

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 05 июня 2018 года № 4

О присуждении Бродской Александре Валерьевне ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Разработка противовирусной композиции малых интерферирующих РНК для ингибирования репродукции вируса гриппа А» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.02 – Вирусология» принята к защите 03 апреля 2018г., протокол №3, диссертационным советом Д 001.043.01 на базе ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17, утвержденного приказом №980/нк от 16 декабря 2013г.

Соискатель Бродская Александра Валерьевна в 2012 г. окончила Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, получив степень магистра техники и технологии по направлению «техническая физика». В 2016 г. там же окончила аспирантуру по специальности «03.01.02. - Биофизика». С 2010 г. и по настоящее время является научным сотрудником отдела молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава России.

Диссертация выполнена в отделе молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава России.

Научный руководитель – кандидат биологических наук Васин Андрей Владимирович, директор ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Сморodinцева» Минздрава России, заведующий отделом молекулярной биологии вирусов, заведующий лабораторией системной вирусологии.

Официальные оппоненты:

**Ларионова Наталья Валентиновна** – доктор биологических наук, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ведущий научный сотрудник.

**Игнатъев Георгий Михайлович** – доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», заместитель директора по производству.

Дали положительные отзывы на диссертацию, содержавшие следующие вопросы и замечания:

1. Автор указывает на то, что малые интерферирующие РНК имеют обнадеживающие перспективы в качестве универсального препарата для профилактики и терапии гриппозных инфекций. Возможен ли подбор единых миРНК, эффективных для вирусов гриппа А всех сероподтипов? Либо планируется идти по пути создания так называемых «коктейлей» из миРНК, оптимально специфичных для разных сероподтипов вирусов гриппа А?
2. Что касается оформления работы, следует отметить, что список литературы составлен с отклонениями от требований ГОСТ 7.0.11-2011, встречаются единичные опечатки и неточности. Общее количество страниц диссертации, указанное в автореферате (118 страниц) отличается от реального (115 страниц), число цитируемых литературных источников, указанное в автореферате – 131, тогда как реальное – 130. Отсутствует требуемый по ГОСТ 7.0.11-2011 список таблиц и рисунков.

3. Список сокращений и условных обозначений было бы уместно расположить перед введением, а не в конце работы. В работе присутствуют незначительное число опечаток и «неудачных» формулировок

Ведущая организация:

**Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва).**

Заключение подготовлено Бурцевой Еленой Ивановной, доктором медицинских наук, заведующей лабораторией этиологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и утверждено Гинцбургом Александром Леонидовичем, доктором биологических наук, профессором, академиком РАН, директором ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Положительно оценивая работу в целом, подчеркивая ее актуальность, новизну, теоретическую и практическую значимость, отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

1. стр.98, рис.3.28. В тексте диссертационной работы к этому рисунку сказано о подавлении репродукции вирусов гриппа в культуре клеток MDCK на  $2-4 \lg$  ТЦД50, оцениваемой по показателям инфекционных титров комбинацией из трех инкапсулированных миРНК. Однако максимальный показатель составил не более  $3,75 \lg$ . Насколько статистически достоверными были показатели в отношении вирусов гриппа А(Н5N1) и А(Н7N9)?
2. Почему все эксперименты проводили при введении микрокапсул с комбинацией миРНК за 24 часа до заражения. Будет ли наблюдаться противовирусное действие композиции инкапсулированных миРНК, при их введении за больший период времени до инфицирования клеток (профилактический), одномоментно и после инфицирования (лечебный)?

**3.** Насколько ингибирование вирусной репродукции миРНК будет эффективным в условиях дрейфовой изменчивости эпидемических штаммов вирусов гриппа?

Отмечено, что несмотря на сделанные замечания диссертационная работа Бродской Александры Валерьевны на тему «Разработка противовирусной композиции малых интерферирующих РНК для ингибирования репродукции вируса гриппа А» является законченным научно-квалификационным исследованием, результатом которого явилось решение актуальной народно-хозяйственной проблемы – разработка комбинации малых интерферирующих РНК и системы их доставки в клетки, что позволит использовать полученные данные при конструировании новых лекарственных препаратов для профилактики и лечения гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа А. По своей актуальности, научной новизне и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа отвечает требованиям, п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Автор представленной диссертационной работы Бродская А.В. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 – вирусология.

Диссертационная работа и отзыв обсуждены и одобрены на научной конференции Отдела экологии вирусов с научно-практическим центром по экологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», подразделение Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России 17.05.2018г. (Протокол № 3).

Соискатель Бродская А.В. (Петрова 2013-2017 гг.) по теме диссертации имеет 8 печатных работ из них 5 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

1. Timin, A.S., Muslimov, A.R., Petrova A.V., Lepik K.V., Okilova M.V., Vasin A.V., Afanasyev A.V., Sukhorukov G.B. Hybrid inorganic-organic capsules for efficient intracellular delivery of novel siRNAs against influenza A (H1N1) virus infection. // *Scientific Reports*. – 2017. – №7. – с. 102.

2. Горшков А.Н., Петрова А.В., Васин А.В. РНК-интерференция и патогенез вируса гриппа. // *Цитология*. – 2017. – Т. 59, № 8. – с: 515–533.

3. Петрова-Бродская А.В., Бондаренко А.Б., Тимин А.С., Плотникова М.А., Афанасьев М.В., Семенова А.А., Лебедев К.И., Горшков А.Н., Горшкова М.Ю., Егоров В.В., Клотченко С.А., Васин А.В. Сравнение эффективностей ингибирования вируса гриппа А in vitro комплексами малых интерферирующих РНК с производными хитозана, полиэтиленимином и гибридными микрокапсулами на основе полиаргинина с неорганическими компонентами. // *Вопросы вирусологии*. – 2017 – Т. 62, № 6. – с: 259-265.

4. Muslimov A.R., Timin A.S., Petrova A.V., Epifanovskaya O.S., Shakirova A.I., Lepik K.V., Gorshkov A., Il'inskaja E.V., Vasin A.V., Afanasyev V.V., Fehse B., Sukhorukov G.B. Mesenchymal Stem Cells Engineering: Microcapsules-Assisted Gene Transfection and Magnetic Cell Separation. // *ACS Biomaterials Science*. – 2017. – Т.3, №10. – с: 2314–2324

5. Brodskaja A.V., Timin, A.S., Gorshkov A.N., Muslimov A.R., Bondarenko A.B., Tarakanchikova Y.V., Zabrodskaya Y.A., Baranovskaia I.L., Il'inskaja I.V., Sukhorukov G.B., Vasin A.V. Inhibition of Influenza A virus by mixed siRNAs, targeting the PA, NP, and NS genes, delivered by hybrid microcarriers. // *Antiviral Research*. – 2018 (принято к печати)

6. Петрова А.В., Горшков А.Н., Егоров В.В., Бондаренко А.Б., Шурыгина А.П.С., Грудинина Н.А., Васин А.В. Оценка трансфекционной способности производных хитозана в качестве носителей для доставки коротких интерферирующих РНК. // *Естественные и математические науки в современном мире*. – 2015. – № 36-37. – с: 142-148.

7. I Unksov, A. Slita, A. Petrova, I. Pereviazko, V. Bakulev, V. Rolich, A. Bondarenko, N. A. Kasyanenko. Vectors for the delivery of siRNA and DNA. // European Biophysical Journal. – 2015. – № 44 (Suppl 1). – с: 240

8. Petrova, AV; Bondarenko, A; Timin, A; Afanasev, M; Sukhorukov, G; Vasin, A. Comparison of different strategies for siRNA delivery against influenza A virus. // FEBS JOURNAL. – 2017. – № 284 (P.2.2-017). – с: 170.

**На диссертацию и автореферат также поступили следующие отзывы:**

1. Отзыв на автореферат, составленный доктором биологических наук Логиновой Светланой Яковлевной, ведущим научным сотрудником отдела опасных вирусных инфекций ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Отзыв положительный, содержит замечания:
  - 1.1. Оформление таблиц и рисунков в автореферате не соответствует ГОСТу (ГОСТ 2.105 пп.4.2.21, 4.3.1,4.5.1)
  - 1.2. В таблице не представлены оценки эффективности известных высокоэффективных препаратов в качестве положительного контроля.
  - 1.3. Не соответствует экспериментальным данным заключение об универсальности разработанного препарата, эффективность препарата выявлена только в отношении 4 возбудителей гриппа из 6 оцениваемых (стр 22). В 5ом выводе следовало бы конкретно указать эффективность изучаемого препарата в отношении каждого штамма и подтипа ВГА.
2. Отзыв на автореферат, составленный доктором биологических наук Кордюковой Ларисой Валентиновной, ведущим научным сотрудником отдела хроматографического анализа НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (МГУ). Отзыв положительный, замечаний и вопросов нет.
3. Отзыв на автореферат и диссертацию составленный доктором биологических наук, профессором Шестопаловым Александром Михайловичем, вр.и.о. директора ФГБНУ «Федеральный

исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (г. Новосибирск) и кандидатом медицинских наук Курской Ольгой Григорьевной, научным сотрудником ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины». Отзыв положительный вопросов и замечаний нет.

4. Отзыв на автореферат, составленный кандидатом химических наук, профессором Колпащиковым Дмитрием Михайловичем ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий механики и оптики». Отзыв положительный, замечаний нет.
5. Отзыв на автореферат, составленный кандидатом биологических наук Мефедом Кириллом Михайловичем, главным экспертом лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России. Отзыв положительный, замечаний нет.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обоснован их высокой квалификацией в данной области вирусологии, заинтересованностью в тематике научного исследования, собственными достижениями в данной отрасли науки, наличием большого количества публикаций по тематике диссертации и, как следствие, способностью определить научную значимость, новизну и практическую ценность выполненной работы.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:**

- **впервые** проведен дизайн миРНК, направленных на «выключение» экспрессии генов ВГА, кодирующих белки NP, PA, PA-N155, PA-N182 и PA-X, и обладающие противовирусной активностью *in vitro*.

- **получены** данные о том, что гибридные микрокапсулы (SiO<sub>2</sub>-МК) могут быть использованы для эффективной внутриклеточной доставки миРНК, так как обладают низкой цитотоксичностью и высокой

инкапсулирующей способностью в отношении миРНК, обеспечивают длительную защиту миРНК от РНКаз, а также эффективную и быструю трансфекцию миРНК внутрь клетки и их полное высвобождение в цитозоль через 24 часа.

- **впервые показано,** что за 24 часа после введения SiO<sub>2</sub>-МК обеспечивают наиболее эффективную внутриклеточную доставку миРНК и их противовирусную активность в отношении вируса A/PR/8/34 (H1N1) *in vitro* по сравнению с полиэтиленимином, производными хитозана и липофектамином.

- **продемонстрировано,** что инкапсулированные миРНК (направленные на подавление экспрессии гена NP) обеспечивают дозозависимое снижение экспрессии гена NP и общее подавление репродукции ВГА в отношении вируса A/PR/8/34 (H1N1).

- **продемонстрировано,** что комбинация из трёх миРНК (направленных на подавление экспрессии генов NP, PA и NS) оказывает специфический противовирусный эффект *in vitro*, превышающий действие соответствующих отдельных миРНК и озельтамивира в отношении вирусов A/California/7/09 (H1N1pdm09), A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), A/Anhui/1/13 (H7N9).

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

- **доказано,** что синтетические миРНК PA-1630, NP-717, NP-1004 и NP-1341, направленные на консервативные области мРНК PA и NP, обладают противовирусным действием в отношении ВГА *in vitro*.

- **впервые проведено** сравнительное исследование эффективности внутриклеточной доставки и противовирусного действия в отношении ВГА препаратов миРНК с различными невирусными носителями.

- **продемонстрировано** эффективное применение композиции миРНК с микрокапсульными носителями для подавления репродукции ВГА *in vitro*.

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



- **применение результатов** работы будет заключаться в возможности дальнейшей разработки фармакологической формы препарата на основе миРНК, предназначенного для профилактики и лечения вирусной инфекции, вызванной ВГА человека.

- **позволяют рекомендовать** использовать предложенные в работе подходы по эффективной внутриклеточной доставке миРНК с помощью быстро модифицированных гибридных микрокапсул при разработке новых фармацевтических препаратов различного действия.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:**

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

- для экспериментальных работ **задействован** широкий комплекс современных методов, результаты получены с использованием сертифицированного оборудования, проходящего плановый и контрольно-технический осмотры;

- **в работе были использованы** адекватные современные экспериментальные молекулярно-биологические и вирусологические методы.

**Личный вклад соискателя** состоит в самостоятельном планировании и выполнении всех основных лабораторных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов. Автором лично проведен подбор миРНК, направленных на подавление экспрессии генов PA и NP ВГА, и первичный скрининг их противовирусного действия *in vitro* в комплексе с липофектаминол. Также автором проведены все работы по подбору параметров и характеристике комплексов миРНК с поликатионными носителями, сравнительное исследование эффективности доставки, опыты *in vitro* по определению противовирусной активности препаратов миРНК. Автором осуществлен аналитический обзор литературы, интерпретация и изложение полученных данных, формулирование выводов, а также подготовка основных публикаций по теме работы.

На заседании от 05 июня 2018 года **диссертационный совет Д001.043.01** постановил, что диссертация Бродской Александры Валерьевны «Разработка противовирусной композиции малых интерферирующих РНК для ингибирования репродукции вируса гриппа А» представляет собой научно-квалификационную работу и соответствует требованиям, предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских 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** Бродской Александре Валерьевне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

При проведении тайного голосования была назначена счетная комиссия, в составе председателя Сомининой А.А., а также Еропкина М.Ю и Ерофеевой М.К., которая составила протокол о подсчете голосов тайного голосования о присуждении ученой степени кандидата биологических наук Бродской А. В. и установила, что в голосовании участвовали 15 членов диссертационного совета, из них 14 докторов наук по профилю рассматриваемой диссертации. Всего было роздано 15 бюллетеней, осталось не роздано 5 бюллетеней. Оказалось в урне для голосования: 15 бюллетеней.

Результаты голосования по вопросу присуждения Бродской А.В. ученой степени кандидата биологических наук:

За – 15. 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.

05 июня 2018 г.

