

ОТЗЫВ

официального оппонента Масаловой Ольги Владимировны
на диссертацию Котоминой Татьяны Сергеевны на тему
«Холодоадаптированные вирусы гриппа как платформа для конструирования
векторных вакцин на модели респираторно-синцитиального вируса»,
представленную на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 1.5.10 «Вирусология»

Актуальность избранной темы не подлежит сомнению. Инфекция, вызванная респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ) – наиболее частая причина поражения дыхательных путей у детей раннего возраста. РСВ является основным возбудителем обструктивных бронхитов и пневмоний у детей первого года жизни, смертность в этой группе может достигать 45%. Перенесенная в детстве РСВ-инфекция становится одним из факторов развития бронхиальной астмы. К группам риска тяжелого течения РСВ-инфекции относятся также люди старшего возраста, пациенты с сердечно-сосудистыми заболеваниями и сниженным иммунитетом. Единственный препарат, используемый для специфического лечения РСВ-инфекции – паливизумаб (Синагис®, Германия) на основе нейтрализующих гуманизированных антител, направленных к поверхностному гликопротеину F РСВ. Препарат оказывает профилактическое действие и позволяет снизить тяжесть течения заболевания. С 2015 года паливизумаб включен в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (Распоряжение Правительства Российской Федерации от 30 декабря 2014 г. № 2782-р). Препарат дорогой: стоимость курса лечения более 300 000 рублей.

РСВ – один из тех патогенов, к которому пока не удалось получить эффективную вакцину классическими методами. Новые перспективные технологии создания вакцин включают различные вирусные векторные системы доставки чужеродного генетического материала в клетки-мишени. В

диссертационной работе разработаны методические подходы для использования в качестве векторов аттенуированных вирусов гриппа в составе живой гриппозной вакцины (ЖГВ). Данные векторные системы имеют ряд преимуществ перед другими, среди которых – разработанная обратнo-генетическая система, позволяющая в короткий срок получать рекомбинантные вакцинные вирусы при помощи стандартных генно-инженерных методов. Поэтому диссертационное исследование, направленное на разработку безопасных и эффективных комбинированных векторных вакцин на модели РСВ, является несомненно актуальным и своевременным.

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается четким планированием экспериментов на каждом этапе разработки векторных вакцин против РСВ на основе ЖГВ. Работа выполнена с использованием комплекса современных биоинформационных, молекулярно-генетических, генно-инженерных, вирусологических и иммунологических методов. Статистическая обработка данных основана на оценке результатов, полученных при проведении серии повторяемых экспериментов, и выполнена с применением адекватных методов и критериев. Сформулированные соискателем выводы, положения, выносимые на защиту, а также рекомендации обоснованы и основаны на глубоком анализе полученных результатов по каждой из поставленных задач.

Результаты диссертационного исследования были представлены на 8 российских и международных конференциях медико-биологического и вирусологического профиля.

По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, из которых 6 научных статей в журналах с высоким импакт-фактором, входящих в международные базы данных Web of Science и Scopus. В опубликованных работах содержание диссертации отражено достаточно полно.

Научная новизна диссертационной работы состоит в том, что впервые была сконструирована панель рекомбинантных штаммов

холодоадаптированного вируса гриппа, несущих перспективные В- и Т-клеточные эпитопы РСВ. Показано, что в ответ на иммунизацию векторной вакциной вирус-специфические CD8⁺ Т клетки элиминируют РСВ из организма инфицированных мышей, при этом не вызывая развития бронхолегочной патологии, свойственной формалин-инактивированной РСВ вакцине. Важно, что вакцинация индуцирует образование тканерезидентных Т клеток памяти, что позволит в кратчайшие сроки справиться с заболеванием.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы определяется тем, что разработанный комплексный подход к выбору иммуногенных эпитопов респираторных вирусов и их инкорпорированию в геном вакцинного штамма ЖГВ открывает перспективы создания векторных вакцин против любых циркулирующих или вновь возникающих респираторных вирусов человека.

Оценка содержания диссертации и ее оформления. Диссертационная работа Котоминой Татьяны Сергеевны изложена на 161 страницах машинописного текста, построена по традиционному типу в соответствии с требованиями ВАК РФ, включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список литературы и 2 приложения, содержит 4 таблицы и 30 рисунков. Список цитируемой литературы включает 376 источника, из них 4 отечественных. Диссертационная работа и автореферат написаны грамотным литературным языком с использованием общепринятой терминологии.

«Введение» содержит обоснование актуальности темы, степень ее разработанности, цели и задачи исследования, научную новизну, теоретическая и практическая значимость работы, методологию и методы исследования, основные положения, выносимые на защиту, описание личного вклада автора в работу, а также степени достоверности результатов.

Глава «Обзор литературы» содержит описание молекулярно-биологических свойств РСВ и патогенеза инфекции. Представлен подробный анализ разрабатываемых вакцин против РСВ. Этот подраздел дополнен Приложениями, в которых суммированы результаты доклинических испытаний вакцинных кандидатов против РСВ и дан обзор вакцин, находящихся на разных стадиях клинических испытаний. Следует отметить высокую информативность данного раздела.

Вторая глава диссертационной работы посвящена описанию материалов и методов, использованных для выполнения исследований. В работе применялись современные биоинформационные, молекулярно-биологические, вирусологические, иммунологические, гистологические методы, метод проточной цитометрии, методы работы с лабораторными животными. Описаны методы статистического анализа результатов исследования.

В третьей главе представлены результаты собственных исследований. В первом подразделе изложены принципы, которые использовал диссертант для отбора полиэпитопных касет РСВ для создания векторных вакцин на основе аттенуированного вируса гриппа H7N9-ЖГВ. Два следующих подраздела посвящены конструированию рекомбинантных векторных вакцин, экспрессирующих фрагменты РСВ: В- и Т-клеточные эпитопы белка F (фрагмент 243-294 а.о.), встроенные в ген гемагглютинаина (ЖГВ+НА/РСВ), и Т-клеточные эпитопы белка М2-1 (фрагменты 70–101 и 114–146 а.о.), встроенные в гены нейраминидазы и неструктурного белка NS1 вируса гриппа (ЖГВ+НА/РСВ и ЖГВ+NS1/РСВ, соответственно). Здесь же подробно изложены результаты по изучению иммуногенности и защитной эффективности рекомбинантных векторных вакцин как в отношении гриппа, так и РСВ. Показано преимущество протективных свойств разработанных векторных вакцин перед цельновирионным формалин-инактивированным препаратом РСВ (ФИ-РСВ). Особенно следует отметить впечатляющие данные по характеристике индуцированных векторными вакцинами

тканерезидентных Т клеток памяти. Глава четко и логично изложена, прекрасно иллюстрирована.

В главе «Обсуждение результатов» автором анализируется весь массив полученных данных, проводится сравнение с другими исследованиями в данной области.

Работа завершается пятью выводами, которые логично вытекают из полученных результатов и полностью отражают суть диссертации. Также включены рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы. Диссертант справедливо постулирует, что на основании результатов, полученных в данной работе, уже ведутся разработки других векторных вакцин на основе ЖГВ, где в качестве вставки используются фрагменты вирусных и бактериальных белков, способных формировать защитный иммунитет в отношении целевого патогена. Автореферат диссертации на 26 листах в полной мере отражает содержание работы.

Оценивая работу положительно, следует отметить наличие в диссертации ряда недостатков, не снижающих общего хорошего впечатления об оппонируемой работе и не влияющих на ее научную и практическую значимость. В порядке научной дискуссии также хотелось бы получить ответы диссертанта Котоминой Т.С. на несколько вопросов.

1. Для оценки протективной активности вакцин против РСВ на модели мышей BALB/c рекомендуют использовать, по крайней мере, два критерия: инфильтрация лимфоцитов в легких и потеря веса мышей в течение первых трех дней после инфицирования РСВ (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00873>). Вы исследовали гистологическое изменение легочной ткани и репликацию РСВ в легких иммунизированных мышей, но не использовали второй доступный и важный критерий – потерю веса. С чем это связано?
2. Недостаточно полно исследованы иммуногенные и протективные свойства векторных вакцин, содержащих рекомбинантный гемагглютинин (ЖГВ-НА+А-РСВ и ЖГВ-НА+G-РСВ). Так, не

проведено исследование стимуляции мукозального иммунитета вакцинами – определение уровня IgA в верхних и нижних дыхательных путях. Не определены уровни вируснейтрализующих антител к РСВ, индуцируемых этими кандидатными рекомбинантными вакцинами в сравнении с ФИ-РСВ вакциной: хотя индукции антител IgG в ИФА не обнаружили, нейтрализация может иметь место, так как эти параметры не всегда совпадают. Не исследован клеточный ответ к РСВ, индуцируемый этими вакцинами: участки РСВ содержат Т-клеточные эпитопы, и только обсуждается, что частичная защита от РСВ этими вакцинами может быть обусловлена Т-клеточным ответом.

3. Почему при иммунизации мышей векторными конструкциями и формалин-инактивированным препаратом вируса (ФИ-РСВ) использовали разные схемы иммунизации и сроки забора материала?
4. Насколько консервативны выбранные фрагменты в разных штаммах РСВ? Совпадают ли выбранные Вами В и Т-клеточные эпитопы РСВ для мышей BALB/c и человека, т.е. есть ли в выбранных фрагментах иммунодоминантные эпитопы человека?
5. Замечания по разделу «Материалы и методы»: отсутствует описание методики проведения ИФА для выявления антител к РСВ; в описании гистологических методов исследования желательно пояснить, какие клетки и компартменты окрашивают выбранные красители; указать, что означают разбросы на графиках – стандартная ошибка среднего или стандартное отклонение. Также допущены некоторые неточности и опечатки в разделе «Результаты» (например, рисунки 15 и 25).

Заключение. Диссертационная работа Котоминой Татьяны Сергеевны на тему «Холодоадаптированные вирусы гриппа как платформа для конструирования векторных вакцин на модели респираторно-синцитиального вируса», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 01.5.10 «Вирусология», является

законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение по разработке векторных вакцин против РСВ, индуцирующих эффективный клеточный иммунный ответ. По своей актуальности, научной новизне, практической значимости и объему проведенных исследований диссертационная работа Котоминой Т.С. соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г., № 426 от 20.03.2021 г., №1539 от 11.09.2021 г., № 1690 от 26.09.2022 г., № 101 от 26.01.2023 г.), а соискатель заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 «Вирусология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, заведующая лабораторией клеточной инженерии Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Масалова О.В.

Подпись *Масаловой О.В.* удостоверяю

Ученый секретарь
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России,
кандидат биологических наук

28.09.23

Кожевникова Л.К.

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 18
Телефон: +7(499)193-30-01
Факс: +7(499)193-61-83
e-mail: info@gamaleya.org

