

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН НИИ эпидемиологии и
микробиологии имени Пастера
академик РАН, профессор, д.м.н.

А.А. Тотолян

«06» *сентября* 2024 г.

М. П.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Пулькиной Анастасии Александровны на тему: «Оптимизация гриппозного вектора с модифицированным белком NS 1 для эффективной презентации антигенов 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 Пулькиной А.А. посвящена разработке и характеристике методик фенотипической идентификации противовирусных препаратов.

Вакцинация является наиболее эффективным средством контроля вирусных инфекций. В отношении респираторно-синцитиальной вирусной инфекции (РСВИ) она является практически единственным средством эффективного и доступного контроля заболеваемости, поскольку средства терапии этой инфекции не всегда доступны или, как рибавирин, должны применяться с учетом большого количества побочных эффектов.

Особенностью РСВИ является способность РС-вируса модулировать качество гуморального иммунного ответа, направляя его по Th2- и Th17- а не по Th1-типу, предпочтительному для эффективного клиренса внутриклеточного патогена. Этот ответ сопровождается повышенной секрецией слизи, гиперреактивностью дыхательных путей и повышенной нейтрофильной инфильтрацией. В комбинации с несбалансированным иммунным ответом цитотоксических Т-клеток патологический процесс приводит к существенному повреждению ткани легкого, а также к антитело-зависимому утяжелению процесса при вакцинации. В этой связи к стратегии дизайна и разработки вакцин против РСВИ следует подходить с особой ответственностью. С учетом изложенного, представленная работа является не просто исключительно актуальным, а ожидаемым и широко востребованным исследованием.

Помимо очевидной прикладной важности, работа несет в себе значительный теоретический элемент, поскольку объединяет в себе анализ разных конструкций векторов, результаты которого могут служить основанием для оптимизации

иммунологических и протективных характеристик векторных вакцин, что само по себе является исключительно актуальной задачей.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций

В результате проведенных исследований впервые показано, что продукты рекомбинантных конструкций, встроенные в укороченный белок NS1 вируса гриппа А, детектируются во внеклеточном пространстве зараженных клеток. В ходе исследования впервые сконструированы генетически стабильные гриппозные векторы, экспрессирующие вставку консервативных участков белка F РСВ. Показано, что эти векторы обладают сходной репродуктивной активностью, но различаются по паттерну накопления антигена РСВ в зараженных клетках, зависящему от встраивания последовательности сигнального пептида IgGк в состав трансгена. Возможность реконструкции геномного сегмента NS путем встраивания новой открытой рамки считывания для последовательности антигена РСВ, дополненного сигнальным пептидом IgGк, продемонстрирована и реализована впервые. Впервые также изучено влияние этого пептида на особенности клеточного иммунного ответа на трансгенную вакцину. Продемонстрирована защитная эффективность сконструированных гриппозных векторов с модифицированным белком NS1 в отношении РСВИ при интраназальной иммунизации мышей. Продемонстрировано, что иммунизация гриппозными векторами, содержащими последовательность сигнального пептида IgGк, приводит к более эффективному подавлению репликативной активности РСВ в легких зараженных животных без развития иммунопатологии. Показано также, что протективный механизм иммунизации вектором NS-2AsF связан с формированием РСВ-специфических CD8⁺ Т-клеток, в частности ко-продукторов IL-10 и IFN-γ, а также привлечением в легкие CD4⁺ регуляторных Т-клеток.

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. Все полученные результаты воспроизводимы и статистически достоверны. Результаты работы представлены на российских и международных профильных конференциях, симпозиумах и совещаниях: на XX Зимней молодежной школе по биофизике и молекулярной биологии (г. Гатчина, Россия, 2019), «The 1st ISIRV International Influenza Vaccine Meeting - Immunological Assays and Correlates of Protection for Next Generation Influenza Vaccines», (г. Сиена, Италия, 2019), на международном форуме «Молодежные дни вирусологии 2020» (г. Санкт-Петербург, Россия, 2020), на I Международная научно-практическая конференция «Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий» (г. Томск, Россия,

2020), на IV Всероссийской конференции молодых учёных «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике» (г. Санкт-Петербург, Россия, 2023) и на «Individual and population immunity to respiratory viruses» (г. Гонконг, Китай, 2023). Результаты исследования опубликованы в 12 научных работах, из них работ, опубликованных согласно Перечню рецензируемых научных изданий (Перечень ВАК) – 3.

Содержание диссертации и её оценка

Общий объем диссертации составляет 132 страницы. Диссертация построена по традиционному плану и состоит из следующих основных разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, выводы и список литературы, включающий 277 ссылок, из них 9 на русском языке, 268 - англоязычные. Работа включает 6 таблиц и проиллюстрирована 31 рисунком.

Первая глава посвящена обзору данных литературы по основной теме работы на основании анализа научных публикаций за период 1957-2023 годов. Автором проанализированы основные проблемы разработки вакцин в целом, специфические проблемы, возникающие при разработке векторных вакцин, а также особенности гуморального и клеточного иммунитета при РСВИ. Изложение материала этого раздела 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 биохимических, молекулярно-биологических, вирусологических, морфологических и иммунологических методов исследования. Так, использованные в работе вирусы пассированы при помощи культивирования в клеточных культурах, их инфекционная активность оценена при помощи методов титрования с индикацией вируса по цитопатогенному действию и по снижению числа бляшкообразующих единиц. Конструирование и анализ рекомбинантных векторов проведены при помощи широкого набора генноинженерных методик. Анализ продукции целевых белков проведен при помощи вестерн-блоттинга. Особенности патологического процесса в опытных группах изучены при помощи полуколичественного гистологического анализа. Уровень продукции специфических антител оценен при помощи иммуноферментного анализа, продукции цитокинов и поверхностных антигенов клеточных популяций – при помощи проточной цитофлюорометрии. Набор методов адекватен поставленным задачам исследования.

В 3 главе – «Результаты» - представлены данные анализа структуры целевых конструкций и их соответствия запланированным параметрам, суммированы результаты изучения протективной активности рекомбинантных штаммов вируса гриппа с целевым трансгеном на модели РС-вирусной инфекции у животных, охарактеризованы особенности патологического процесса в контрольной и опытных группах животных, а также представлены результаты исследования особенностей и

механизмов формирования гуморального и клеточного иммунитета в ответ на инфицирование вирусом.

Полученные результаты сопоставлены с данными, полученными другими авторами, работающими в той же области.

В главе «Обсуждение» приведена трактовка представленных результатов, описывается, насколько использованные методы и полученные в работе данные соответствуют методикам и результатам, полученным ранее в других лабораториях, а также представлены гипотезы о взаимосвязи ранее полученных результатов других исследований с данными собственных экспериментов.

Выводы составлены четко и логично вытекают из материалов диссертации. Автореферат диссертации адекватно отражает её основные положения. Апробацию результатов работы следует признать достаточной: по материалам диссертационной работы опубликовано 12 научных работ, в том числе работ, опубликованных согласно Перечню рецензируемых научных изданий (Перечень ВАК) - 3.

Принципиальных замечаний по существу диссертации нет.

Из недочетов работы следует указать следующие.

В разделе «Материалы и методы» в ряде случаев использованные методы описаны недостаточно подробно или не в порядке выполнения в ходе исследования. Так, подробнее следует описать процесс накопления плазмид (стр.51). На стр.56 описан процесс забора и анализа органов у инфицированных мышей, тогда как сам процесс заражения и его параметры, в т.ч. доза вируса, ещё не описан, а приводится позже. Подробнее следует описать также, как проводили отбор крови животных для приготовления сывороток (стр.57). Получение вектора вируса гриппа (стр.60) следует привести не только в разделе «Результаты», но и в разделе «Материалы и методы».

При характеристике вирусной нагрузки в ткани легких (стр.75) этот параметр следует приводить в ТИД₅₀ на 1 г ткани, а не на 1 мл суспензии.

В ряде случаев встречаются научные жаргонизмы и спорные термины. В этом качестве следует отметить «протективный антиген», «вектор парагриппа» (стр.28), «прямое нацеливание на вирусы» (стр.45), «стоковый раствор», «абляция» (стр.28). При этом последние два, являясь прямым копированием английских терминов, в русскоязычной литературе имеют иной смысл, и их следует избегать.

Ряд аббревиатур, приведенных в тексте работы («КИ», «ЭФ», «ИНДП»), не включен в список сокращений.

В тексте работы часто встречаются ошибки, в подавляющем большинстве пунктуационного характера, а также технические недочеты («...оценивали ЦПД вируса и в гемагглютинирующий титр с использованием...» (стр.52) и др.).

Перечисленные замечания не носят принципиального характера, а касаются лишь технических и оформительских аспектов работы.

В ходе ознакомления с работой возникает несколько вопросов к автору.

1. Указано (стр.53), что титр вируса гриппа определяли при помощи детекции вирусного ЦПД и контроля при помощи РГА. Различались ли

титры вируса, измеренные этими двумя способами? Результаты какого метода представлены далее в работе в разделе «Результаты»?

2. В культуре клеток вирус культивировали при 37С, а в куриных эмбрионах – при 34С. Влияла ли температура культивирования на антигенные свойства вирусов?
3. Как проводили дифференцировку степени поражения ткани легких (стр.56)? В чем была разница между поражениями «умеренными», «незначительными» и «минимальными»? Как оценивали патологические параметры, представленные на осях ординат на рис.19Б – процент пораженной ткани, инфильтрация, воспаление?
4. Рекомбинантные векторы были сделаны на основе вируса A/PR/8/34 (H1N1). Почему стимуляцию проводили вирусом другого антигенного подтипа, (H1N1)pdm09 (стр.85)?
5. С точки зрения предотвращения развития патологического процесса наиболее эффективным оказался вектор sF-NS, несущий сигнал секреции трансгена во внеклеточное пространство. Тем не менее, в супернатанте клеток целевого антигена обнаружено не было (стр.72). Каков тогда, по мнению автора, механизм более высокой эффективности этого вектора по сравнению с остальными изученными?

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные в работе результаты и выявленные закономерности можно будет использовать для дальнейшей оптимизации векторных вакцин. Разработка и применение новых вакцинных векторов, направленных на различные мишени актуальных для человека вирусов и обладающих различными механизмами действия, сможет послужить весомым вкладом в развитие вакцинных протоколов для расширения фармакологического арсенала и достижения оптимальных результатов при контроле вирусных инфекций.

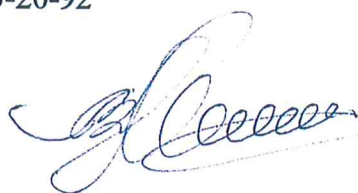
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Пулькиной Анастасии Александровны «Оптимизация гриппозного вектора с модифицированным белком NS1 для эффективной презентации антигенов 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, 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 28.08.2017 г.; №1168 от

01.01.2018 г.; № 426 от 20.03.2021 г.; с изменениями в действующей ред. от 18.03.2023 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Пулькина Анастасия Александровна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – «Вирусология».

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Проблемной комиссии по вирусологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», протокол № 1/24 от «5» марта 2024 года.

Заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии
ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»
доктор биологических наук
e-mail: zarubaev@pasteurorg.ru
тел. +7(812)233-20-92



Владимир Викторович Зарубаев

Подпись д.б.н. Зарубаева В.В. заверяю.
Начальник отдела кадров
ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Л.В. Чебакова



Л.В. Чебакова 2024 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. 197101, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, дом 14. Телефон +7(812)233-20-92, <https://www.pasteurorg.ru/>