

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 21.1.017.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГРИППА
ИМЕНИ А.А. СМОРОДИНЦЕВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 02 апреля 2024 года № 1 о присуждении Пулькиной Анастасии Александровне ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Оптимизация гриппозного вектора с модифицированным белком NS1 для эффективной презентации антигенов респираторно-синцитиального вируса» по специальности 1.5.10 – вирусология принята к защите 26 декабря 2023 года, протокол № 5, диссертационным советом Д 21.1.017.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д.15/17).

Соискатель Пулькина Анастасия Александровна, 1993 года рождения, в 2017 году с отличием закончила магистратуру Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого по специальности 16.04.01 Техническая физика, работает научным сотрудником в лаборатории векторных вакцин Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Диссертационная работа выполнена в лаборатории векторных вакцин Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Егоров Андрей Юрьевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Официальные оппоненты:

Исакова-Сивак Ирина Николаевна – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, заведующая лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

Ленёва Ирина Анатольевна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – **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, в своем положительном отзыве, составленном и подписанным Зарубаевым Владимиром Викторовичем – доктором биологических наук, заведующим лабораторией экспериментальной вирусологии отдела вирусологии указал, что диссертационная работа Пулькиной Анастасии Александровны на тему «Оптимизация гриппозного вектора с модифицированным белком NS1 для эффективной презентации антигенов респираторно-синцитиального вируса», отметила, что работа Пулькиной А.А. 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».

Соискатель имеет 12 печатных работ: 3 научные статьи в журналах, входящих в Перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ, 8 тезисов докладов и 1 патент на изобретение. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

В патенте RU 2 759 054 C2 на изобретение «Рекомбинантный штамм вируса гриппа A/PR8-NS124-Luc и способ оценки поствакцинальных нейтрализующих антител с использованием билюминесцентной детекции» (1) и статье «Быстрое выявление нейтрализующих антител с применением вирусов гриппа с люциферазным репортером» (3) описано конструирование и получение репортерного вектора. Эти данные были изложены в главе III Результаты (раздел 3.1.1). В разделе 3.1.2. главы III Результаты изложены данные, представленные в работе «Evidence for the extracellular delivery of influenza NS1 protein» (2). В этой статье показано, что репортерный белок, слитый с укороченным белком NS1, может выходить во внеклеточное пространство, стимулируя выработку гуморального иммунного ответа как на сам белок NS1, так и на слитый с ним трансген. В статье «Опыт применения хлопковых крыс для моделирования респираторно-синцитиальной вирусной инфекции и иммунопатологии» (5) описаны методики накопления респираторно-синцитиального вируса (PCV) на клетках, получения протитоба инактивированной формалином PCV вакцины и проведения гистологического анализа ткани легких (отражено в главе II Материалы и методы, разделе 2.2.). В статье «IgGκ Signal Peptide Enhances the Efficacy of an Influenza Vector Vaccine against Respiratory Syncytial Virus Infection in

Мисе» (4) представлены материалы, описывающие основные результаты диссертационного исследования. В статье описаны стратегии встраивания РСВ-антигена в ген NS вируса гриппа А, проведен анализ генетической стабильности, безопасности, иммуногенности, защитной эффективности и механизма защитного действия полученных рекомбинантных векторов.

Наиболее значимые работы:

1. Патент RU 2 759 054 С2 на изобретение «Рекомбинантный штамм вируса гриппа А/PR8-NS124-Luc и способ оценки поствакцинальных нейтрализующих антител с использованием билюминесцентной детекции» Стукова М.А., Сергеева М.В., Романовская-Романько Е.А., **Пулькина А.А.**, Егоров А.Ю.

2. **Pulkina A.** Evidence for the extracellular delivery of influenza NS1 protein / Pulkina A., Sergeeva M., Krokhin A., Stukova M., Egorov A. // MIR J.-2021.- Vol. 8.- № 1. P. 27–37.

3. Сергеева М.В. Быстрое выявление нейтрализующих антител с применением вирусов гриппа с люциферазным репортером / Сергеева М.В., **Пулькина А.А.**, Романовская-Романько Е.А., Мустафаева А.С., Егоров А.Ю., Стукова М.А.// Биотехнология – 2021.- Т. 37.- № 2.- С. 81–91.

4. **Pulkina, A.** IgGκ Signal Peptide Enhances the Efficacy of an Influenza Vector Vaccine against Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice / Pulkina, A.; Vasilyev, K.; Muzhikyan, A.; Sergeeva, M.; Romanovskaya-Romanko, E.; Shurygina, A.-P.; Shuklina, M.; Vasin, A.; Stukova, M.; Egorov, A. // Int. J. Mol. Sci.- 2023. – Vol. 24.-11445.

5. Сергеева М.В. Опыт применения хлопковых крыс для моделирования респираторно-синцитиальной вирусной инфекции и иммунопатологии / Сергеева М.В., **Пулькина А.А.**, Штро А.А., Васильев К.А., Романовская-Романько Е.А., Гаршинина А.В., Галочкина А.В., Мужикян А.А., Бузицкая Ж.В., Стукова М.А. // Лабораторные животные для научных исследований. - 2022.- №4.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Доктора медицинских наук, чл.-корр. РАН, научного руководителя ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России Симбирцева Андрея Семеновича. Отзыв положительный, замечаний нет.

2. Доктора медицинских наук, ведущего научного сотрудника отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» Дешевой Юлии Андреевны. Отзыв в целом положительный, но имеются замечания и вопрос. Автор отзыва задает вопрос о том, как результаты иммуногенности, полученные на мышинной модели, будут соотноситься с тем, что предполагается конечное введение вакцины человеку. Из недочетов отмечает, что в подстрочной подписи к рисунку 1 не указано количество оснований, в тексте есть несколько стилистических несогласований, что тем не менее, нисколько не умаляет высокой значимости проделанной диссертантом работы.

3. Кандидата химических наук, научного сотрудника кафедры химической энзимологии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» Алиева Теймура Кантамировича. Отзыв положительный, замечаний нет.

4. Кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Плехановой Тамары Михайловны и доктора медицинских наук, полковника медицинской службы Петрова Александра Анатольевича из ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. Отзыв положительный, замечаний нет.

В отзывах подчеркивается актуальность темы проведенного исследования, отмечается значимость полученных теоретических и практических результатов.

Выбор официальных оппонентов обосновывается их компетентностью в данной области науки, достижениями, большим опытом и наличием публикаций в сфере диссертационного исследования, их согласием на оппонирование и рецензирование настоящей работы и способностью

определить теоретическую и практическую ценность выполненной научно-исследовательской работы и произведен в соответствии с требованиями пункта 22 «Положение о порядке присуждения ученых степеней» №842 от 24.09.2013 г.

Выбор ведущей организации обусловлен тем, что 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 является одним из передовых учреждений, в котором работают признанные специалисты в сфере экспериментальной медицины, молекулярной биологии, вирусологии и иммунологии.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

впервые **выявлено**, что антигены, слитые с укороченным белком NS1, обнаруживаются во внеклеточном пространстве инфицированной культуры клеток и в сыворотке зараженных животных;

сконструированы четыре рекомбинантных вектора вируса гриппа А, экспрессирующие оригинальный трансген, состоящий из участков белка F РСВ, в составе геномного фрагмента NS вируса гриппа А;

впервые **продемонстрирована** возможность реконструкции геномного сегмента NS путем встраивания новой открытой рамки считывания для последовательности антигена РСВ, дополненного сигнальным пептидом IgGк, с сохранением последовательности укороченного белка NS1;

установлено, что использованные в работе способы модификации геномного сегмента NS не оказывают влияния на генетическую стабильность штамма;

обнаружено, что интенсивность накопления трансгена в цитоплазме зараженных клеток зависит от наличия и расположения последовательности сигнального пептида IgGк и встроенного антигена по отношению к укороченному белку NS1;

продемонстрирована безопасность сконструированных рекомбинантных векторов для мышей при однократной интраназальной иммунизации;

показано, что однократная интраназальная иммунизация мышей рекомбинантным вектором, содержащим последовательность сигнального пептида IgGк, эффективнее стимулирует формирование антиген-специфичных CD8⁺ Т клеток, по сравнению с векторами без IgGк;

выявлено, что, независимо от дизайна векторной конструкции, однократная интраназальная иммунизация мышей подавляла репродукцию РСВ в легких зараженных мышей, но векторы с сигнальным пептидом IgGк значительно снижали выраженность патологических изменений в легких;

установлено, что механизм защиты от РСВИ при однократной интраназальной иммунизации вектором NS-2AsF заключается в выраженной стимуляции антиген-специфических CD8⁺ Т-клеток, сбалансированном формировании субпопуляции антиген-специфических CD8⁺ Т-клеток, продуцирующих IL-10 и IFN- γ , и накоплением CD4⁺ регуляторных Т-клеток в легких мышей, инфицированных РСВ.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

на модели РСВ **предложен** способ оптимизации гриппозного вектора с модифицированным белком NS1 путем встраивания последовательности сигнального пептида IgGк, который позволяет сфокусировать и существенно усилить Т-клеточный иммунный ответ к эпитопам вставки. Предложенная стратегия конструирования может быть использована не только в контексте гриппозного вектора, но и других вирусных векторов.

установлено, что защита от экспериментальной РСВ инфекции может быть достигнута уже после однократной интраназальной иммунизации животных гриппозными векторами за счет формирования РСВ-специфического Т-клеточного иммунного ответа даже в отсутствие нейтрализующих антител.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

определен оптимальный способ конструирования вектора вируса гриппа А с модифицированным белком NS1, позволяющий сформировать сбалансированный Т-клеточный иммунный ответ к эпитопам встроенного антигена;

представлены рекомендации по дальнейшему развитию данного направления;

предложен способ конструирования вирусного вектора, который может быть использован для разработки векторных вакцин против различных возбудителей респираторных инфекций.

Оценка достоверности полученных результатов исследования выявила, что представленные результаты были получены на сертифицированном оборудовании, проходящем плановые и контрольно-технические работы, и проанализированы с использованием адекватных методик обработки данных и их научно обоснованной интерпретацией;

обоснованность сформулированных **выводов** подтверждается воспроизводимостью результатов, полученных в ходе проведенных экспериментов по оценке репродуктивной активности рекомбинантных векторов как *in vitro*, так и *in vivo*, профилактической эффективности сконструированных векторов и изучению механизма защиты

использованы современные молекулярно-генетические, генно-инженерные, вирусологические, иммунологические и статистические методы исследования.

Личный вклад соискателя состоит в самостоятельном проведении исследования, включая анализ литературных данных по теме исследования, планирование и проведение лабораторных исследований, статистической обработке, интерпретации и анализе полученных результатов. Подготовка основных публикаций проведена при непосредственном участии автора.

Диссертационный совет пришел к выводу о том, что диссертация Пулькиной А.А. «Оптимизация гриппозного вектора с модифицированным белком NS1 для эффективной презентации антигенов респираторно-синцитиального вируса» представляет собой научно-квалификационную работу и соответствует требованиям, предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук п. 9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в действующей редакции), и принял решение ПРИСУДИТЬ Пулькиной Анастасии Александровне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология.

При проведении тайного голосования, диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 16 докторов наук по специальности 1.5.10 – вирусология, участвовавших в заседании, из 20 человек, входящих в состав совета проголосовали:

За присуждение ученой степени – 17

Против – нет

Недействительных бюллетеней – нет

Председатель
диссертационного совета Д 21.1.017.01,
доктор биологических наук

Жилинская И.Н.

Ученый секретарь Д 21.1.017.01,
кандидат биологических наук

Амосова И.В.

05 апреля 2024 г.

