

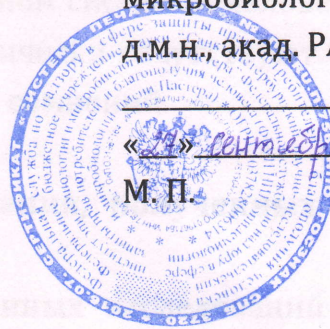
УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН НИИ эпидемиологии и
микробиологии имени Пастера

д.м.н., акад. РАН

А.А. Тотолян

2023 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации

Котоминой Татьяны Сергеевны

на тему «Холодоадаптированные вирусы гриппа как платформа
для конструирования векторных вакцин на модели респираторно-
синцитиального вируса»,

представленной к защите на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология.

Актуальность темы диссертационного исследования и ее связь с планами отраслевой науки

Диссертационная работа Котоминой Т.С. посвящена разработке подходов к созданию векторных вакцин на основе холодоадаптированного штамма вируса гриппа, направленных на защиту против других респираторных вирусов, на примере респираторно-синцитиального вируса (РСВ).

У людей с нормальной иммунной системой РС-вирусная инфекция длится 7-10 дней и протекает в легкой или среднетяжелой форме. Однако для пациентов с иммунодефицитными состояниями, ослабленным иммунитетом вследствие возраста, после операции или болезни, характерны осложненные варианты болезни. В таком случае есть риск распространения РСВ на бронхи и легкие с развитием бронхолитов и пневмоний, дыхательной недостаточности, присоединения вторичной инфекции с развитием бактериальной пневмонии. РСВ – наиболее распространенная причина заболевания нижних дыхательных путей у младенцев; к возрасту 4 лет бывают заражены почти все дети.

Респираторные вирусные инфекции человека контролируются при помощи профилактических и лечебных мер, а именно, вакцинации и

химиотерапии, соответственно. Однако в случае РС-вирусной инфекции ни одна из этих мер не внедрена в должной степени в практику здравоохранения. Разработка вакцин связана с серьезными проблемами из-за особенностей взаимодействия РСВ с иммунной системой человека, а доступные препараты для лечения инфекции практически отсутствуют. В этой связи актуальность выбранной темы не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций

В результате проведенных исследований разработан комплексный подход к выбору В- и Т-клеточных эпитопов для включения в состав векторной вакцины на основе штамма живой гриппозной вакцины (ЖГВ-РСВ). Впервые холодоадаптированные штаммы вируса гриппа использованы в качестве вектора для доставки чужеродных антигенов в клетки-мишени. Доказано, что химерные вирусы гриппа, несущие дополнительные антигены другого вируса, сохраняют способность к активной репродукции без нарушения температурочувствительного фенотипа вируса. Кроме того, впервые для конструирования векторной вакцины была использована полиэпитопная Т-клеточная кассета, включающая не полноразмерный вирусный белок, а лишь его отдельные иммуногенные эпитопы. Доказано, что иммунизация вакцинными кандидатами ЖГВ-РСВ приводит к образованию РСВ-специфических CD8⁺ Т клеток, обладающих выраженной цитотоксической активностью в отношении целевого эпитопа *in vivo*. Кроме того, в работе впервые убедительно продемонстрирована способность РСВ эпитоп-специфических CD8⁺ Т клеток, образованных в ответ на иммунизацию векторной вакциной, в кратчайшие сроки элиминировать РС вирус из организма инфицированных мышей, при этом не приводя к бронхолегочной патологии. Также впервые показано, что иммунизация Т-клеточной векторной вакциной, не способной к репликации в тканях легких, вызывает образование тканерезидентных Т клеток памяти, специфичных к встроенному иммунодоминантному CD8⁺ Т-клеточному эпитопу, что подтверждает и объясняет таргетную направленность векторной вакцины.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Основные положения диссертации, выносимые на защиту, отражающие научную новизну и практическую значимость работы, хорошо аргументированы. Результаты исследований подтверждены статистическим

анализом с применением адекватно подобранных критериев описательной и аналитической статистики. Основные материалы диссертационной работы доложены на 8 российских и крупнейших международных конференциях медико-биологического и вирусологического профиля. По материалам диссертационного исследования опубликовано 16 печатных работ, включая 6 статей, входящих в международные системы цитирования и реферативные базы данных Web of Science и/или Scopus, и 8 тезисов докладов на отечественных и международных научных конференциях.

Содержание диссертации и её оценка

Общий объем диссертации составляет 161 страницу. Диссертация построена по традиционному плану и состоит из следующих основных разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы, включающий 376 ссылок (из них 4 на русском языке, 372 – англоязычные) и приложения. Работа включает 4 таблицы и проиллюстрирована 30 рисунками.

Первая глава посвящена обзору данных литературы по основной теме работы на основании анализа научных публикаций за период 1953-2023 годов. Автором проанализированы существующие типы противовирусных вакцин, структура вирусных векторов, охарактеризованы подходы к использованию вирусов гриппа в качестве векторов, дана характеристика респираторно-синцитиального вируса, в том числе рассмотрен его жизненный цикл и проанализирована роль в нем отдельных вирусных белков. далее автор приводит подробные данные о патогенеза РС-вирусной инфекции, уделяя, в том числе, большое внимание вклад компонентов иммунной системы в патологический процесс, а также анализируя механизмы формирования иммунологической памяти к респираторным вирусным инфекциям в целом. Подробно рассмотрены современные подходы к разработке вакцин против РСВ. Следует отметить, что весь литературный обзор написан четко, логично и понятно, что является безусловным достоинством работы. Изложение материала помогает глубже познакомиться с проблемой и потому специальных комментариев не требует.

Во **второй главе** представлена информация об использованных в работе материалах и методах исследования. Из представленной информации видно, что в работе использован широкий спектр молекулярно-биологических, вирусологических, морфологических и иммунологических методов исследования. Так, конструирование химерных генов вируса гриппа было проведено методами обратной генетики, генетическая стабильность рекомбинантов осуществлено при помощи секвенирования, инфекционная

активность вирусов оценена при помощи бляшкообразования с иммуноокрашиванием, параметры инфекции *in vivo* изучены при помощи оценки активности репликации вирусов в организме мышей и гистологического анализа, детекция специфических антигенов в культуре клеток и в структуре ткани проведена при помощи иммуноферментного, иммуноцито- и иммуногистохимического анализа. Полученные данные обработаны с применением современных адекватных статистических методик. В целом следует отметить высокий методический уровень проведенных исследований и полное соответствие выбранных методик поставленным задачам.

В **третьей главе** «Результаты» автором представлены результаты разработки и изучения протективных свойств РС-вирусной вакцины. Приведены данные по дизайну эпитопной кассеты для получения рекомбинантных вирусов и оценке уровня экспрессии эпитопов РСВ векторными вакцинами. Полно и всесторонне изучена иммуногенность и эффективность вакцинных штаммов, воздействие вакцины на вирусологические и иммунологические характеристики РС-вирусной инфекции у животных.

В **четвертой главе** приведено обсуждение полученных в ходе исследования данных, результаты работы сопоставлены с данными других авторов, проанализированы сходные и различные данные. Описаны также перспективы дальнейшей разработки полученной универсальной вакцины и нерешенные вопросы, поднятые в ходе исследования.

Выводы и практические рекомендации. Выводы диссертации и практические рекомендации представлены четко и обосновано вытекают из материалов диссертации. Автореферат диссертации адекватно отражает её основные положения и содержание. Апробацию результатов работы, проведенной за период 2016-2023 гг., следует признать достаточной: по теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, из которых 6 научных статей в журналах, входящих в международные системы цитирования и реферативные базы данных Web of Science и/или Scopus, и 8 тезисов докладов на отечественных и международных конференциях.

Из замечаний к работе следует отметить следующее. В ряде методик автор использует вирус, очищенный в градиенте плотности сахарозы, однако сама процедура очистки вируса не приведена.

Гистологические препараты в работе (Рис.30) представлены в таком размере, что их оценка затруднена. В частности, трудно увидеть на рисунках повреждение бронхиального эпителия, на которое автор ссылается в тексте.

В тексте диссертации встречаются неудачные с точки зрения стилистики обороты и несоответствие падежей. Сюда следует отнести обороты «планшеты промывали ... и удерживали при 37°С...» (стр.50), «...оценка уровня экспрессия эпитопов...» (стр.62).

Перечисленные замечания ни в коей мере не носят принципиального характера, а касаются лишь технических и оформительских аспектов работы. В целом работа оставляет впечатление исключительно полного и всестороннего исследования, выполненного на высоком профессиональном уровне с использованием самых современных методик.

К автору работы имеется вопрос. Почему для гистологического анализа использовали только верхнюю долю правого легкого (стр.55), а не полностью легкие? Насколько репрезентативна морфологическая картина воспаления, полученная по участку органа?

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. Полученные в настоящем исследовании результаты носят преимущественно фундаментальный характер. Однако полученные в работе результаты можно и нужно будет использовать для дальнейшей разработки и совершенствования вакцины против РСВ-инфекции, а также, в более широком смысле, для разработки векторных вакцин против любых циркулирующих или вновь возникающих респираторных вирусов человека.

Заключение.

Диссертационная работа Котоминой Татьяны Сергеевны на тему «Холодоадаптированные вирусы гриппа как платформа для конструирования векторных вакцин на модели респираторно-синцитиального вируса», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология, представляет собой самостоятельно выполненную и законченную научно-квалификационную работу, содержащую результаты изучения протективных свойств живой гриппозной вакцины, активной в отношении многих вирусов гриппа А.

По научной новизне, актуальности, высокому методическому уровню, научной ценности и практической значимости результаты диссертационной работы отвечают требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842), в редакции постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г. и №748 от 02.08.2016 г., предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор

заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.10 – вирусология.

Отзыв обсужден и одобрен 21.09.2023 г. на заседании проблемной комиссии по вирусологии Федерального бюджетного учреждения науки Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол 4/23 от 21.09.2023).

Заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии
ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. Пастера»

д.б.н.

В.В. Зарубаев

Подпись В.В. Зарубаева заверяю
Ученый секретарь
ФБУН НИИ эпидемиологии
и микробиологии им. Пастера
кандидат медицинских наук



Г.Ф. Трифонова

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

197101, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, дом 14.
Телефон +7(812)233-20-92

<https://www.pasteurorg.ru/>