемически актуальными штаммами вируса гриппа В. Полученные результаты наглядно свидетельствуют, что однократная иммунизация как моно-, так и трёхвалентной вакциной защищает от последующего заражения не только гомологичным, но и гетерологичным эпидемическим вирусом гриппа В.

Выводы и практические рекомендации Выводы диссертации и практические рекомендации представлены четко и обоснованно вытекают из материалов диссертации. Автореферат диссертации адекватно отражает её основные положения и содержание. Апробацию результатов работы, проведенной за период 2014-2019 гг., следует признать достаточной: результаты исследования отражены в 19 научных статьях, 11 из которых опубликованы в журналах, входящих в Перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ, и 9 индексируемых в международных системах цитирования Web of Science и Scopus. Автором по теме диссертации получен патент Российской Федерации (Патент РФ 2605926, МПК C12N A61K. «Штамм вируса гриппа В/60/Пхукет/2013/26 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей»). Основные положения и результаты диссертации были доложены и обсуждены на 14 международных и российских конференциях: на Международной медико–биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (СПб, 2016–2019); на

Международной Пуштинской школе–конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2016–2019); на Санкт–Петербургской ассамблее молодых ученых и специалистов «Правительство Санкт–Петербурга комитет по науке и высшей школе» (СПб, 2016, 2019); на Всероссийской научно–практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017-2018» (Москва, 2017, 2018); на VII–м Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт–Петербургские научные чтения–2017» (СПб, 2017); на 6–й конференции Европейской научной рабочей группы по гриппу (ESWI) (Рига, Латвия, 2017); на Оксфордской конференции по гриппу (Оксфорд, Великобритания, 2018), на 10–й Конференции по контролю за гриппом (Options X, Сингапур, 2019), а также регулярно заслушивались на заседаниях отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» (2014–2019).

Принципиальных замечаний по диссертации нет.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. Полученные результаты могут быть использованы при дальнейшей разработке и внедрении доноров аттенуации в практику производства противогриппозных вакцин. Важно, что использованная в работе модифицированная тест–система метода определения состава генома реассортантов вируса гриппа В в 2–3 раза ускоряет и удешевляет процесс подготовки штаммов ЖГВ.

Вопросы.

1. Целью работы является «усовершенствование донора аттенуации живой гриппозной вакцины типа В для детей в возрасте 1–3 лет». В чём автор видит принципиальное отличие (или особенности) доноров аттенуации, применяемых у детей 1-3 лет, от подобных доноров для других возрастных групп? Каким образом эти особенности были отражены в методических подходах к выполнению работы? Если бы автор разрабатывал вакцину для применения у детей 4-7 лет, использовались бы те же методы и критерии или другие?

Из оформительских недочётов следует упомянуть следующие:

- в работе часто встречаются неправомерные сокращения типа «на модели мышей показано...», «на модели хорьков показано...», «клинический ход зараженных хорьков...».
- при перечислении противогриппозных химиопрепаратов (раздел 1.3) не следует упоминать рибавирин как средство противогриппозной терапии. Арбидол, который автор относит к ингибиторам вирусной репликации, на самом деле таковым не является, а блокирует процесс слияния вирусной и клеточной мембран.
- Анализ данных, представленных в табл.6.2 и 6.4, следует представлять несколько подробнее, поскольку в таком варианте содержание граф не всегда представляется однозначным.

Перечисленные замечания, однако, ни в коей мере не умаляют заслуг автора при выполнении, написании и представлении работы.

Заключение.

Диссертационная работа **Крутиковой Елены Витальевны** на тему **«Оптимизация живой гриппозной вакцины для ее применения у детей в возрасте 1–3 лет»** представляет собой самостоятельно выполненную и законченную научно-квалификационную работу, содержащую результаты разработки, иммунологическую и молекулярно-биологическую характеристику новых доноров аттенуации для производства живой противогриппозной вакцины.

По научной новизне, актуальности, высокому методическому уровню, научной ценности и практической значимости результаты диссертационной работы отвечают требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842), в редакции постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г. и №748 от 02.08.2016 г., предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.02.02 – вирусология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании отдела вирусологии Федерального бюджетного учреждения науки Санкт-Петербургский научно-исследовательский

институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Официальный оппонент: доктор биологических наук (03.02.02. – вирусология), старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии Федерального бюджетного учреждения науки Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.



Зарубаев Владимир Викторович

«18» ноября 2019 г.

Почтовый адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д.14

тел: +7 812 232 9411

e-mail: zarubaev@gmail.com

<http://www.pasteurorg.ru/>

*Подпись Зарубаева В.В. удостоверено,
главный специалист кадров;*

