

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 21.1.017.01  
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 02 декабря 2025 года № 6 о присуждении Шуклиной Марине Александровне ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Иммуногенность и кросс-протективность химерных белков, включающих консервативные участки гемагглютинаина, нуклеопротеина и белка М2 вирусов гриппа А» по специальности 1.5.10 – вирусология принята к защите 17 сентября 2025 года, протокол № 2, диссертационным советом Д 21.1.017.01 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 Шуклина Марина Александровна, 1992 года рождения, в 2015 году закончила магистратуру Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого по специальности 03.04.01 Прикладные математика и физика, работает научным сотрудником в лаборатории иммунобиологических технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Диссертационная работа выполнена в лаборатории иммунобиологических технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

**Цыбалова Людмила Марковна**, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиологических технологий ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Официальные оппоненты:

**Ленёва Ирина Анатольевна** – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова»

**Шмаров Максим Михайлович** – доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи»

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – **Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»** Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, в своем положительном отзыве, составленном и подписанным Дедковым Владимиром Георгиевичем – кандидатом биологических наук, заместителем директора по научной работе указал, что диссертационная работа Шуклиной Марины Александровны на тему «Иммуногенность и кросс-протективность химерных белков, включающих консервативные участки гемагглютинина, нуклеопротеина и белка М2 вирусов гриппа А» представляет собой самостоятельно выполненную и законченную научно-квалификационную работу, по актуальности, объему проведенных исследований, методическому уровню, научной ценности и практической значимости отвечающую требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г.(с изменениями в ред. Постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г.; №1024 от 28.08.2017г.; №1168 от 01.01.2018 г.; №426 от 20.03.2021г. с изменениями в действующей редакции от 18.03.2023г.),

предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Шуклина Марина Александровна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 - «Вирусология».

Соискатель имеет 23 печатные работы: 13 научных статей в журналах, входящих в Перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ, 10 тезисов докладов. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

В статьях «Combination of M2e peptide with stalk HA epitopes of influenza A virus enhances protective properties of recombinant vaccine» (1) и «Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces potent humoral and T-cell responses and protects mice against various influenza viruses a subtypes» (2) показана иммуногенность и протективная эффективность рекомбинантных белков, включающих фрагмент второй субъединицы гемагглютинина и копии эктодомена белка M2, а также биологическая активность флагеллина, как лиганда TLR5 в составе рекомбинантных белков. Эти данные были изложены в главе 4 Результаты (разделы 4.1.3. и 4.2.1.). В разделе 4.2.2. главы Результаты представлены данные, изложенные в статье «Влияние порядка присоединения фрагментов HA2 и M2e вирусов гриппа А к флагеллину на свойства рекомбинантных белков» (3). В этой статье показано, что при конструировании рекомбинантных белков порядок присоединения целевых антигенов оказывает существенное влияние на иммуногенность конструкции. Результаты по иммуногенности конструкции с включением CTL-эпитопов белка NP (раздел 4.2.3.) представлены в статье «Inserting CTL epitopes of the viral Nucleoprotein to improve immunogenicity and protective efficacy of recombinant protein against influenza A virus» (4), в которой показано, что включение дополнительных антигенов (консервативные эпитопы белка NP) в конструкцию приводило к снижению специфического антительного и Т-клеточного иммунного ответа к M2e и фрагменту гемагглютинина, но при этом не сказывалось отрицательно на защитных свойствах конструкции.

Активация кандидатным белком Flg-HA2-4M2e врожденного иммунитета описана в статье «Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces innate and T-cell responses in mice of different genetic lines» (5) и представлена в разделе 4.2.6. главы 4 Результаты. Усиление M2e-специфического серологического ответа у иммунизированных рекомбинантным белком мышей после гриппозной инфекции (раздел 4.2.5.) описано в статье «Интраназальная иммунизация рекомбинантным белком на основе M2e-пептида и фрагмента второй субъединицы гемагглютинирина вирусов гриппа А индуцирует кросс-протективный гуморальный и Т-клеточный ответ у мышей» (6).

Наиболее значимые работы:

1. Tsybalova L. M., Stepanova L. A., **Shuklina M. A.**, Mardanova E. S., Kotlyarov R. Y., Potapchuk M. V., Ravin N. V. (2018). Combination of M2e peptide with stalk HA epitopes of influenza A virus enhances protective properties of recombinant vaccine. PLoS One, 13(8), e0201429.
2. Stepanova L. A., Mardanova E. S., **Shuklina M. A.**, Blokhina E. A., Kotlyarov R. Y., Potapchuk M. V., Ravin N. V. (2018). Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces potent humoral and T-cell responses and protects mice against various influenza viruses A subtypes. Journal of biomedical science, 25(1), 33.
3. Степанова, Л. А., Котляров, Р. Ю., **Шуклина, М. А.**, Блохина, Е. А., Сергеева, М. В., Потапчук, М. В., Цыбалова, Л. М. (2018). Влияние порядка присоединения фрагментов HA2 и M2e вирусов гриппа А к флагеллину на свойства рекомбинантных белков. *Acta Naturae (русскаяязычная версия)*, 10(1 (36)), 90-100.
4. **Shuklina, M.**, Stepanova, L., Ozhereleva, O., Kovaleva, A., Vidyaeva, I., Korotkov, A., Tsybalova, L. (2024). Inserting CTL Epitopes of the Viral Nucleoprotein to Improve Immunogenicity and Protective Efficacy of Recombinant Protein against Influenza A Virus. *Biology*, 13(10), 801.

5. Stepanova, L. A., **Shuklina, M. A.**, Vasiliev, K. A., Kovaleva, A. A., Vidyaeva, I. G., Zabrodskaya, Y. A., Tsybalova, L. M. (2022). Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces innate and T-Cell responses in mice of different genetic lines. *Vaccines*, 10(12), 2098.

6. **Шуклина, М. А.**, Степанова, Л. А., Ковалева, А. А., Коротков, А. В., Шалджян, А. А., Зайцева, М. В., Цыбалова, Л. М. (2020). Интраназальная иммунизация рекомбинантным белком на основе М2е-пептида и фрагмента второй субъединицы гемагглютинина вирусов гриппа А индуцирует кросс-протективный гуморальный и Т-клеточный ответ у мышей. *Медицинская иммунология*, 22(2), 357-370.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Доктора биологических наук, заведующего лабораторий экспериментальной вирусологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Леновой Ирины Анатольевны. Отзыв положительный, но имеются замечания и два вопроса. Автор отзыва задает вопросы: в чем помимо широкого спектра эффективности в отношении различных штаммов вируса гриппа преимущества предлагаемой диссертантом вакцины и какой путь введения, по мнению диссертанта, будет более предпочтительным в случае внедрения вакцины в клиническую практику. В замечаниях отмечает отсутствие подробного описания вирусов, используемых для заражения мышей, информации об используемой ИГВ в опыте по комбинированной вакцинации. Автор отзыва отмечает, что возникшие вопросы и замечания ни в коей мере не снижают значимость и ценность работы.

2. Доктора биологических наук, заведующего лабораторией биотехнологии ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Шмарова Максима Михайловича. Отзыв положительный. Автор отзыва задает вопрос, о том какой способ введения кандидатной вакцины планируется исследовать в клинических исследованиях. Имеется замечание

об отсутствии перевода надписей на рисунках, представленных в литературном обзоре, на русский язык.

3. Члена-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, заведующего лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, заведующего кафедрой эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Костинова Михаила Петровича. Отзыв положительный, замечаний нет.

4. Доктора биологических наук, заведующего лабораторией систем молекулярного клонирования ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН Равина Николая Викторовича. Отзыв положительный, замечаний нет.

5. Доктора медицинских наук, заведующего отделом вирусологии и иммунологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «Института экспериментальной медицины» Дешевой Юлии Андреевны. Отзыв положительный, замечаний нет.

6. Кандидата биологических наук, советника директора ФГУП СПбНИИВС ФМБА России Аракелова Сергея Александровича. Отзыв положительный, замечаний нет.

7. Кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника научно-исследовательского испытательного отдела ФГБУ «48 Центрального научно-исследовательского института» Министерства Обороны России Плехановой Тамары Михайловны. Отзыв положительный, замечаний нет.

В отзывах подчеркивается актуальность темы проведенного исследования, отмечается, как теоретическая, так и практическая значимость полученных 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 теоретическую и практическую ценность выполненной научно-исследовательской работы и произведен в соответствии с требованиями пункта 22 «Положение о порядке присуждения ученых степеней» №842 от 24.09.2013 г.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека было выбрано в качестве ведущей организации благодаря своему передовому положению в сфере экспериментальной медицины, молекулярной биологии, вирусологии и иммунологии, а также высокому уровню признанных специалистов.

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

**сконструировано** и **охарактеризовано** пять оригинальных рекомбинантных белков на основе флагеллина с включением в разной последовательности целевых антигенов (эктодомен белка M2, фрагмент стеблевой части гемагглютинаина HA2, эпитопы белка NP);

**доказано**, что при встраивании целевых антигенов, как к С-концу, так и взамен гипервариабельного домена, биологическая активность флагеллина, как лиганда TLR5, сохраняется;

впервые **обнаружено** влияние особенностей конструкции на характер иммунного ответа и защиту на модели летальной гриппозной инфекции;

**продемонстрирована** способность белков вызывать выраженный иммунный ответ, как при интраназальном, так и при парентеральном способе введения, а также **охарактеризована** реакция врожденного иммунного ответа;

впервые **сопоставлен** уровень и характер иммунного ответа на рекомбинантный вакцинный белок и его протективная эффективность в отношении гомо- и гетерологичных вирусов (H3N2, H1N1pdm09, H7N9, H5N1, H2N2);

**показана** длительность сохранения M2e-специфических антител в сыворотке мышей после иммунизации рекомбинантными белками;

**выявлено** усиление M2e-специфического серологического ответа у иммунизированных животных после гриппозной инфекции;

**изучено** влияние иммунизации химерным белком на выраженность и характер иммунного ответа при комбинированной вакцинации с ИГВ и при заражении сублетальными дозами вирусов гриппа;

в ходе доклинических исследований **показана** безопасность и специфическая активность новой кандидатной вакцины на хорьках.

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

**показано** существенное влияние порядка присоединения антигенов к белку-носителю на иммуногенность рекомбинантного белка. Полученные данные могут быть использованы при конструировании других химерных белков.

**установлено**, что рекомбинантные белки, несущие консервативные фрагменты белков вируса гриппа обеспечивают полную защиту животных от летальной инфекции в отношении широкого спектра подтипов вируса гриппа.

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

**сформирована** линейка рекомбинантных белков, позволяющая подбирать кандидатный компонент для универсальной противогриппозной вакцины: как в составе комплексного препарата, так и в виде самостоятельной основы. Ключевое преимущество — возможность оперативной модификации или актуализации антигенной вставки в зависимости от актуальных штаммов вируса.

На основании проведённого отбора **выбран** рекомбинантный белок Flg-NA2-4M2ehs, ставший основой вакцины «Грифлавак». **Завершён** полный цикл доклинических испытаний. Для перехода к клиническим исследованиям **подготовлены** необходимые документы: проект протокола КИ и брошюра исследователя. **Оценка достоверности результатов показала, что**

исследование проведено с применением современных методов: данные проанализированы корректными статистическими методами, а эксперименты выполнены на аттестованном оборудовании, обслуживаемом в соответствии с регламентом.

**Обоснованность выводов** обеспечена всесторонней характеристикой рекомбинантных белков — от *in silico*-анализа третичной структуры и поиска эпитопов (экспериментальных и теоретических) до воспроизводимых экспериментальных данных по оценке иммуногенности и защитной эффективности на модели летальной гриппозной инфекции. **Использованы** современные биоинформационные, вирусологические, физико-химические, иммунологические и статистические методы исследования.

**Личный вклад соискателя** включает: планирование и проведение экспериментов на мышах; участие в дизайне рекомбинантных белков; выполнение иммунологических исследований в рамках доклинических испытаний вакцины «Грифлавак»; статистическую обработку и анализ данных; подготовку научных статей к публикации.

Диссертационный совет пришел к выводу о том, что диссертация Шуклиной М.А. на тему «Иммуногенность и кросс-протективность химерных белков, включающих консервативные участки гемагглютенина, нуклеопротеина и белка М2 вирусов гриппа А» представляет собой научно-квалификационную работу и соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям 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 действующей редакции), и принял решение ПРИСУДИТЬ Шуклиной Марине Александровне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология.

При проведении тайного голосования, диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 11 докторов наук по специальности 1.5.10 –

Амосова И.В.