

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 03 декабря 2019 года № 6

О присуждении Хантимировой Лейсан Маратовне ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Получение хитозана, его производных, изучение их физико-химических характеристик и иммуноадьювантной активности в составе инактивированных вакцин против гриппа» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям «03.02.02 – Вирусология» и «03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» принята к защите 01 октября 2019 года, протокол № 5, диссертационным советом Д 001.043.01 на базе ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (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 2013 г.

Соискатель Хантимирова Лейсан Маратовна (до 10.10.15 Хасанова Л.М.) в 2010 г окончила ГОУ ВПО «Казанский государственный технологический университет» с присуждением квалификации инженер по специальности «Биотехнология». В 2012 г. окончила ФГБОУ ВПО «Пущинский государственный естественно-научный институт» с присуждением степени магистра техники и технологии по направлению «Биомедицинская инженерия». С 2012 по 2016 гг. являлась аспирантом Института биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН. Удостоверение о сдаче

кандидатских экзаменов № 5 от 01.12.2016 г. выдано Институтом биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН. С 2013 по 2016 гг. по совместительству трудилась в должности младшего, а затем – научного сотрудника в ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова». С 2017 г. работала в должности аналитика, с февраля 2019 г и по настоящее время является экспертом Управления экспертизы противовирусных медицинских иммунобиологических препаратов Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Диссертация выполнена в Федеральном государственном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН» Институт биоинженерии (ФИЦ Биотехнологии РАН) в лаборатории инженерии биополимеров, г. Москва и в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова) в отделе вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе, г. Москва

Научные руководители:

Васильев Юрий Михайлович - кандидат биологических наук, и.о. директора ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства»;

Ильина Алла Викторовна - кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории инженерии биополимеров, Институт биоинженерии, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН».

Официальные оппоненты:

Харит Сусанна Михайловна – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела профилактики инфекционных заболеваний, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-

клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург;

Мелентьев Александр Иванович – доктор биологических наук, профессор, научный руководитель Уфимского института биологии Российской академии наук – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук и главный научный сотрудник лаборатории прикладной микробиологии в этой организации, Уфа,

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

1. Под иммуногенностью обычно понимают иммунный ответ на антиген. Вы пишете везде иммуногенность хитозана (производных), при этом говорите, что он работает, как адъювант, т.е. создает «депо». Что Вы вкладываете в понятие иммуногенность хитозана? Каким Вы представляете все же механизм действия хитозана и его производного с ММ 700 кДа, СД 85%: создание «депо» антигена? или же активация АПК, формирование инфломассомы и т.п.?
2. Как Вы оценивали безопасность хитозана и его производных при проведении вакцинации животных?
3. Не могли бы Вы сформулировать что нового внесло Ваше исследование по эффективности хитозана при иммунизации против гриппа, по сравнению с проводившимися в мире ранее?
4. Касается положений, выносимых на защиту. По п.1 синтаксическая ошибка: «Способ гидролиза (чего, какого субстрата?) с использованием...». По п.2-5, - на мой взгляд, защищаемые положения не сформулированы, а представляют собой констатацию фактов проведения тех или иных исследований и получения тех или иных результатов и практически повторяют выводы. И еще, в порядке нумерации этих положений дважды обозначен п.4.

5. В разделе «Материалы и методы» Вы пишете: «Адьюванты на основе хитозана готовили как 1,0% растворы в глутаминовой кислоте...» (стр.9 автореферата, стр.32 диссертации). Глутаминовая кислота, представляет, из себя кристаллическое вещество. Растворимость глутаминовой кислоты в воде 7,5 г/л. Очевидно речь идет о растворе глутаминовой кислоты в воде? Тогда следовало указать молярность такого раствора, или концентрацию в % мас.

6. В этом же разделе Вы указываете, что для ферментного гидролиза (опять же, какого вещества?) использовали ФП, содержащий комплекс высокоактивных карбогидраз, продуцируемый мицелиальным грибом *Myceliophthora fergusi* UV-64 DRV F-239D. Однако абсолютно не представлены характеристики этого ферментного препарата, что это лиофильно высушенный концентрат культуральной жидкости или препарат, полученный другим способом сушки? Какова его активность в отношении хитина/хитозана? Вам кто-то его предоставил или Вы его нарабатывали сами? Если последнее, необходимо было представить условия культивирования, состав питательной среды и технологию получения данного препарата, что не заставило бы оппонента искать эти сведения в Ваших же публикациях.

7. Замечание общего характера, как к тексту автореферата, так и диссертации. Чрезмерно излишнее количество аббревиатур и сокращений. Поверьте, это не только затрудняет восприятие материала, но и желание его читать, если бы не официальная обязанность это сделать. Тем более что в списке сокращений отсутствуют разъяснения, что такое M_v , M_w и M_n . Хотя в тексте диссертации можно найти их смысловое значение. Но для многих M_n , это химический элемент.

8. Чем Вы можете объяснить, что в процессе переосаждения исходного коммерческого хитозана ММ 1000 кДа наблюдается снижение ММ до 700 кДа, а в процессе переосаждения хитозана с ММ 200 кДа такого не происходит?

9. При подборе условий ферментативного гидролиза хитозанов Вы остановились на pH 5,6 (табл.6 в диссертации) и температуре 55 °С (табл.7 там же), хотя, как следует из динамики, хитозаназная активность с повышением этих показателей продолжала возрастать. Почему вы не определили точку перехода динамики в обратную сторону?

10. В таблице 8 (стр.39 в диссертации) представлены данные о влиянии соотношения Фермент : Субстрат на молекулярную массу продуктов гидролиза. Обычно в энзимологии такое соотношение принято выражать в ед. активности фермента на г (массу) или моль субстрата. В первой колонке таблицы у Вас представлено соотношение ферментного препарата мг/ г хитозана. Во второй колонке представлены соотношения, которые из данных первой колонки арифметически не получаются. Объясните в чем дело? Лично я нашел объяснение, подняв ваши публикации. Почему Вы не привели данные, в каких единицах рассчитано соотношение Фермент : Субстрат?

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, в своем положительном отзыве, подготовленным Бурцевой Еленой Ивановной, доктором медицинским наук, заведующей лабораторией этиологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и утвержденным Гинцбургом Александром Леонидовичем, доктором биологических наук, профессором, академиком РАН, директором ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России подчеркивая актуальность, новизну, теоретическую и практическую значимость работы, указала на следующие вопросы и замечания:

1. Работа написана не достаточно подробно, в частности, обзор литературных данных, собственные результаты; не четко представлены дизайны экспериментов (на мышах), а также табличные и графические данные, подписи к ним. В главе «Обсуждение результатов» часть материала

могла бы быть представлена в «Обзоре литературы», содержатся табличные данные, что логично было бы представить в главе «Результатах собственных исследований».

2. Неудачные выражения и обозначения, например, РЗГА – общепринятым обозначением является РТГА (реакция торможения гемагглютинации).

3. Было бы хорошо представить данные РТГА по антигенному анализу вирусов гриппа А(Н5N1) и А(Н5N2), подтвердив их гетерологичность.

4. В главе «Материалы и методы» указан вирус А/Brisbane/59/2007 IVR (H1N1), однако при представлении результатов он не упоминается.

5. Обоснуйте выбор методов оценки иммуногенности и эффективности экспериментальных вакцин с адьювантом хитозаном? В частности, не совсем понятен метод (не описан подробно в работе) по определению антител в легких и их оценке (в работе – по разнице оптической плотности). Использует кто-либо из других исследователей этот метод и насколько различались по титрам образцы сывороток крови и легких?

6. В чем заключается механизм действия хитозана в качестве адьюванта?

Отмечено, что, несмотря на сделанные замечания, диссертационная работа Хантимировой Лейсан Маратовны на тему «Получение хитозана, его производных, изучение их физико-химических характеристик и иммуноадьювантной активности в составе инактивированных вакцин против гриппа» является научно-квалификационным исследованием, результатом которого стало решение актуальной проблемы – характеристика свойств нового адьюванта – хитозана, что позволит использовать полученные данные при разработке новых эффективных вакцин для профилактики гриппа, а также использовать в качестве платформы для создания панели иммунобиопрепаратов с управляемыми свойствами. 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 наук. Автор представленной диссертационной работы – Хантимирова Лейсан Маратовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 - вирусология и 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв обсужден и одобрен 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 11 ноября 2019г. (Протокол № 7).

Соискатель Хантимирова Л.М. по теме диссертации имеет 20 печатных работ, 4 из которых – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК:

1. Хасанова Л.М., Ильина А.В., Варламов В.П., Сеницына О.А., Сеницын А.П. Деполимеризация хитозана с использованием ферментного комплекса, продуцируемого *Myceliophthora sp.* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – № 4. – С. 422-428.
2. Хантимирова Л.М., Каширина О.С., Черникова М.И., Васильев Ю.М. Сравнительная оценка иммуногенности охарактеризованных препаратов на основе хитозана и других адъювантов в составе инактивированных вакцин против гриппа // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2016. – № 1. – С. 86-92.
3. Хантимирова Л.М., Каширина О.С., Черникова М.И., Васильев Ю.М. Адъювантный эффект препаратов на основе хитозана в составе инактивированной вакцины против гриппа человека // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2016. – № 3. – С. 170-172.

4. Лисюкова Ю.В., Сироткин А.С., Хантимирова Л.М. Анализ процесса гидролиза хитозана с использованием ферментного препарата грибного происхождения, продуцируемого *Myceliophthora fergusi* // Вестник технологического университета. – 2016. – № 10. – С. 147-148.

Патенты

1. Варламов В.П., Дрозд Н.Н., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Логвинова Ю.С., Хантимирова Л.М. Антиагрегантное средство // Патент на изобретение РФ №2647366 от 12.04.2017.

2. Хантимирова Л.М., Васильев Ю.М., Каширина О.С., Черникова М.С., Калошин А.А., Михайлова Н.А., Ильина А.В., Лопатин С.А., Варламов В.П. Иммуноадьювантная композиция для вакцин против инфекционных агентов вирусной и бактериальной природы // Патент на изобретение РФ №2697527 от 15.08.2019.

На диссертацию и автореферат также поступили следующие отзывы:

1. Отзыв на автореферат, составленный старшим научным сотрудником, кандидатом биологических наук Черниковой Натальей Константиновной и научным сотрудником, кандидатом медицинских наук Нимирской Светланой Александровной Федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. Отзыв положительный, содержит замечания:

1.1. В ряде случаев, в том числе в названии диссертации, соискателем неправомочно употреблен термин «инактивированные вакцины против гриппа», поскольку, как указано самим автором, в работе использовали лишь экспериментальные образцы инактивированных препаратов на основе различных штаммов вируса гриппа;

1.2. так как в диссертации исследуют влияние адьювантной активности хитозана на специфический иммунитет к вирусу гриппа, словосочетание «иммуногенность хитозанов» крайне неудачно, так же как и выражение в

выводе № 6, что он «формирует перекрестный иммунный ответ и полностью защищает животных от инфекции уже после однократной иммунизации»;

1.3. в автореферате не представлены данные о влиянии хитозана на титры вируснейтрализующих антител;

1.4. по тексту встречаются неудачные стилистические выражения: «вакцины не лишены ряда ограничений», «среди новых направлений следует отметить хитозан», «разработка хитозана для биомедицинского применения», «вирус нарабатывали в куриных эмбрионах».

2. Отзыв на автореферат, составленный доктором ветеринарных наук Денисенко Виктором Николаевичем, профессором кафедры диагностики болезней, терапии акушерства и репродукции животных Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина». Отзыв положительный, вопросов и замечаний нет.

3. Отзыв на автореферат, составленный доктором биологических наук, профессором Карповой Ольгой Вячеславовной, заведующей кафедрой вирусологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Отзыв положительный, содержит замечание:

3.1. К сожалению, прочтение автореферата затрудняет присутствие очень большого количества сокращений, не всегда оправданных.

4. Отзыв на автореферат, составленный доктором биологических наук Албуловым Алексеем Ивановичем, заведующим отделом получения биологически активных веществ Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности». Отзыв положительный, вопросов и замечаний нет.

5. Отзыв на автореферат, составленный кандидатом биологических наук Коноваловой Марией Владимировной, научным сотрудником лаборатории

клеточных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук. Отзыв положительный, вопросов и замечаний нет.

6. Отзыв на автореферат, составленный доктором медицинских наук Кофиади Ильей Андреевичем, заведующим лабораторией молекулярной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства. Отзыв положительный, вопросов и замечаний нет.

7. Отзыв на автореферат, составленный доктором медицинских наук Кубарь Ольгой Иосифовной, ведущим научным сотрудником лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Отзыв положительный, вопросов и замечаний нет.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обоснован их высокой квалификацией в области вирусологии, вакцинопрофилактики и биотехнологии, заинтересованностью в тематике научного исследования, собственными достижениями в данной отрасли науки, наличием большего 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 изучена** иммуноадьювантная активность охарактеризованных образцов хитозана и его производных с различными ФХХ на модели инактивированных вирусов гриппа при внутримышечной иммунизации мышей в рамках прямых сравнительных исследований.

- **впервые получены** данные о том, что хитозан с различными ФХХ при добавлении к инактивированным вирусам гриппа A/California/07/2009 Х-179А (H1N1), A/Vietnam/1194/2004 NIBRG-14 (H5N1) и A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) при внутримышечном введении мышам обладает неодинаковой адьювантной активностью.
- **впервые показано,** что наиболее выраженными адьювантными свойствами обладали образцы хитозана с высокой ММ и СД.
- **впервые подобраны** оптимальные условия ферментативного способа получения низкомолекулярного хитозана с молекулярной массой (ММ) 10 кДа, степенью деацетилирования (СД) 85% с использованием ферментного препарата, продуцируемого мицелиальным грибом *Myceliophthora fergusonii* UV-64 ВКМ F-3932D.
- **впервые получен** набор охарактеризованных образцов хитозана с различными физико-химическими характеристиками (ФХХ) в широком диапазоне ММ от 10 до 700 кДа, СД от 30 до 98% при высокой однородности (с низким индексом полидисперсности 1.9-2.3) и чистоте (с низким содержанием остаточного белка и бактериальных эндотоксинов).
- **продемонстрировано,** что адьювантные свойства хитозана превышают соответствующие свойства гидроксида алюминия и CpG, и сравнимы с адьювантами в виде суспензии и эмульсии по типу «масло в воде» на основе сквалена.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

- **доказано,** что адьювантные свойства хитозана при введении инактивированных вирусов гриппа A/California/07/2009 Х-179А (H1N1), A/Vietnam/1194/2004 NIBRG-14 (H5N1) и A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) зависят от физико-химических характеристик биополимера, а именно ММ и СД.
- **доказано,** что хитозан с высокой молекулярной массой и высокой степенью деацетилирования – 700 кДа, СД 85% обладает наиболее выраженными адьювантными свойствами.

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

- **применение результатов** работы будет заключаться в возможности

дальнейшей разработки адьюванта на основе высокомолекулярного хитозана с ММ 700 кДа, СД 85% с целью применения при изготовлении вакцин против гриппа и других актуальных инфекционных агентов человека, а также в производстве ветеринарных вакцин.

- **позволяют рекомендовать ферментативный способ гидролиза высокомолекулярного хитозана с использованием ферментного препарата, продуцируемого мицелиальным грибом *Myceliophthora fergusii* UV-64 ВКМ F-3932D, для получения низкомолекулярного хитозана для биомедицинского применения.**

Достоверность результатов исследования подтверждается:

- **значительным объемом исследований, адекватными размерами групп экспериментальных животных, анализом большого массива данных, полученных в ходе экспериментов, и их научно обоснованной интерпретацией.**

- **результаты подтверждаются статистической обработкой данных исследований с использованием программного пакета SPSS Statistics версия 22 компании IBM.**

- **при проведении исследований в работе были использованы современные вирусологические, серологические и иммунологические методы.**

- **при определении физико-химических характеристик хитозана работе были использованы современные аналитические (кондуктометрической титрование, капиллярная вискозиметрия) и спектральные методы анализа (УФ-спектроскопия, протонный магнитный резонанс, высокоэффективная жидкостная хроматография).**

Личный вклад соискателя состоит в самостоятельном планировании и выполнении всех основных лабораторных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов. Автором лично получены образцы хитозана с различными физико-химическими характеристиками с использованием ферментативного гидролиза и реацетилирования высокомолекулярных хитозанов отечественного производства, охарактеризованы экспериментально полученные и коммерческие образцы хитозана с использованием различных физико-химических методов анализа. Также автором получены вирусные препараты и прототипы вакцин на их основе, определена иммуногенность и защитный эффект

экспериментальных вакцин. Автор лично участвовал во всех этапах исследований, планировании опытов, отборе материалов, воспроизведении экспериментов на лабораторных животных, обработке, анализе и обобщении полученных материалов с последующей их публикацией и презентацией.

На заседании от 03 декабря 2019 года диссертационный совет Д 001.043.01 постановил, что диссертация Хантимировой Лейсан Маратовны «Получение хитозана, его производных, изучение их физико-химических характеристик и иммуноадъювантной активности в составе инактивированных вакцин против гриппа» представляет собой научно-квалификационную работу, соответствующую требованиям п. 9-11 «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), и принял решение **ПРИСУДИТЬ** Хантимировой Лейсан Маратовне ученую степень кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 – вирусология и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

При проведении тайного голосования, диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 12 докторов наук по специальности 03.02.02 – вирусология, 3 дополнительных члена, введенных на разовую защиту, из них 3 доктора наук по специальности 03.01.06 — биотехнология (т.ч. бионанотехнология), участвовавших в заседании, проголосовали:

За присуждение ученой степени – 13.

Против – 3.

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 декабря 2019 г.