

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр фундаментальной
и трансляционной медицины»
(ФИЦ ФТМ)**

Тимакова ул., д. 2, Новосибирск, 630117

Тел./факс (383) 333-65-37

E-mail: director@centercem.ru

<http://www.frcftm.ru>

ОКПО 49738378; ОГРН 1025403653538;

ИНН/КПП 5408157430/540801001

от 18.11.2019г. № 01-05/042/1

На № _____ от _____

Утверждаю

Врио директора ФИЦ ФТМ

академик РАН, д.м.н., профессор



М.И. Воевода

2019г

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертационной работы 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» в диссертационный совет Д 001.043.01 при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ. Грипп остается одной из важных и наиболее распространенных вирусных инфекций, ежегодные эпидемии которой приводят к миллионам случаев заболевания в мире. Несмотря на разнообразие существующих на сегодняшний момент профилактических средств, вакцинопрофилактика остается эффективным и надежным средством защиты населения против вируса гриппа. На практике применяются как живые (ЖГВ), так и инактивированные противогриппозные вакцины (ИГВ). Современная инактивированная гриппозная вакцина применяется у взрослых и у детей с 6 месяцев, а живая вакцина - у взрослых и у детей только начиная с 3 лет, поэтому, разработка донора аттенуации для подготовки штаммов ЖГВ для детей от одного года до трех лет на сегодняшний день является важной и актуальной задачей.

Оптимальным вариантом для подготовки ЖГВ для маленьких детей является холодоадаптированный штамм В/Ленинград/14/17/55 (В14), который более аттенуированный, чем базовый донор В/СССР/60/69. К тому же этот штамм уже

прошел клинические испытания на детях от одного года и старше. Многократные исследования штамма В/Ленинград/14/17/55 проведенные в 1970-1990 гг. показали его высокую иммуногенность и безопасность для маленьких детей, а его дополнительная характеристика, представленная в работе Крутиковой Е.В., делает штамм перспективным кандидатом в доноры «детского» варианта ЖГВ.

Кроме того, повсеместная социркуляция двух генетически удаленных линий вируса гриппа В является глобальной проблемой и может стать причиной низкой эффективности вакцинации, поскольку в состав современной трехвалентной гриппозной вакцины входит лишь один антигенный вариант вируса гриппа В. В настоящее время особое внимание уделяется созданию и применению четырехвалентной вакцины и - как альтернатива - изучению перекрестной защиты трехвалентной вакцины.

В диссертационной работе Крутиковой Е.В. поставлены две глобальные задачи:

1. разработка современного донора аттенуации В/Ленинград/14/17/55 для подготовки штаммов ЖГВ для маленьких детей;
2. изучение перекрестной протективности современной трехвалентной ЖГВ.

В связи с этим, диссертационная работа Крутиковой Е.В., посвященная проблемам усовершенствования современной живой гриппозной вакцины, бесспорно, является актуальной как с теоретической, так и практической точки зрения.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ. В работе Крутиковой Е.В. дана детальная характеристика альтернативного донора аттенуации В14. Автором впервые был клонирован этот донор и установлена его нуклеотидная и аминокислотная последовательность. Выявлена роль PB2 и PA генов в формировании аттенуирующего фенотипа донора В14. Показана более выраженная аттенуация донора В14 по сравнению с официально применяемым донором В/СССР/60/69. Установлена безопасность и иммуногенность клонированного донора В14 в экспериментах на мышах.

Модифицирован быстрый и малозатратный способ анализа генома реассортантов вируса гриппа В пиросеквенированием. Показано, что используя метод пиро-анализа, уже на ранних этапах реассортации можно выявить штаммы с

наименьшим наличием смеси в генах, позволяющие выбрать их как перспективные и значительно сократить срок подготовки вакцинных штаммов ЖГВ. Использование метода пиросеквенирования при анализе состава генома реассортантов позволяет сократить срок анализа в два раза по сравнению с классическим методом секвенирования по Сэнгеру.

В экспериментах на хорьках впервые установлена перекрестная протективность моновалентной и трехвалентной ЖГВ в отношении генетически удаленных штаммов вируса гриппа В.

Установлено, что вакцинация трехвалентной ЖГВ, в состав которой в качестве В компонента входит вакцинный штамм линии З/Виктория, наиболее эффективна и вакцина защищает хорьков от последующего заражения как гомологичной линией вируса гриппа В, так и гетерологичной.

СТЕПЕНЬ ОБОСНОВАННОСТИ И ДОСТОВЕРНОСТИ НАУЧНЫХ ПОЛОЖЕНИЙ, ВЫВОДОВ И РЕКОМЕНДАЦИЙ. Работа выполнена на высоком методическом уровне с применением современных вирусологических, молекулярно-биологических, серологических методов исследования и основана на значительном количестве данных, полученных в ходе исследований. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Так, например, для изучения роли генов в аттенуации штамма В14, автором подготовлено и проанализировано более трехсот реассортантов между донором В14 и эпидемическими вирусами, относящимся к разным генетическим линиям. Положения, выносимые на защиту, а также выводы подкреплены большим количеством полученных данных, представленных в тексте диссертации.

ПРАКТИЧЕСКАЯ И НАУЧНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ. В результате выполненного диссертационного исследования был решен ряд фундаментальных задач:

1. Получена и детально охарактеризована чистая популяция резервного донора аттенуации В14, содержащая на 10 кодирующих мутаций больше, чем у донора В/СССР/60/69.

2. Показано что донор В14 более аттенуирован, чем донор В/СССР/60/69, и это делает его перспективным донором аттенуации штаммов ЖГВ, предназначенной для детей в возрасте одного года и старше.

3. В результате проведенных исследований установлен вклад отдельных мутантных генов донора В/Ленинград/14/17/55 в формирование его температурочувствительного фенотипа и аттенуирующих свойств для лабораторных животных.

4. В доклинических исследованиях на хорьках установлена способность защиты современной трехвалентной ЖГВ от двух разных генетических линий вируса гриппа В.

5. Модифицирован метод пиросеквенирования для вирусов гриппа который позволяет в 2-3 раза ускорить и удешевить процесс подготовки штаммов для ЖГВ.

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ДОСТАТОЧНОЙ ПОЛНОТЫ ПУБЛИКАЦИЙ ОСНОВНЫХ ПОЛОЖЕНИЙ, РЕЗУЛЬТАТОВ, ВЫВОДОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЯ ДИССЕРТАЦИИ. По теме диссертации опубликована 41 работа, из них - 19 статей (15 статей, в журналах рекомендованных ВАК РФ или входящих в международные системы цитирования и реферативные базы данных Web of Science и/или Scopus; 4 статьи в других журналах) и 22 тезиса российских и международных конференций. Получен 1 патент на изобретения РФ. Результаты проделанной работы были представлены на 14 международных и российских конференциях.

Таким образом, основные результаты и положения диссертации, выводы и заключение полностью отражены в научных статьях и материалах профильных научных форумов.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ. Работа изложена на 101 странице машинописного текста, включает 24 таблицы и 10 рисунков. Список цитируемой литературы включает 193 источника, из них 34 отечественных и 159 иностранных.

Диссертационная работа содержит введение, основную часть, включающую обзор литературы, материалы и методы, собственные исследования, обсуждение, заключение, выводы и список литературы.

Во «Введении» обоснована актуальность и степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость данной работы, приведены основные положения, выносимые на защиту, описан личный вклад автора при выполнении текущего исследования и внедрение результатов работы в практику.

В «Обзоре литературы» автор информативно изложил теоретические и практические предпосылки данного исследования.

В «Материалах и методах» дается краткое описание использованных в работе вирусологических, серологических и молекулярно-генетических методов исследования, а также программ статистической обработки и анализа полученных данных.

«Результаты собственных исследований» содержат описание подготовки чистой линии потенциального донора живой гриппозной вакцины для детей в возрасте от 1 года до 3 лет и дана всесторонняя характеристика этого донора, подтверждающая преимущества его использования по сравнению с донором современной коммерческой вакцины. Отдельным и важным фрагментом работы является хорошо документированное доказательство возможности применения трехвалентной живой гриппозной вакцины в случае несовпадения вакцинных и циркулирующих штаммов вируса гриппа типа В.

В «Обсуждении» проведен критический анализ собственных данных и обсуждение их в контексте с имеющимися данными литературы.

«Заключение» подводит итоги проведенных исследований.

Сделанные автором выводы из проведенных исследований полностью соответствуют поставленным цели и задачам, отражают суть полученных в ходе работы данных, что свидетельствует о законченности работы.

КОНКРЕТНЫЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ. Автором проведено доклиническое изучение потенциального нового донора живой гриппозной вакцины для самых маленьких детей. Применение такого «детского»

варианта вакцины позволит заполнить закрытую в настоящее время для живой гриппозной вакцины возрастную нишу (дети 1-3 лет).

Продемонстрированная перекрестная защита трехвалентной живой гриппозной вакцины в отношении антигенно удаленных линий вируса гриппа В расширяет возможности применения этого препарата, позволяя осуществлять вакцинацию даже в случае несовпадения циркулирующих и вакцинных вирусов гриппа В.

Разработанная модификация метода оценки генома реассортантных штаммов вируса гриппа с помощью пиросеквенирования используется в отделе вирусологии им. А.А.Сморозинцева ФГБНУ «ИЭМ» для экспресс-диагностики состава генома вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины и в научных целях.

СООТВЕТСТВИЕ АВТОРЕФЕРАТА СОДЕРЖАНИЮ ДИССЕРТАЦИИ.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

ЗАМЕЧАНИЯ И ВОПРОСЫ. В диссертационной работе существенных недостатков не выявлено, однако присутствуют немногочисленные опечатки и неточности, что не умаляет общего благоприятного впечатления от проделанной автором работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Диссертационная работа Крутиковой Елены Витальевны «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 фактический материал и содержится решение актуальных научно-практических задач: продемонстрирована перспективность использования штамма В/Ленинград/14/17/55 как донора внутренних генов для подготовки штаммов 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 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, (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 биологических наук, а ее автор, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 - вирусология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании отдела экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний НИИ экспериментальной и клинической медицины, структурного подразделения ФИЦ ФТМ (протокол № 6 от 19 ноября 2019 года).

Отзыв составил: Шестопалов Александр Михайлович, доктор биологических наук (03.03.02 - вирусология), профессор, главный научный сотрудник, руководитель отдела экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний НИИ экспериментальной и клинической медицины, структурного подразделения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

А.М. Шестопалов

630117, Новосибирск, улица Тимакова, 2
Тел.: 8-905-932-64-76; e-mail: shestopalov2@ngs.ru



Личную подпись *Шестопалова А.М.*
Заверяю
Начальник отдела кадров *Михеева О.М.*
20__ г.