

## ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Ландграф Галины на тему: «МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МАРКЕРЫ В ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКЕ ПОЛИВАЛЕНТНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ГРИППА И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.11. Микробиология

### Актуальность темы исследования

Современный вектор в исследованиях и в практических разработках в области борьбы с гриппом состоит в необходимости замещения гриппозных моновакцин вакцинальными препаратами более широкого спектра действия и сложного состава. В этом направлении встает ряд проблем, без решения которых невозможен переход к эффективному созданию поливалентных вакцин. В первую очередь это обеспечение быстрой и надежной дифференциальной оценки компонентов сложных вакцинальных препаратов. Следующей проблемой является оценка взаимного влияния отдельных компонентов в сложных вакцинах. Определение реакции организма человека на каждый из компонентов поливалентной вакцины в отдельности и их суммарное действие становится важнейшей задачей. Наконец, создание, оценка безопасности и эффективности вакцинных препаратов, включающих помимо вирусов антигены бактериальной природы, становится все более актуальной задачей. Решение перечисленных задач является необходимым условием для эффективного контроля и профилактики эпидемий гриппа.

### Цели и задачи исследования, пути их решения

Главная цель работы Ландграф Г. состояла в том, чтобы определить способы быстрой и воспроизводимой оценки безвредности и потенциальной эффективности вновь создаваемых поливалентных вакцин на основе живой гриппозной вакцины (ЖГВ) и рекомбинантных пептидов стрептококков группы В. Для этого автору предстояло сначала решить ряд чисто методических задач. Во-первых, нужно было выбрать и адаптировать метод, который бы позволял быстро анализировать олигонуклеотидный полиморфизм в геноме реассортантных вакцинных штаммов. Рассмотрев используемые в настоящее время методы, автор сделала выбор в пользу метода ПЦР в реальном времени после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР-РВ) с анализом высокого разрешения кривых плавления. Дальнейшая апробация показала правильность сделанного выбора. Далее предстояло найти и испытать способ оценки репликации вирусов каждого из штаммов в составе поливакцины. Выбор был сделан в пользу исследований на культурах клеток MDCK ,

зараженных ЖГВ, с последующим анализом культуральных жидкостей методом ОТ-ПЦР-РВ и технологии TaqMan. Наконец, в части работы, выполненной *in vivo*, предстояло выбрать метод для оценки репликации вирусов в легких и нозальных ходах вакцинированных и зараженных животных. Сопоставление с традиционными методами показало, что и в данном случае ОТ-ПЦР-РВ с технологией TaqMan способно обеспечить быстрое проведение анализов. Оработанные приемы исследования позволили получить информативные и достоверные результаты в экспериментах по изучению безопасности и защитной эффективности вакцин, созданных на основе ЖГВ и пептидов стрептококков В.

### **Объем и структура диссертации**

Рассматриваемая диссертация Ландграф построена по традиционному плану и содержит вводную часть, обзор научной литературы, описание методов исследования, результатов, обсуждение, заключительную часть, выводы и список цитированной литературы. В тексте диссертации удачно соотносятся объемы разных частей. В обзоре литературы затронуты все существенные для формулирования цели и задач работы вопросы. При этом обзор написан сжато и хорошо иллюстрирован. Изложение методов достаточно кратко и информативно, везде приведены ссылки на исходные оригинальные методы. В каждом разделе главы «Результаты» приведены ссылки на публикации соискателя, в которых изложены соответствующие результаты. Заслуживает высокой оценки раздел «Обсуждение», который продемонстрировал знание научной литературы и умение с разных сторон рассмотреть собственные результаты.

### **Характеристика результатов и анализ выводов**

Текст, описывающий результаты выполненных исследований, изложен достаточно сжато и является фактически комментарием к многочисленным и хорошо выполненным графическим материалам.

Первые две задачи работы, являющиеся методическими, решены в традиционном стиле. Метод для быстрого скрининга геномов реассортантных вакцинных штаммов с использованием ОТ-ПЦР-РВ и последующего анализа кривых плавления был известен раньше применительно к «диким» штаммам вируса. Соискатель адаптировала, испытала и сравнила эффективность модифицированного метода анализа для реассортантных штаммов с результатами ПЦР-рестрикционного анализа тех же штаммов и показала преимущество нового способа, в особенности применительно к вирусам гриппа птиц, которые могут быть потенциально опасными для человека. Эти результаты вошли в первый вывод.

Вторая из методических задач состояла в упрощении метода дифференцированного определения инфекционных титров вирусных штаммов в составе тривакцины. Адаптированный вариант ОТ-ПЦР-РВ с использованием технологии TaqMan для анализа репликации каждого из штаммов вируса в тройной ЖГВ *in vitro* в культурах клеток MDCK показал преимущество в специфичности, чувствительности, воспроизводимости и экономичности в сравнении с методом титрования на куриных эмбрионах. Этот же метод позволил в дальнейшем оценить репликацию вирусов не только *in vitro*, но и *in vivo* в организме вакцинированных мышей. Изложенные результаты послужили основой для второго вывода.

Решение перечисленных задач позволило автору перейти к главной части работы – к доклиническому изучению эффективности и безопасности одновременного применения ЖГВ и бактериальных вакцинальных пептидов Вас-белков стрептококков группы В.

Сначала была изучена биология вирусов в составе ЖГВ в мышах после вакцинации. Введение мышам ЖГВ или ЖГВ в ассоциации с бактериальным пептидом приводило к стимуляции выработки ряда цитокинов, которые обеспечивали первичную защиту и организацию адаптивного иммунного ответа. Однако уровень и сроки этой стимуляции указывали на безопасность использования поливалентной вакцины в плане индукции «цитокинового шторма» или развития аутоиммунной патологии. Добавление в вакцину рекомбинантного полипептида ScaAB оказывало дополнительный защитный эффект от гриппозной инфекции. Этот пептид не только проявлял адьювантный эффект в отношении ЖГВ при интраназальном введении, но и обеспечивал защиту от гетерологичных вирусов гриппа, возможно, за счет стимуляции интерферона 1-го типа. В работе проведено исследование профиля мышинных иммуноглобулинов, образующихся в ответ на введение ЖГВ или ЖГВ в ассоциации с бактериальными пептидами. Специфические антитела образуются только через 2–4 недели после иммунизации, поэтому эффект ранней неспецифической защиты, обеспечиваемой ЖГВ, ассоциированной с бактериальным пептидом, особенно важен при вакцинации в условиях циркуляции не только вирусов гриппа, но и этиологических агентов других респираторных инфекций.

#### **Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы**

При создании комплексных препаратов против вирус-бактериальных инфекций необходимо изучать совокупность факторов, коррелирующих с защитой организма. К

таким факторам относятся реакции врожденного иммунитета, а также реакции адаптивного иммунитета. Известно, что исследование клеточных иммунологических реакций является трудоемким и дорогостоящим процессом. Соискатель теоретически мотивировала информативность, а затем продемонстрировала в экспериментах *in vitro* на культурах клеток человека (ТНР-1) возможность оценки суммарной активности компонентов клеточных и гуморальных факторов врожденного иммунитета путем определения методом ОТ-ПЦР-РВ раннего цитокинового профиля после действия вакцинных вирусов ЖГВ и рекомбинантных пептидов стрептококков. Изучение экспрессии и продукции ранних цитокинов в клеточных культурах в ответ на введение вирусных или вирус-бактериальных вакцин может служить новым критерием оценки как безвредности вновь разрабатываемых препаратов, так и прогнозирования их защитного действия. Также впервые показано, что при введении рекомбинантного пептида ScaAB наблюдается повышение экспрессии ранних цитокинов и хемокинов, и это повышение положительно коррелирует с последующей защитой от гомологичной и гетерологичной гриппозной инфекции.

Модифицированные и адаптированные методы оценки репликации вирусов гриппа в составе ЖГВ на клетках MCDK с последующей оценкой ОТ-ПЦР-РВ важны для практической вирусологии и могут быть широко использованы.

#### **Критические замечания и вопросы к дискуссии**

Рецензируемая работа Ландграф Г. является целостным, хорошо спланированным, четко выполненным и грамотно изложенным диссертационным исследованием. Встречающиеся в тексте, особенно в последних главах, грамматические опечатки, не снижают высокой оценки работы.

В порядке дискуссии хотелось бы услышать ответ соискателя на следующий вопрос:

Исследование эффективности и безопасности комплексных вакцин, включающих вирусы гриппа и бактериальные пептиды, выполнено на животных с полноценной иммунной системой. Какие модели вы намерены использовать, чтобы оценить безопасность и эффективность тех же вакцин для иммунокомпроментированных животных (состояние иммуносупрессии, аллергический статус)?

#### **Заключение**

Диссертация Ландграф Галины на тему: «МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МАРКЕРЫ В ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКЕ ПОЛИВАЛЕНТНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ГРИППА И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ» представляет самостоятельную

законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение актуальных для здравоохранения научных задач, а именно разработка и испытания быстрых, надежных и экономичных методов оценки поливалентных вакцинных препаратов против вируса гриппа и сопутствующих бактериальных инфекций. Рецензируемая работа Ландграф Галины «МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МАРКЕРЫ В ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКЕ ПОЛИВАЛЕНТНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ГРИППА И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ» полностью соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», а соискатель Ландграф Галина заслуживает присуждения ученой степени кандидата наук по научной специальности 1.5.11. Микробиология. Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не установлены.

Член диссертационного совета,  
доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник,  
главный научный сотрудник  
кафедры цитологии и гистологии СПбГУ



Самойлович Марина Платоновна

25.01.2023