

## ОТЗЫВ

**официального оппонента, доктора медицинских наук  
Бурцевой Елены Ивановны на диссертационную работу Крутиковой Елены  
Витальевны «Оптимизация живой гриппозной вакцины для ее применения у детей в  
возрасте 1-3 лет», представленную на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук по специальности «03.02.02 - вирусология»**

**Актуальность темы диссертационного исследования.** Диссертационная работа Крутиковой Е.В. посвящена актуальной проблеме – конструированию живой гриппозной вакцины для детей младшего возраста.

Общеизвестным и доказанным многими исследователями остается факт, что вакцинация признана наиболее эффективным и экономически оправданным методом специфической профилактики гриппа, направленным на охрану здоровья населения, а также снижению риска инфицирования, развития тяжелых форм клинического течения, осложнений и летальности.

В России, как ни в какой другой стране мира, спектр гриппозных вакцин представлен достаточно широко и включает живую (ЖГВ) и инактивированные вакцины (ИГВ) разных поколений. Каждая из вакцин имеет свои преимущества и недостатки, которые необходимо учитывать в выборе целевых групп для более безопасной и эффективной профилактики.

Исследования по разработке и подготовке вакцинных штаммов для ЖГВ, проводимые сотрудниками отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, можно считать приоритетными не только для нашей страны, но и других стран мира. В рамках договора с ВОЗ технология производства ЖГВ была передана в Индию и Китай, где эти вакцины успешно применяют для профилактики гриппа в настоящее время.

Неоспоримым преимуществом ЖГВ перед ИГВ является формирование более широкого спектра иммунологической защиты во входных воротах инфекции со стимуляцией тех же звеньев иммунного ответа, что и при естественном инфицировании.

Современный эпидемический процесс определил группы населения, которые в первую очередь должны быть защищены от гриппа. Одна из таких групп – это дети от 0 до 3 лет, в отношении которых регистрируют наиболее высокую заболеваемость и, в тоже время, спектр препаратов для профилактики и лечения в отношении этой возрастной группы ограничен. Примером могут служить рекомендации по применению ЖГВ у детей, начиная



с 3-х летнего возраста по причине не проведения таких исследований у младших детей с донора В/СССР/60/69 для вакцинных штаммов вируса гриппа В.

Вторая особенность, о которой необходимо упомянуть и учитывать при конструировании гриппозных вакцин, состоит в социркуляции двух эволюционных линий вируса гриппа В – В/Виктория-подобных и В/Ямагата-подобных, которые разобщены по антигенным и генетическим свойствам, и трудно прогнозируемы по активности в период подъемов заболеваемости. С этим связывают и низкую эффективность профилактики с помощью трехвалентных вакцин в сезонах при несовпадении вакцинного и эпидемического вирусов гриппа В (пример сезона 2017-2018гг.).

Одним из перспективных вакцинных штаммов вируса гриппа В в составе ЖГВ для детей 1-3 лет, как предполагает автор работы, мог бы стать холодоадаптированный штамм В/Ленинград/14/17/55 (В14), более аттенуированный, чем используемый в настоящее время донор В/СССР/60/69. Ограниченные исследования этого донора были проведены в 1980-е годы, но к началу проведения автором исследований в рамках настоящей работы оставался ряд нерешенных вопросов. В частности отсутствие информации о конкретных генетических позициях, ответственных за аттенуацию.

Все вышесказанное определило цель и задачи диссертационной работы Крутиковой Е.В., которые были направлены на разработку современного донора аттенуации вируса гриппа В для включения его в состав ЖГВ для маленьких детей и изучение спектра ее протективной активности.

**Научная новизна исследования.** Впервые был клонирован донор В/Ленинград/14/17/55, установлена его генетическая и аминокислотная последовательность. Выявлена роль генов PB2 и PA в формировании его аттенуирующего фенотипа. Показана бóльшая аттенуация клонированного донора В14/710 по сравнению с официально применяемым донором В/СССР/60/69, установлена его безопасность и иммуногенность на модели мышей.

Модифицирован быстрый и мало затратный способ анализа генома реассортантов вируса гриппа В с помощью пиросеквенирования. Показано, что используя метод пироанализа на этапе первого клонирования, можно выявить реассортанты с наименьшим наличием смесей в генах, что позволяет выбрать их как перспективные варианты для последующего клонирования и значительно сократить срок подготовки штаммов ЖГВ (в два и более раз) по сравнению с методом секвенирования по Сэнгеру.

Впервые на модели хорьков подтверждена перекрестная протективная активность моновалентной и трехвалентной ЖГВ в отношении генетически удаленных штаммов



вируса гриппа В. Установлено, что вакцинация трехвалентной ЖГВ, в состав которой входил штамм линии В/Виктория-подобных, защищала хорьков от последующего заражения как гомологичной линией вируса гриппа В, так и гетерологичной – линией В/Ямагата-подобных.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций.** Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, поскольку основана на большом материале исследований и подтверждена статистическим анализом данных. Так, например, для изучения роли генов в аттенуации клонированного донора В14/710, автором подготовлено и проанализировано более трехсот реассортантов между донором и эпидемическими вирусами, относящимся к разным генетическим линиям вируса гриппа В. Положения, выносимые на защиту, а также выводы подкреплены большим массивом полученных данных, представленных в тексте диссертационного материала.

**Практическая и научная значимость результатов диссертации.** В результате выполненного диссертационного исследования был решен ряд фундаментальных задач. В частности, получена и детально охарактеризована чистая популяция резервного донора аттенуации В14/710, содержащая на 10 кодирующих мутаций больше, чем у донора В/СССР/60/69. Большую практическую ценность представляет собой ряд экспериментов, показывающих, что донор В14/710 более аттенуирован, чем вирус В/СССР/60/69, что делает его перспективным для ЖГВ, предназначенной для детей в возрасте одного года и старше.

Важным результатом проведенного исследования является установка вклада отдельных мутантных генов донора В/Ленинград/14/17/55 в формирование его температурочувствительного фенотипа и аттенуации для лабораторных животных.

В доклинических исследованиях на хорьках установлено, что современная трехвалентная ЖГВ способна защищать от генетически разных линий вируса гриппа В.

Модификация метода пиросеквенирования для вирусов гриппа В также представляет большой практический интерес, так как его применение в 2-3 раза ускоряет и удешевляет процесс подготовки штаммов ЖГВ.

**Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах.** Результаты проделанной работы были представлены на 14 международных и российских конференциях: на XIX-XXII-й Международной медико-биологической конференции



молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье» (СПб, 2016-2019); на XX--XXIII-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, 2016-2019); на XXI-XXII-й Санкт-Петербургской ассамблее молодых ученых и специалистов «Правительство Санкт-Петербурга комитет по науке и высшей школе» (СПб, 2016, 2019); на IX-X-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика» (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).

По теме диссертации опубликована 41 научная работа, из них 15 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ или входящих в международные системы цитирования и реферативные базы данных Web of Science и/или Scopus и 22 тезиса, опубликованных в материалах российских и международных конференций. Получен 1 патент на изобретения РФ.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа содержит введение, основную часть, включающую обзор литературы, материалы и методы, четыре главы собственных исследований, обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 101 странице машинописного текста, включает 24 таблицы и 10 рисунков. Список цитируемой литературы состоит из 193 источников, из них 34 отечественных и 159 иностранных работ.

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, «Обзор литературы»,** автор проводит анализ научных публикаций по структуре вириона и геному вирусов гриппа А, В, С и D; особенностям репликации в чувствительной клетке; механизмам изменчивости и аттенуации, роли отдельных генов, результатам испытания доноров аттенуации для В-вакцинного штамма в составе ЖГВ, в том числе, на модели разных животных (мыши, морские свинки, хорьки, обезьяны).

**Вторая глава, «Материалы и методы»,** содержит данные по спектру методов, использованных автором в процессе выполнения работы. В частности – вирусологические



(культивирование вирусов, определение ts и sa фенотипа вируса гриппа, подготовка реассортантных вакцинных штаммов); методы работы с лабораторными животными; серологические; молекулярно-биологические (ПЦР, пиросеквенирование, секвенирование последовательности сегментов генома); статистические.

**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», представлены результаты исследований, позволившие отобрать и фенотипически охарактеризовать чистый клон В14/710 холодоадаптированного донора В/Ленинград/14/17/55.

**Четвертая глава**, «Экспресс-скрининг реассортантов вируса гриппа типа В методом пиросеквенирования», содержит результаты генотипирования реассортантов вируса гриппа В, подготовленных на основе актуальных эпидемических вирусов и доноров аттенуации (В/СССР/60/69 и В/Ленинград/14/17/55) с применения модифицированного автором нового метода, основанного на технологии пиросеквенирования.

**Глава 5**, «Молекулярно-генетические основы аттенуации реассортантных штаммов вируса гриппа В». В ходе выполнения этой главы были получены реассортантные штаммы вирусов гриппа В на основе альтернативного донора и определена роль генов и мутаций в формировании температурочувствительного фенотипа и аттенуирующих свойств. Выявлена более высокая аттенуация одногенного реассортанта В14-60, достоверно превышающая таковую родительских доноров.

**Глава 6**, «Перекрестная протективность живой гриппозной вакцины, содержащей антигенно отличающиеся линии вируса гриппа В» посвящена оценке прививочных свойств реассортантных вакцинных штаммов, подготовленных на основе базового донора аттенуации В/СССР/60/69 на модели животных (хорьки). Представленные в главе данные показали, что после однократной иммунизации как моно-, так и трехвалентной вакцинами формировался защитный иммунитет не только к гомологичным, но и гетерологичным штаммам вируса гриппа В. Автор связывает эту защиту с локальным или клеточно-опосредованным иммунным ответом у животных, ссылаясь на отсутствие такового при постановке вирусов гриппа В/Виктория- и В/Ямагата подобных в перекрестной реакции с референс-сыворотками в РТГА.

Выводы и перспективы дальнейшей разработки темы, рекомендации составлены четко и обосновано вытекают из материалов диссертации.

Автореферат диссертации полностью отражает основные положения диссертационной работы.



### **Замечания, вопросы.**

Автор сконструировал перспективный реассортант В14-60 двух холодоадаптированных донорских штаммов (В/СССР/60/69 и В/Ленинград/14/17/55), обладающий еще более высоким аттенуирующим потенциалом, чем не только донор В/СССР/60/69, применяемый в производстве коммерческой вакцины, но и донор В/Ленинград/14/17/55, детальной характеристике которого посвящена диссертационная работа и который автор предлагает использовать при подготовке варианта ЖГВ для возрастной категории от 1 года до 3 лет. В этой связи возникает вопрос - почему в качестве потенциального донора детского варианта ЖГВ из соображений безопасности не предполагается использование наиболее аттенуированного холодоадаптированного вируса В14-60?

В диссертационной работе существенных недостатков не выявлено, однако присутствуют немногочисленные опечатки и неточности, в частности, автор дал название клонированному варианту резервного донора аттенуации В/Ленинград/14/17/55 как В14/710, однако на 3, 44, 45, 54, 57 и 84 страницах название дано как В/14/710. Тем не менее, найденные опечатки не снижают общего благоприятного впечатления от проделанной автором работы.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.**

В работе Крутиковой Елены Витальевны «Оптимизация живой гриппозной вакцины для ее применения у детей в возрасте 1-3 лет» была продемонстрирована перспективность использования В/Ленинград/14/17/55 как донора внутренних генов для подготовки ЖГВ для детей в возрасте 1-3 лет. Молекулярно-биологическими методами представлена недостающая характеристика штамма В/Ленинград/14/17/55 как современного донора аттенуации. Модифицирована тест-система пиросеквенирования, позволяющая оперативно и экономически выгодно проанализировать реассортанты вирусов гриппа В по принадлежности генов к родительским штаммам. Продемонстрирована перекрестная защита современной трехвалентной ЖГВ.

Таким образом, диссертация Крутиковой Е.В. является научно-квалифицированной работой, в которой решены научные проблемы, имеющие важное практическое значение, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, утвержденным 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 наук, а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 - вирусология.



Отзыв обсужден и одобрен на заседании Отдела экологии вирусов с научно-практическим центром по экологии и эпидемиологии гриппа федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол № 07 от «11» ноября 2019 года.

Официальный оппонент: доктор медицинских наук (03.02.02 – вирусология, 14.02.02 – эпидемиология), руководитель лаборатория этиологии и эпидемиологии гриппа, федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Бурцева Елена Ивановна

«19» ноября 2019 г.

Адрес: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, дом 18

тел. (499)193-3001

факс (499)193-6183

e-mail: elena-burtseva@yandex.ru

<http://www.gamaleya.org>

