

ОТЗЫВ

**официального оппонента, доктора медицинских наук, академика РАН,
Свитич Оксаны Анатольевны на диссертационную работу Матюшенко
Виктории Аркадьевны на тему: «Особенности подготовки вакцинных
штаммов для производства живой гриппозной вакцины
на перевиваемых клеточных культурах», представленную на соискание
ученой степени кандидата биологических наук
по специальности «1.5.10 – Вирусология»**

Актуальность темы диссертационной работы

Грипп представляет собой серьёзное инфекционное заболевание, эпидемии которого ежегодно наносят значительный социально-экономический ущерб по всему миру. Самым действенным методом борьбы с гриппом является ежегодная иммунизация населения сезонными противогриппозными вакцинами. В медицинской практике используются два основных типа вакцин: живые (ЖГВ) и инактивированные (ИГВ). Многочисленные клинические и эпидемиологические исследования отечественных и зарубежных авторов продемонстрировали ряд преимуществ живых вакцин перед инактивированными в плане полноценности индуцируемого иммунного ответа (в том числе – мукозального) и способности формировать коллективный иммунитет. При этом традиционное производство гриппозных вакцин в куриных эмбрионах имеет ряд недостатков: возможность наличия у людей аллергии на яичный белок, потенциальное появление адаптационных мутаций, меняющих антигенные свойства вируса, и относительно невысокую скорость наработки. В этой связи диссертационное исследование, обосновывающее ряд подходов к оптимизации производства ЖГВ на культуре клеток MDCK, является своевременным и актуальным.

Кроме того, ввиду постоянной эволюционной изменчивости вирусов гриппа, циркулирующих в природном резервуаре, сохраняется риск появления варианта, способного преодолеть межвидовой барьер и вызвать очередную пандемию гриппа. В начале пандемической волны возможна социркуляция антигенно идентичных вариантов вируса, характеризующихся различной

рецепторной специфичностью. Для обоснования рационального выбора наиболее оптимального варианта вируса с целью разработки пандемической вакцины на культурах клеток млекопитающих, необходимо проведение углубленных научных исследований.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автор демонстрирует высокий уровень компетенции в области современной научной литературы, посвященной тематике проекта, что позволило четко сформулировать цели и задачи исследования. Для решения поставленных задач автором был применен широкий спектр современных вирусологических, иммунологических, молекулярно-генетических и генно-инженерных методов, а также корректные методики статистического анализа.

Основные положения диссертации аргументированы и логически вытекают из экспериментальных данных, подкрепленных значительным объемом фактического материала. Сделанные диссертантом выводы полностью соответствуют поставленным задачам, обоснованы и достоверны, что придает работе высокую академическую значимость.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждена использованием стандартных методов вирусологии, иммунологии и молекулярной биологии, воспроизводимостью данных, репрезентативным объемом материала и корректной статистической обработкой. В работе применялись качественные реактивы и современное научное оборудование, а все экспериментальные данные подвергались тщательному статистическому анализу с использованием различных критериев.

Полученные в ходе выполнения диссертационного исследования результаты обладают научной новизной, поскольку автором впервые были всесторонне изучены адаптационные мутации, возникающие в молекуле

гемагглютинина вакцинных штаммов ЖГВ при их адаптации к культуре клеток MDCK, причем изучались как штаммы сезонной вакцины, так и потенциально пандемические варианты. Кроме того, впервые проведено углубленное исследование антигенно схожих вирусов гриппа А(Н2N2), различающихся рецепторной специфичностью молекулы гемагглютинина, что позволило сделать вывод о целесообразности применения на начальных этапах пандемии вакцины, приготовленной из вариантов с рецепторной специфичностью $\alpha 2,3$.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Значимым итогом диссертационного исследования, имеющим важное практическое значение для системы здравоохранения, является экспериментально подтверждённая возможность использования вакцинных штаммов, исходно подготовленных в развивающихся куриных эмбрионах, для производства ЖГВ на культуре клеток MDCK.

Безусловной научной значимостью обладают результаты изучения адаптационных мутаций в молекулах НА вакцинных штаммов ЖГВ при их многократном пассировании в культуре клеток MDCK. Поскольку в работе проведена оценка влияния таких мутаций на основные биологические характеристики вакцинных штаммов, открываются перспективы для направленного мониторинга за возможными мутационными изменениями в вакцинных вирусах, возникающих в процессе производства гриппозных вакцин на клеточных культурах. А разработанная автором лабораторная модель для изучения таких мутаций позволит в короткие сроки отбирать для производства вакцинные кандидаты с оптимальными характеристиками.

Результаты диссертационного исследования будут востребованы как научным сообществом (вирусологами, иммунологами), так и производителями вакцин, что в конечном счете будет способствовать повышению эффективности вакцинопрофилактики гриппа среди наиболее уязвимых групп населения.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Результаты диссертационного исследования полностью соответствуют п.10. «Разработка мер предупреждения, диагностики и лечения вирусных заболеваний, совершенствование лабораторной диагностики, терапии, и иммунопрофилактики вирусных инфекций, проблемы санитарной вирусологии» и п.11. Противовирусные препараты. Интерфероны и индукторы интерферона: изучение механизма действия, получение и применение. Вирусные вакцины, в том числе живые (аттенуированные), инактивированные, субъединичные, рекомбинантные (реплицирующиеся и нереплицирующиеся), векторные и вакцины на основе вирусоподобных частиц» паспорта специальности 1.5.10 Вирусология (биологические науки).

Полнота освещения результатов диссертации в печати

Материалы диссертационной работы опубликованы в 14 научных работах, 7 из которых входят в международные системы цитирования и реферативные базы данных Web of Science и/или Scopus. Кроме того, результаты научной работы были представлены на ключевых национальных и международных научных форумах и симпозиумах, соответствующих профилю проведённых исследований.

Содержание и оформление диссертационной работы

Диссертационная работа Матюшенко В.А. на тему «Особенности подготовки вакцинных штаммов для производства живой гриппозной вакцины на перевиваемых клеточных культурах» выполнена в соответствии с требованиями ВАК РФ, логично структурирована и содержит данные экспериментальных исследований, в полной мере раскрывающих поставленные в работе задачи. Работа изложена на 148 страницах машинописного текста и включает 14 таблиц и 28 рисунков. Работа построена по классической схеме и включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение» и «Выводы». Список

цитируемой литературы содержит 238 источников на русском и английском языках.

В разделе «Введение» автор обосновывает актуальность темы, формулирует цель и задачи исследования, определяет научную новизну, теоретическую и практическая значимость работы. В разделе приводятся методология и методы исследования, уточняется личный вклад автора, а также представление полученных результатов в печатных работах и на научных мероприятиях.

В разделе «Обзор литературы» автор систематизирует современную научную литературу по тематике исследования. Структура раздела выстроена логично: в начале приводится подробное описание строения частицы вируса гриппа и организация его генома, при этом особое внимание уделено представлению структур основных антигенов вируса – молекул гемагглютинаина и нейраминидазы, а также основных механизмов их антигенной изменчивости. Далее автор приводит подробный обзор противогриппозных вакцин, как применяемых в настоящее время в практике здравоохранения для профилактики гриппа среди различных групп населения, так и резервные вакцинные кандидаты, подготовленные в рамках программы ВОЗ по подготовке к пандемии гриппа. Важно отметить, что в данном разделе собрана вся актуальная информация о разработках культуральных живых и инактивированных гриппозных вакцин, где убедительно продемонстрирована перспективность перевода производства вакцин на культуры клеток млекопитающих. В заключительном разделе обзора литературы представлена подробная информация о всех имеющихся данные по различным адаптационным мутациям, возникающих как в «диких» вирусах гриппа, так и в вакцинных штаммах при их культивировании в клетках млекопитающих. Весь обобщенный материал позволил сделать вывод о необходимости проведения настоящего исследования ввиду отсутствия современных данных о мутационных изменениях, возникающих в вакцинных штаммах ЖГВ при их адаптации к культуре клеток MDCK.

В разделе «Материалы и методы» приводится перечень использованных в работе эпидемических, пандемических и вакцинных вирусов гриппа, а также протоколы для получения вакцинных реассортантов методами обратной генетики. Подробно представлены методы работы с культурами клеток и с лабораторными животными. Для оценки иммунного ответа на исследуемые вакцинные вирусы автором используются как стандартные протоколы определения уровней системных и локальных антител в реакции торможения гемагглютинации и иммуноферментном анализе, так и современные подходы к анализу субпопуляций Т-клеток с использованием проточной цитометрии.

Глава «Результаты» структурирована в четыре раздела, которые представляют все экспериментальные данные, полученные в ходе исследования. В первом разделе представлены результаты сравнительного изучения репликативных свойств, антигенности и иммуногенности двух родственных штаммов пандемического вируса А/Сингапур/1/57 (H2N2), различающихся только рецепторной специфичностью молекулы гемагглютинина, причем исследованы как накопленные в РКЭ вирусы, так и адаптированные к культуре клеток MDCK варианты. Значимым результатом данного этапа исследования стало выявление того, что антитела, индуцированные иммунизацией вариантами вирусов А/Сингапур/1/57 с рецепторной специфичностью $\alpha 2,3$, демонстрировали более широкий спектр реактивности в отношении всех анализируемых антигенов. Аминокислотная замена P221S в субъединице HA1 может быть классифицирована как escape-мутация, поскольку она обеспечила вирусу способность эффективно избегать распознавания антителами, сформированными в ответ на иммунизацию всеми исследованными вариантами вакцины. Во втором разделе изучены генно-инженерные вакцинные штаммы, полученные на основе тех же пандемических вирусов А/Сингапур/1/57 (H2N2) с различной рецепторной специфичностью, но содержащих гены внутренних и неструктурных белков от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57. Важно отметить, что адаптация этих вирусов к культуре клеток MDCK не приводила к появлению

адаптационных мутаций, указывая на более гомогенный характер вакцинных штаммов, полученных методами обратной генетики. Проведенные эксперименты на животных подтвердили, что иммунизация вакцинными вирусами с рецепторной специфичностью $\alpha 2,3$ стимулирует выработку более кросс-реактивных антител, по сравнению с $\alpha 2,6$ вариантом, что позволяет рекомендовать первый вариант для производства вакцины в случае социркуляции вирусов H2N2 в начале пандемической волны.

Третий раздел главы «Результаты» обобщает материалы изучения различных сезонных (H1N1 и H3N2) и пандемических (H5N1 и H7N9) вариантов вакцинных штаммов ЖГВ при их адаптации к культуре клеток MDCK. Проанализирована репрезентативная выборка вариантов вирусов, клонированных после проведения серийного пассирования вакцинных штаммов в клеточной культуре, на предмет влияния обнаруженных мутаций в поверхностных антигенах вирусов на их репликативные свойства, антигенность, иммуногенность и протективную активность. Полученный в данном разделе массив данных убедительно демонстрирует высокую степень генетической стабильности вакцинных реассортантов, подготовленных классическим скрещиванием в РКЭ, что указывает на потенциал их успешного использования для производства живой гриппозной вакцины на культуре клеток MDCK, поскольку возникающие адаптационные мутации не оказывают негативного влияния на основные биологические свойства вакцинных штаммов

Заключительный раздел главы «Результаты» посвящен анализу экспериментальных серий компонентов сезонной трехвалентной живой гриппозной вакцины, наработанных на клетках MDCK в условиях промышленного производства. Значимым результатом данного раздела исследования стало выявление того, что адаптационные мутации, возникающие у различных подтипов вируса гриппа как в лабораторных, так и в промышленных условиях, имеют аналогичное расположение в молекуле гемагглютенина. Это позволяет использовать разработанную адаптационную

модель для прогнозирования характеристик живой гриппозной вакцины, изготовленной на клеточной культуре.

В главе «Обсуждение» автор осуществляет всесторонний и детальный анализ собственных результатов диссертационного исследования, сопоставляя их с ранее опубликованными данными, представленными в научной литературе.

В целом, диссертационная работа характеризуется четкой структурой, соответствующей требованиям ВАК. Рукопись диссертации четко систематизирована, последовательность экспериментов выстроена в соответствии с методологическими принципами: от формулировки научной гипотезы до ее экспериментального подтверждения. Детальное и критическое обсуждение результатов в контексте современной научной литературы позволило сформулировать обоснованные выводы и внести вклад в развитие научной дисциплины.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат диссертации в полной мере отражает основное содержание диссертационной работы. В автореферате приводится основная характеристика работы: её цель, задачи, методы, основные положения, выносимые на защиту, результаты исследования и выводы. Основные положения и выводы диссертации подкреплены большим объемом фактических экспериментальных данных.

Замечания по содержанию и оформлению

В данной диссертационной работе выявлены отдельные стилистические и пунктуационные погрешности, однако они имеют формальный характер и не оказывают влияния на научную значимость, содержание или выводы исследования. Тем не менее, ознакомление с текстом вызывает ряд вопросов, требующих дополнительного обсуждения:

1. В своей работе на примере пандемических вирусов гриппа А(Н2N2) автор продемонстрировал преимущество варианта с рецепторной специфичностью $\alpha 2,3$ перед штаммами со специфичностью $\alpha 2,6$ в плане широты спектра индуцируемых антител. Ожидается ли такой же эффект и для других подтипов вирусов гриппа А, включая сезонные вирусы H1N1 и H3N2 и потенциально пандемические варианты H5Nx, H7N9?
2. Для вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины подтипов H1N1, H3N2, H5N2 и H7N9 показано отсутствие влияния адаптационных мутаций на гуморальное звено иммунитета. Проводилось ли исследование Т-клеточного иммунного ответа на введение этих вирусов, и не затрагивают ли обнаруженные мутации известные Т-клеточные эпитопы?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, диссертационная работа Матюшенко Виктории Аркадьевны на тему: «Особенности подготовки вакцинных штаммов для производства живой гриппозной вакцины на перевиваемых клеточных культурах», выполненная под руководством д.б.н., член-корреспондента РАН Исаковой-Сивак Ирины Николаевны, на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.10 – Вирусология», является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной научной задачи – обоснование принципиальной возможности использования вакцинных штаммов, подготовленных на куриных эмбрионах, для производства живой гриппозной вакцины на культуре клеток MDCK, имеющей существенное значение для вирусологии, что соответствует требованиям п. 9-14 Положения «О порядке присуждения 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.; №650 от 29.05.2017 г.; №1024 от 28.08.2017 г.; №1168 от 01.01.2018 г.; № 426 от 20.03.2021 г.; №101 от 26.01.2023 г.; с изменениями в действующей ред. №62 от 25.01.2024 г.), предъявляемым к диссертациям на

соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Матюшенко Виктория Аркадьевна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.10 – Вирусология».

Официальный оппонент:

Доктор медицинских наук, академик РАН,
Директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
им. И.И. Мечникова»
105064 Москва, Малый Казенный переулок, д.5А.
Тел.: +7 (495) 917-49-00. E-mail: svitichoa@yandex.ru

Свитич Оксана Анатольевна

Специальность: 3.2.7 Иммунология (14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология).

Согласна на обработку персональных данных.

«1» декабря 2025 г.

Подпись д.м.н., академика РАН, директора О.А. Свитич заверяю:

Ученый секретарь

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Васильева Анна Викторовна

