

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН «СПб НИИ

эпидемиологии и микробиологии

имени Пастера» Роспотребнадзора,

академик РАН, д-р.мед.наук, профессор



А.А. Тотолян

«11» ноября 2025 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Шуклиной Марины Александровны «Иммуногенность и кросс-протективность химерных белков, включающих консервативные участки гемагглютинина, нуклеопротеина и белка М2 вирусов гриппа А», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – «Вирусология»

Актуальность темы диссертационного исследования

Эффективная профилактика гриппозной инфекции представляет насущную проблему современного здравоохранения. Как показала практика, посредством так называемых «сезонных» вакцин, активно используемых несколько десятилетий, невозможно полностью контролировать грипп. Узкая специфичность иммунитета, создаваемого такими вакцинами, и длительный период наработки нужного количества препарата нередко приводят к ситуации запаздывания или несоответствия штаммового состава вакцины и штаммов, вызывающих эпидемию. В случае развития пандемии несостоятельность традиционных вакцин еще более очевидна. Кроме того, глобальная система мониторинга вирусов с целью выявления этиологического агента будущей эпидемии требует огромного организационного и ресурсного напряжения. Все это побудило специалистов ВОЗ изменить стратегию разработки вакцин [WHO Global Influenza. "Strategy 2019-2030"]. Вакцины нового поколения должны создавать длительный иммунитет к широкому кругу вирусов гриппа, то есть быть кросс-реактивными. При этом, быть безвредными и предотвращать тяжелые формы гриппа и смертельные исходы.

Генно-инженерные технологии открыли широкие перспективы для создания высокоиммуногенных кросс-реактивных вакцин на основе разных платформ: вирусных векторов, вирусоподобных частиц, рибо- и дезоксирибонуклеиновых кислот и т.д. Одно из направлений – разработка вакцин на основе химерных белков, в состав которых могут входить помимо целевых антигенов и белка носителя, также молекулы, обладающие адъювантными свойствами. Именно это актуальное направление – рекомбинантные белки и характеристика их специфических свойств рассматриваются в представленной диссертации. Диссертантом были исследованы физико-химические, иммуногенные и защитные свойства ряда потенциально вакцинных рекомбинантных белков.

Следует отметить, что несмотря на работы многочисленных научных коллективов, по сей день нет зарегистрированных кросс-реактивных вакцин против гриппа. Поэтому настоящее полноценное исследование вакцинных белков представляет бесспорную ценность и актуальность.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций

Автором впервые дана развернутая характеристика ряда оригинальных генетических рекомбинантов – фрагментов белков вируса гриппа и белка-носителя флагеллина. Изучены их физико-химические свойства, иммуногенность, показана связь третичной структуры и свойств/функций белков. Исследована их безопасность для разных видов лабораторных животных (мыши генетических линий BALB/c, C57BL/6, хорьки) и реактогенность.

Показано, что включение в состав химерных белков консенсусного для вирусов H3 и H7 фрагмента второй субъединицы НА, эктодомена белка M2 индуцирует иммунный ответ к вирусам, относящимся не только к разным субтипам в пределах одной филогенетической группы, но и к вирусам другой филогенетической группы. В экспериментах исследован защитный эффект

против вирусов гриппа А субтипов H1, H5, H2 (первая филогенетическая группа) и H3, H7 (вторая филогенетическая группа).

Новые данные по особенностям иммунного ответа, длительности вирусоносительства получены при введении одних и тех же белков разными способами.

Бесспорно интересным с научной точки зрения и до сих пор недостаточно изученным является исследование клеточного ландшафта в носоглотке и его изменение после интраназальной иммунизации.

Представлены пионерские данные по реакции хорьков на введение кандидатной вакцины, в композицию которой вошел наиболее эффективный белок Flg-HA2-4M2ehs.

Новизной работы является исследование совместной иммунизации животных химерным белком Flg-HA2-4M2ehs и инаktivированной гриппозной вакциной, которая привела к значительному усилению гомо- и гетерологичной защиты.

Все полученные новые факты и закономерности отражены в выводах диссертации.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций

Работа представляет собой анализ большого фактического материала, полученного с использованием адекватных методов исследования. Дана разноплановая характеристика полученных белков, начиная от моделирования структурного положения антигенов и определения Т-клеточных эпитопов и кончая стабильностью. Местный и системный иммунный ответ на белки изучен с привлечением ряда лабораторных тестов, характеризующих как гуморальное, так и клеточное звено иммунитета. Тестирование на разных видах лабораторных животных с получением аналогичных результатов дает уверенность в достоверности выводов по диссертационной работе. Описание результатов иллюстрировано понятными четкими графиками и рисунками с приведением полноценной статистической обработки. В целом, автор широко

и уместно использует методы статистики с полным пониманием их математического смысла. Выводы основаны на разноплановых исследованиях *in silico*, *in vitro* и *in vivo*, на обширном материале и соответствуют задачам, поставленным перед диссертантом.

На защиту выносятся четыре положения, отражающие новые результаты, и обоснованные репрезентативным объемом материала, современными методами исследования, корректной статистической обработкой. Основные положения, выносимые на защиту, полностью вытекают из результатов исследования, четко сформулированы.

Материалы диссертационного исследования были представлены на международных конференциях: The fifth ESWI influenza conference (2014), Riga; "Trends in influenza research" Saint-Petersburg (2017); "Universal Influenza Vaccines" (2018), Lausanne, Switzerland; «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» СПб (2018); "Perspective technologies in vaccination and immunotherapy", Saint-Petersburg (2020); III Международный форум «Дни вирусологии 2022», СПб; Всероссийская конференция молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике», СПб (2023); V Международный форум «Дни вирусологии 2024», СПб.

По теме диссертации опубликовано 23 печатные работы: 13 научных статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ, и 10 тезисов докладов.

Содержание диссертации, ее структура и объем

Диссертационная работа написана по общепринятой форме и состоит из введения, обзора научной литературы, главы «Материалы и методы», главы «Результаты», обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы.

Значительная часть обзора литературы посвящена белкам вируса гриппа, их функциям и иммуногенности. Представлен также обзор универсальных вакцин, разрабатываемых в мировых научных центрах, и технологических

платформ для их разработки. Отдельный раздел посвящен белку флагеллину как носителю гаптен, его адъювантным свойствам. В целом, обзор является логичным вступлением к представлению цели, задач работы, а также к обсуждению собственных исследований. Обзор написан хорошим литературным языком, основан на анализе более 400 публикаций, что свидетельствует об эрудиции автора и добросовестном подходе к теоретическому обоснованию своих исследований.

В главе «Материалы и методы» представлено описание белков, вирусов, систем культивирования вирусов, лабораторных животных, используемых в работе. Представлено большое количество лабораторных методов: иммунологических, вирусологических, микробиологических, а также методов *in silico* (биоинформационные, статистические). Грамотный выбор методов дал возможность разносторонне охарактеризовать химерные белки и ответ иммунной системы на их введение, чем обеспечил достоверность сделанных из работы выводов.

Глава «Результаты» дает дизайн химерных белков и оценку физико-химических свойств (чистоты, подлинности, стабильности). На двух генетических линиях мышей скрупулезно изучен и проанализирован иммунный ответ на введение белков. Представлен как гуморальный ответ – иммуноглобулинами классов G (G2a, G1) и A, так и клеточный: Т-клетки продуценты ИФН- γ , ИЛ-2. Показано образование клеток иммунологической памяти после иммунизации.

В последнем разделе главы приводятся результаты изучения на хорьках безопасности, иммуногенности и защитного действия кандидатной вакцины «Грифлавак», разработанной на основе одного из изученных автором белков.

В обсуждении автор соотносит свою работу с современными трендами в вакцинологии, сопоставляет результаты и выявленные закономерности с работами других исследователей.

Общий объем диссертации 169 страниц, включая 20 таблиц, 38 рисунков. Завершает работу список сокращений и список использованной литературы

– 441 источник. Имеется 4 приложения - схемы гейтирования иммунных Т-клеток и дизайн опыта на хорьках.

Рекомендации

Логичным и ближайшим продолжением выполненной работы, учитывая положительный результат доклинического испытания, видится проведение 1-ой фазы клинического исследования, подтверждения безопасности и достаточной иммуногенности кандидатной вакцины для человеческого организма.

Большой потенциал должны иметь химерные белки, в состав которых включены участки нуклеопротеина. Рекомендуется продолжить исследование этих белков с привлечением релевантных животных моделей.

Как предмет для последующего более всестороннего исследования крайне интересен бустирующий эффект вакцин на основе химерных белков. Полученный в процессе диссертационной работы результат по этому вопросу выглядит достаточно обнадеживающим.

Автореферат диссертации содержит все основные результаты, полученные в ходе работы.

Принципиальных замечаний по диссертации, форме изложения и оформлению не возникло. Отдельные опечатки, в целом, не влияют на восприятие текста.

К диссертанту есть два вопроса;

1. Как объясняется отсутствие заметного усиления протективности вакцинного белка при включении в него фрагментов нуклеопротеина вируса гриппа А, несущих несколько Т-клеточных эпитопов? Как видно из работы, участки NP ощутимо расширяли функциональность Т-клеточного ответа.

2. Один из изученных в диссертации рекомбинантных белков на основе флагеллина, в отличие от всех остальных, не содержит центральной части (гипервариабельного домена), которая заменена HA2 эпитопом. Судя по данным, представленным в диссертации, он также показывал высокую иммуногенность и обеспечивал защиту иммунизированных животных от

инфекции. С какой целью был создан белок с именно такой структурой и почему его не использовали в последующих экспериментах на животных?

Заключение.

Диссертационная работа Шуклиной Марины Александровны, представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – «Вирусология» представляет собой самостоятельно выполненную, законченную научно-квалификационную работу по актуальности, объему проведенных исследований, методическому уровню, научной ценности и практической значимости отвечающую требованиям пп.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.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Проблемной комиссии по специальности «Вирусология» ФБУН «НИИ микробиологии и эпидемиологии им. Пастера», протокол № 3/25 от 06.11.2025 г.

Заместитель директора по научной работе
ФБУН «Санкт-Петербургский
научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»,
к.м.н.


Дедков В.Г.

Подпись В.Г. Дедкова подтверждаю,
начальник ОК ФБУН «Санкт-Петербургский
научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»


Чебакова Л.В.

197101, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
Тел. 8(812) 233 90 22
11.11. 2025 г.

