

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 001.043.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГРИППА ИМЕНИ А.А. СМОРОДИНЦЕВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 10 декабря 2019 года № 7

О присуждении Крутиковой Елене Витальевне ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Оптимизация живой гриппозной вакцины для ее применения у детей в возрасте 1-3 лет» по специальности 03.02.02 – вирусология принята к защите 01 октября 2019 года, протокол № 5, диссертационным советом ДС 001.043.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д.15/17).

Соискатель Крутикова Елена Витальевна, 1991 года рождения, в 2014 году окончила Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина по специальности «биотехнология». В 2018 году окончила аспирантуру на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Институт экспериментальной медицины».

Диссертация выполнена в отделе вирусологии им. А.А. Смородинцева Федерального государственного бюджетного учреждения «Институт экспериментальной медицины».

Научный руководитель:

Киселева Ирина Васильевна, Профессор, доктор биологических наук, заведующая лабораторией вакцинных штаммов ФГБНУ «ИЭМ».

Официальные оппоненты:

Бурцева Елена Ивановна – Доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени

почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Зарубаев Владимир Викторович – Доктор биологических наук, ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека –

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – **Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ)**, в своем положительном отзыве, подписанном Александром Михайловичем Шестопаловым – профессором, доктором биологических наук, главным научным сотрудником, руководителем отдела экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний НИИ экспериментальной и клинической медицины, указал, что «диссертационная работа Крутиковой Елены Витальевны. на тему «Оптимизация живой гриппозной вакцины для ее применения у детей в возрасте 1-3 лет», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, проведенной на высоком научно-методическом уровне, в которой получен экспериментальный материал и содержится решение актуальных научно-практических задач, а именно продемонстрирована перспективность использования штамма В/Ленинград/14/17/55 как донора внутренних генов для подготовки штаммов живой гриппозной вакцины (ЖГВ) для детей в возрасте 1-3 лет; представлена недостающая характеристика штамма В/Ленинград/14/17/55 как современного донора; модифицирован метод пиросеквенирования, позволяющий оперативно и экономически выгодно анализировать реассортанты вирусов гриппа В по принадлежности их генов к родительским штаммам; продемонстрирована защита современной трехвалентной вакцины от двух разных генетических линий вируса гриппа В, что имеет существенное значение для развития вирусологии.

По актуальности, объему представленных автором исследований, методическому уровню, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов и выводов, полноте изложения материалов в рецензируемых печатных научных изданиях диссертационная работа Крутиковой

Е.В. соответствует специальности 03.02.02 – вирусология и полностью отвечает требованиям пунктов 9-14 Положения о присуждении ученых степеней, (утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 с изменениями от 21 апреля 2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Соискатель имеет 19 опубликованных работ, все по теме диссертации, из них 11 опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК.

В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

Основные научные результаты диссертационного исследования опубликованы в рецензируемых научных изданиях. В статье «Холодоадаптированный вирус В/Ленинград/14/17/55 – альтернативный донор аттенуации живой гриппозной вакцины для детей младшего возраста» (1), статье «Пространственное расположение одиночных аминокислотных замен в белках холодоадаптированных штаммов вируса гриппа В и их возможная роль в холодной адаптации» (3) и статье «Экспериментальное изучение констелляции генов холодоадаптированных доноров аттенуации живой гриппозной вакцины типа В» (5) изложены материалы третьей и пятой глав диссертации, содержащие результаты характеристики альтернативного донора В/Ленинград/14/17/55, его клонирования, и данные о сравнительном анализе альтернативного донора с базовым донором В/СССР/60/69. Результаты исследования, приведенные в четвертой главе, описывающей модернизацию пиросеквенирования для оперативного генотипирования реассортантов вируса гриппа типа В отражены в статье «Экспресс–скрининг реассортантов вируса гриппа В – кандидатов в вакцинные штаммы живой гриппозной вакцины методом пиросеквенирования» (2). Материалы шестой главы, где приведены результаты изучения перекрестной протективности современной живой гриппозной вакцины от генетически удаленных вирусов гриппа В, содержатся в статьях «Cross–protective efficacy of monovalent live influenza B vaccines against genetically different lineages of B/Victoria and B/Yamagata in ferrets» (4) и «Rationale for vaccination with trivalent or

quadrivalent live attenuated influenza vaccines: Protective vaccine efficacy in the ferret model» (6).

Наиболее значимые работы:

1. Крутикова, Е.В. Холодоадаптированный вирус В/Ленинград/14/17/55 – альтернативный донор аттенуации живой гриппозной вакцины для детей младшего возраста. / Е.В. Крутикова, И.В. Киселева, Е.А. Федорова, И.А. Дубровина, Е.А. Большунова, Л.Г. Руденко // **Медицинский академический журнал**. 2016.– 16(4). – С.156 –157.

2. Крутикова, Е.В. Экспресс–скрининг реассортантов вируса гриппа В – кандидатов в вакцинные штаммы живой гриппозной вакцины методом пиросеквенирования / Е.В. Крутикова, Е.А. Степанова, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко // **Молекулярная генетика, микробиология и вирусология**. – №2. – 2018 – С. 107–111.

3. Крутикова, Е.В. Пространственное расположение одиночных аминокислотных замен в белках холодоадаптированных штаммов вируса гриппа В и их возможная роль в холодовой адаптации / Е.В. Крутикова, Е.А. Степанова, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко // **Молекулярная генетика, микробиология и вирусология**. –2018. – №3. – Т.36. – С.13–24.

4. Kiseleva, I. Cross–protective efficacy of monovalent live influenza B vaccines against genetically different lineages of B/Victoria and B/Yamagata in ferrets. / I. Kiseleva, E. Krutikova, E. Stepanova, S. Donina, M. Pisareva, V. Krivitskaya, A. Rekstin, EG. Sparrow, G. Torelli, L. Rudenko // **BioMed Research International**. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1–11.

5. Крутикова, Е.В. Экспериментальное изучение констелляции генов холодоадаптированных доноров аттенуации живой гриппозной вакцины типа В / Е.В. Крутикова, Е.А. Степанова, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2019. – Т. 167. – № 3. – С. 360—364.

6. Rudenko, L. Rationale for vaccination with trivalent or quadrivalent live attenuated influenza vaccines: Protective vaccine efficacy in the ferret model / L. Rudenko, I. Kiseleva, **E. Krutikova**, E. Stepanova, A. Rekstin, et al. // **PLoS ONE**. – 2018. – V. 13. – No. 12.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы от:

1) доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН НИЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Мазурковой Натальи Алексеевны;

2) доктора медицинских наук, доцента, главного научного сотрудника лаборатории гриппа и гриппоподобных заболеваний Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь Боренко Евгения Ивановича;

3) доктора медицинских наук, начальника отдела ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России Петрова Александра Анатольевича; профессора, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России Лебедева Виталия Николаевича;

4) доктора биологических наук, заведующей лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова Леновой Ирины Анатольевны;

5) кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России Писаревой Марии Михайловны;

Все отзывы положительные. В отзыве доктора медицинских наук, начальника отдела ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России Петрова Александра Анатольевича и профессора, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России Лебедева Виталия Николаевича имеются 3 замечания, которые не оказывают влияния на общую положительную оценку представленной работы:

«1. Сформулированная по тексту цель проведения исследований (стр.7) в достаточной степени в достаточной степени отличается от названия работы.

2. В генах содержатся не уникальные аминокислотные замены, а информация о последних по результатам определения несинонимических нуклеотидных замен (стр.13).

3. По тексту автореферата использованы жаргонные выражения:

– «с повышением *att* свойств вакцинных штаммов *страдала из иммуногенность*» (стр.17);

– «для защиты *от гриппа* детей в возрасте от одного года до трех лет» (правильно: от заболевания, вызванного вирусом гриппа, стр.18 и 25).»

В отзыве кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России Писаревой Марии Михайловны имеется 1 вопрос который носит дискуссионный характер и не влияет на общую положительную оценку работы: – «Почему в работе использовались вакцинные штаммы, подготовленные именно на доноре В/СССР/60/69, а не на доноре В/Ленинград/14/17/55?».

В отзывах подчеркивается актуальность темы проведенного исследования, показана значимость полученных теоретических и практических результатов.

Выбор официальных оппонентов обосновывается их компетентностью в данной области науки, достижениями, большим опытом и наличием публикаций в сфере диссертационного исследования, их согласием на оппонирование и рецензирование настоящей работы и способностью определить и практическую ценность выполненной научно-исследовательской работы и произведен в соответствии с требованиями пункта 22 «Положения порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24.09.2013 г.

Выбор ведущей организации обусловлен тем, что ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» является одним из передовых учреждений, в котором работают признанные специалисты в сфере экспериментальной медицины, молекулярной биологии и вирусологии.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

предложен новый ходоадаптированный донор аттенуации для подготовки штаммов живой гриппозной вакцины для детей 1-3 лет;

показана перспективность использования донора В/Ленинград/14/17/55, как более аттенуированного штамма по сравнению с ныне используемым штаммом В/СССР/60/69;

получены данные о локализации мутаций в геноме альтернативного донора и установлена роль уникальных аминокислотных замен в его аттенуации;

продемонстрирована иммуногенность альтернативного донора аттенуации в экспериментах на животных;

модифицирован новый метод пиросеквенирования для определения состава генома реассортантов вируса гриппа В, позволяющий в два раза сократить время

анализа реассортантов-кандидатов в вакцинные штаммы живой гриппозной вакцины;

продемонстрирована перекрестная защита между линиями вируса гриппа В В/Victoria/2/87 и В/Yamagata/2/78, входящими в состав живой гриппозной вакцины;

показана перспективность использования мышей как модели для сравнительного анализа степени аттенуации различных вирусов гриппа.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

получены данные о влиянии генов, кодирующих белки полимеразного комплекса, а именно генов PB2 и PA, на аттенуацию альтернативного донора В/Ленинград/14/17/55 что вносит существенный вклад в понимание фундаментальных аспектов аттенуации вируса гриппа типа В в целом;

раскрыты существенные данные о констелляции генов полимеразного комплекса донора аттенуации В/Ленинград/14/17/55, не позволяющие разобщить PB1 субъединицу от других субъединиц полимеразного комплекса донора при скрещивании с донором В/СССР/60/69;

показано, что мыши являются адекватной моделью для изучения различий в степени аттенуации вирусов гриппа.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

показана возможность оптимизации живой гриппозной вакцины с целью расширения контингента прививаемого населения посредством использования альтернативного донора В/Ленинград/14/17/55. Показано, что донор В/14/710 содержит на 10 кодирующих замен больше, чем донор В/СССР/60/69, кроме того, продемонстрирована бóльшая аттенуация донора В/Ленинград/14/17/55 по сравнению с донором В/СССР/60/69, что делает штамм В/Ленинград/14/17/55 перспективным донором живой гриппозной вакцины, предназначенной для детей в возрасте одного года и старше;

доказаны предположения о перекрестной протективности штаммов живой гриппозной вакцины от генетически удаленных линий вируса гриппа В, позволяющие применять живую гриппозную вакцину даже в случае несовпадения штаммов, включенных в вакцину и циркулирующих;

разработана модификация метода пиросеквенирования, позволяющая в 2-3 раза сократить и удешевить процесс подготовки штаммов живой гриппозной вакцины типа В;

подготовлен вакцинный штамм В/60/Пхукет/2013/26, который был депонирован в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ России, передан в АО НПО «Микроген» для включения в состав ЖГВ и использовался в эпидемические по гриппу сезоны 2015-2018 гг.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

предложенный холодоадаптированный донор аттенуации В/Ленинград/14/17/55 для подготовки штаммов живой гриппозной вакцины для детей от одного года и старше, ранее применялся в качестве вакцинного штамма и в результате многочисленных клинических испытаний установлена безопасность его применения и иммуногенность на тысячах детей, включая детей в возрасте одного года;

теория построена на проверяемых данных и фактах, которые согласуются с опубликованными работами, посвященными гриппозной инфекции;

полученные **результаты подтверждаются** достаточным количеством исследований и научно обоснованной интерпретацией;

использованы современные вирусологические, молекулярно-биологические и статистические методы;

исследования были проведены с **использованием** сертифицированного оборудования, проходящего плановый и контрольно-технический осмотры.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном получении данных и вирусологических исследований на всех этапах диссертации, логическом построении работы, личном участии в апробации результатов, обработке и интерпретации литературных данных. Соискателем лично сформулированы цели и задачи диссертационного исследования, научные положения, сделаны выводы, обоснованы практические рекомендации, подготовлены основные публикации и доклады по теме исследования, написаны текст диссертации и автореферата.

Диссертационный совет пришел к выводу о том, что диссертация Крутиковой Е.В. «Оптимизация живой гриппозной вакцины для ее применения у детей в возрасте 1-3 лет» представляет собой научно-квалификационную работу и

соответствует требованиям, предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук п.9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 в редакции Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, и **принял решение ПРИСУДИТЬ** Крутиковой Елене Витальевне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

При проведении тайного голосования, диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 13 докторов наук по специальности 03.02.02 – вирусология, участвовавших в заседании, проголосовали:

За присуждение ученой степени – 14.

Против – нет.

Недействительных бюллетеней – нет.

Председатель
диссертационного совета Д.001.043.01,
доктор биологических наук

Жилинская И.Н.

Ученый секретарь Д.001.043.01,
кандидат биологических наук

Амосова И.В.

11 декабря 2019 г.

