

Отзыв официального оппонента
на диссертационную работу Матюшенко Виктории Аркадьевны
«Особенности подготовки вакцинных штаммов для производства живой
гриппозной вакцины на перевиваемых клеточных культурах»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 1.5.10 — Вирусология

Актуальность темы

Высокий уровень популяционного иммунитета - это не только защита привитого населения от заболевания, но и защита непривитого контингента и людей из групп риска за счет вакцинированных. Иммунный ответ на вакцинацию у лиц из групп риска может быть ниже, чем у здоровых людей 18-64 лет, что может влиять на эффективность вакцин в этих группах населения. Чем меньше будет вокруг инфицированных людей, тем меньше вероятность заболевания людей из групп риска. На сегодняшний день вакцины являются наилучшим способом профилактики гриппа и помогают смягчить тяжесть заболевания, снижая число госпитализаций и смертей. Живая гриппозная вакцина имеет ряд преимуществ по сравнению с вакцинами, произведенными в куриных эмбрионах, так как позволяет проводить вакцинацию групп населения с аллергией на куриный белок, в частности детей младшего возраста, у которых данный вид аллергии проявляется наиболее часто.

Степень обоснованности научных положений

На основе анализа методических подходов, материалов диссертации считаю выводы и положения, выносимые на защиту, обоснованными.

Достоверность и новизна выводов и результатов диссертации

Результаты представленного диссертационного исследования, посвященные подробной характеристике подготовки вакцинных штаммов для производства живой гриппозной вакцины на перевиваемых клеточных культурах, безусловно являются новыми данными. Автором впервые проведена

всесторонняя характеристика вирусов гриппа A(H2N2), различающихся рецепторной специфичностью, характерной для начала пандемической волны, при их адаптации к культуре клеток млекопитающих.

Показано, что вакцинные штаммы после адаптации к культуре клеток MDCK сохранили полный спектр мутаций, характерных для аттенуированных штаммов, что необходимо для безопасности живых гриппозных вакцин.

Вакцинные штаммы живой гриппозной вакцины, подготовленные методами обратной генетики, обладали высоким уровнем генетической стабильности при их серийном пассировании в культуре клеток MDCK.

Таким образом, автором получены комплексные экспериментальные данные, обосновывающие принципиальную возможность использования вакцинных штаммов, подготовленных в куриных эмбрионах, для производства живой гриппозной вакцины в культуре клеток MDCK.

Новизна полученных данных подтверждена публикацией результатов исследования в изданиях, индексируемых международными библиографическими базами Scopus и Web of Science.

Ценность для науки и практики проведенной соискателем работы

В настоящее время невозможно определить, какой субтип вируса гриппа А вызовет следующую пандемию. Тем не менее готовиться к пандемии необходимо. В связи с этим, работа автора с пандемическими штаммами вируса гриппа A(H2N2), несомненно, имеет важное значение для науки. Так, автором проанализировано влияние рецепторной специфичности пандемических штаммов на репродукцию в различных системах культивирования, оценена генетическая стабильность при многократном пассировании в клетках MDCK и даны рекомендации по выбору пандемических штаммов для производства ЖГВ в клеточных культурах.

Автором исследования показана возможность применения вакцинных штаммов, полученных методом реассортации в куриных эмбрионах, для производства живой гриппозной вакцины в культуре клеток млекопитающих.

Рекомендации по использованию результатов работы и выводов диссертации

Полученные результаты являются существенным вкладом в проблему выбора вакцинных штаммов вируса гриппа А в первые недели после начала пандемии гриппа.

Количество печатных работ в изданиях, рекомендованных ВАК

По результатам диссертационного исследования опубликовано 7 печатных работ в рецензируемых изданиях, из которых 6 — в изданиях, входящих в Перечень журналов и изданий, утвержденных Высшей аттестационной комиссией (из них 3 — издания первой категории), 6 печатных работ опубликованы в научных журналах, входящих в «Белый список», из них три работы в изданиях уровня 1 и три работы в изданиях уровня 3. Матюшенко В.А. указана первым автором в 2 статьях, опубликованных в журналах (ЖМЭИ), входящих в Перечень журналов и изданий, утвержденных Высшей аттестационной комиссией. Таким образом, количество печатных работ, в которых опубликованы результаты диссертационного исследования, является достаточным.

Личный вклад автора

Анализ опубликованных по результатам выполнения диссертации статей и свидетельствует о том, что В.А. Матюшенко внесла существенный вклад в концептуализацию и методологию диссертационного исследования наряду с научным руководителем, а также самостоятельно выполнила основную часть экспериментальной работы, анализа и визуализации данных. Кроме того, В.А. Матюшенко принимала непосредственное участие в написании статей и подготовке докладов на российских и международных конференциях. Все вышеперечисленное позволяет заключить, что в представленном диссертационном исследовании личный вклад автора является основным и достаточным.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности

Диссертационная работа В.А. Матюшенко посвящена подготовке вакцинных штаммов вируса гриппа для производства живой гриппозной вакцины с использованием широкого спектра вирусологических методов, молекулярно-биологических подходов, компьютерного моделирования, что позволяет сделать заключение о соответствии темы диссертации научной специальности 1.5.10 — Вирусология.

Работа изложена на 148 страницах компьютерного текста и состоит из обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 28 рисунками и 14 таблицами. Список литературы включает 238 источников. Ссылки сделаны на классические работы и авторитетные научные коллективы.

Цель и задачи работы логично сформулированы. Обзор литературы дает хорошее представление о вирусах гриппа А, их взаимодействии с иммунной системой, о современных подходах к получению живых и инактивированных гриппозных вакцин. Методические подходы описаны достаточно подробно, результаты наглядно иллюстрированы. Представленные результаты соответствуют поставленной цели диссертационной работы и отражены в публикациях автора диссертации.

Положения, выносимые на защиту, адекватно сформулированы и в достаточной степени обоснованы представленными экспериментальными данными.

Аннотация включает все требуемые структурные элементы и в краткой форме отражает основное содержание диссертации.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Основным достоинством представленного диссертационного исследования является высокий методический уровень работы, соответствующий современным исследованиям в данной области. Автором получены полные и подробные результаты адаптации к размножению в клетках

млекопитающих различных штаммов вируса гриппа А, имеющих сродство к рецепторам «птичьего типа» с $\alpha 2,3$ -связью между сиаловой кислотой и галактозой в гликопептидах и гликолипидах клеточной мембраны.

К недостаткам диссертации следует отнести небрежность при оформлении работы.

Литературный обзор начинается с характеристики семейства, которое автор называет родом, и пишет следующее: «Вирус гриппа относится к роду *Orthomixoviridae* Различают вирусы гриппа типа А, В, С и D.». По данным Международного комитета по таксономии семейство *Orthomixoviridae* включает 8 родов, вирусы гриппа относятся к четырем из них: *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*.

В главе Материалы и методы перечислены использованные в работе эпидемические, пандемические, потенциально пандемические и лабораторные штаммы вирусов гриппа типа А и В. К сожалению, нет информации о регистрации этих штаммов в российских и/или международных базах данных.

В главе Результаты на стр. 81, рис. 12. нет расшифровки обозначений QG и KLS в подписях к рисунку.

Не корректно использовать в диссертационной работе жаргонные слова и выражения или прямой перевод с англоязычного текста.

Стр.6. «...возникновение яично-адаптационных мутаций в молекуле НА»

Стр. 30. «Участники исследования, у которых произошла сероконверсия, имели более высокую активацию интерферон-сигналикации по сравнению с теми, кто не сероконвертировался».

Стр. 36, 45. Использование терминов «внутренние гены», «наружные гены».

Стр. 58. «Подготовка обратно-генетических вакцинных штаммов».

В работе встречаются неудачные выражения.

Стр. 43. «...нейраминидаза аминокислотно не изменилась»

Стр. 33. «...преодоление вирусом гриппа межвидового барьера неизбежно вызывает антигенный шифт у нового хозяина...»

Стр. 54. «...центрифугировали в чистый эппендорф в течение 1 мин»

Кроме того, имеются вопросы к автору.

На стр. 15. написано «транскрипция и обратная транскрипция вирусных негативных РНК и мРНК проходит в ядре». Что имелось в виду под термином «обратная транскрипция» и с помощью какого фермента она осуществляется при репликации вируса гриппа?

По поводу пандемии птичьего гриппа.

Стр. 106. «Известно, что пандемии гриппа могут возникать вследствие адаптации вирусов гриппа птиц к клеткам млекопитающих. Например, причиной возникновения пандемии «азиатского» гриппа А(Н2N2) в 1957 году явилась адаптация молекулы гемагглютиниона вируса гриппа птиц к рецептору человеческого типа $\alpha 2,6$, что послужило возможностью для преодоления межвидового барьера». А на стр. 64 написано: «при этом было показано, что в начале пандемической волны в циркуляции могут встречаться как вирусы, имеющие сродство к рецепторам птичьего типа $\alpha 2,3$, так и адаптированные к человеку вирусы с рецепторной специфичностью $\alpha 2,6$ ».

Вопросы. 1. Возможно ли, чтобы вирус **птичьего** гриппа вызвал **пандемию** (глобальную эпидемию гриппа человека)? 2. Достаточно ли изменить сродство гемагглютиниона вируса гриппа птиц к клеточному рецептору с $\alpha 2,3$ -связью на сродство к рецептору с $\alpha 2,6$ -связью, чтобы вирус вызвал пандемию?

Тем не менее, перечисленные недостатки не влияют на общую положительную оценку работы.

**Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным
Положением о порядке присуждения ученых степеней**

Диссертационная работа В.А. Матюшенко «Особенности подготовки вакцинных штаммов для производства живой гриппозной вакцины на перевиваемых клеточных культурах», является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством член-корр. РАН, доктора биологических наук И.Н. Исаковой-Сивак, содержит решение

