

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента на диссертацию Старостиной Екатерины Владимировны  
на тему «**ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие искусственные антигены вируса гриппа**»,  
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: «молекулярная биология – 1.5.3»

### **Актуальность темы выполненной работы**

Вирусы гриппа А и В являются основными агентами, вызывающими сезонные эпидемии гриппа, которые охватывают до 10-20 % населения ежегодно, и способными вызывать серьезные поражения населения, вплоть до летальных исходов. Основной проблемой при разработке гриппозных вакцин высокая изменчивость патогена. Именно указанные факторы делают исследование Старостиной Е. В. особенно актуальной. Диссертационная работа Екатерины Владимировны Старостиной посвящена изучению ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих спроектированные антигены гриппа и исследованию их специфической активности в системах *in vitro* и *in vivo*.

Разработка универсальных вакцин в отношении широкого спектра родственных вирусов позволит “во всеоружии” встретить новые патогены человека, которые могут получить распространение, в том числе, в связи с глобальным изменением климата. Работа Старостиной Е. В., в которой исследованы конструкции, содержащие консервативные В- и Т-клеточные эпитопы антигенов вируса гриппа, создает основу и предлагает новые подходы к созданию таких универсальных вакцин. Исследование представляет большой интерес с практической точки зрения и затрагивает ряд фундаментальных аспектов вирусологии.

### **Общая характеристика диссертации**

Диссертация Старостиной Е.В. изложена на 151 странице, содержит 31 рисунок и 10 таблиц. Диссертация написана грамотно, стилистически хорошим языком, оформлена в соответствии с существующими требованиями. Диссертация содержит все традиционные разделы. Работа состоит из введения, главы «Обзор литературы», главы «Материалы и методы». Полученные данные

представлены в главе «Результаты», а глава «Обсуждение» посвящена обсуждению полученных результатов. В заключительной части диссертации, автор формулирует заключение и выводы. Цитированная литература отражена в списке использованной литературы из 319 источников.

Цель работы сформулирована как “разработка ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих искусственные антигены вируса гриппа, и исследование их специфической активности”. Задачи исследования сформулированы с учетом существующей научной проблемы, возможные подходы к решению которой критически отражены в обзоре литературы. Результаты собственных исследований базируются на анализе первичных данных. Раздел “Заключение” отмечает новизну применяемых в исследовании подходов, дает оценку возможных перспектив совершенствования этого подхода в будущем для увеличения иммуногенности ДНК-вакцин. Выводы полностью соответствуют полученным результатам.

### **Достоверность и новизна полученных результатов**

Достоверность и объективность полученных автором данных обеспечивается рационально подобранными математическими методами статистической обработки данных и анализом результатов.

В результате выполненных Е.В. Старостиной исследований показано, что ДНК-конструкции, кодирующие искусственные Т- и В-клеточные иммуногены, обеспечивали экспрессию целевых генов и наработку кодируемых ими белков в трансфицированных клетках. ДНК-вакцинные конструкции обеспечивали активацию вирус-специфического клеточного и гуморального иммунного ответа при иммунизации ими мышей. Впервые показано, что иммунизация мышей полученными ДНК-вакцинными конструкциями обеспечивает перекрестную защиту от заражения двумя сезонными штаммами вируса гриппа A/California/4/09 (H1N1pdm09) и A/Aichi/2/68 (H3N2).

### **Значение полученных результатов для науки и практики**

Полученные результаты Е.В. Старостиной представляет собой законченный научный труд. В результате выполнения работы реализован один из возможных

подходов к созданию универсальной противогриппозной вакцины, основанный на компьютерном дизайне искусственных пептидных антигенов, разрабатываемых на платформе ДНК-вакцин. Высокая практическая значимость исследования обусловлена тем, что представленные ДНК-конструкции являются прототипами вакцинных препаратов против вируса гриппа. Вакцинация плазмидными ДНК, кодирующими целевые антигены, вызывает как наработку специфических антител, так и активирует Т-клеточные ответы против двух сезонных штаммов вируса A/California/4/09 (H1N1pdm09) и A/Aichi/2/68 (H3N2) у иммунизированных мышей и обеспечивает частичную перекрестную защиту животных от смертельного заражения этими штаммами. С точки зрения вклада в фундаментальную науку, хочется отметить, что представленное исследование позволяет провести анализ иммуногенности пептидов различного состава (соотношение гидрофобных и гидрофильных остатков) для прогностического анализа эффективности развития иммунного ответа на подобные пептиды.

### **Замечания**

Несмотря на безусловно положительное впечатление, ниже перечислены недостатки, которые можно обнаружить при детальном ознакомлении с диссертацией:

- Недостаточно подробное описание экспериментальных методик. Так, например,

1) в разделах 2.2.1.-2.2.3. описано клонирование генов Т-клеточных эпитопов и нет описания клонирования В-клеточных эпитопов, и не совсем понятно откуда берутся плазмиды p-AgH1, p-AgH3 и p-AgM2 (стр. 54). Только в разделе “Результаты” есть краткое упоминание, что указанные плазмиды конструировали на основе плазмиды pcDNA3.1 (стр. 87).

2) глава 2.2.11 (стр.58) в разделе “Методы ” написана в стилистике описания результатов без необходимых методологических подробностей: не указано число клеток в лунке при трансфекции, название среды, в которой проводили трансфекцию, не описано, как открепляли и концентрировали трансфицированные клетки для дальнейшего анализа, не указан процент раствора параформальдегида для фиксации клеток.

3) в разделах 2.2.12-2.2.13 не указано в чем растворяли вакцинные ДНК для инъекций животным, не указан объем вводимого раствора. Не указано, в какой форме собирали и хранили образцы крови животных для анализа – с гепарином или без.

В качестве технического замечания хочу отметить, что рисунки 20, 28, 30 и 31 приведены в англоязычном варианте.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Все выше изложенное позволяет положительно оценить диссертационную работу Е.В. Старостиной. Диссертант полностью решил сформулированные задачи и достиг поставленной цели исследования. В диссертационной работе присутствуют все необходимые элементы научной новизны. Результаты, полученные в ходе исследования, имеют высокую практическую значимость для молекулярной биологии, вирусологии и медицины.

Диссертационная работа Е.В. Старостиной полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным работам по специальности «1.5.3 - молекулярная биология». Выводы соответствуют поставленным задачам и достаточно полно отражают результаты, полученные автором.

Таким образом, диссертационная работа Старостиной Екатерины Владимировны «ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие искусственные антигены вируса гриппа» является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой проведен тщательный анализ ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих антигены вируса гриппа А, и исследована их специфическая активность *in vitro* и *in vivo*. Работа имеет существенное значение для молекулярной биологии, вирусологии, практического здравоохранения, что соответствует всем требованиям пункта 9 Положения о порядке присуждения учёных степеней» от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым ВАК России к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой

степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник

Лаборатории биотехнологии

Института Химической Биологии

и Фундаментальной медицины СО РАН,

доктор биологических наук

 О.А. Коваль

“29” ноября 2021г.

630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8

[www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

[o.koval@niboch.nsc.ru](mailto:o.koval@niboch.nsc.ru)

Подпись д.б.н. Коваль О.А. заверяю.

**Пестряков Павел Ефимович**

Кандидат химических наук

Ученый секретарь Института Химической Биологии

и Фундаментальной медицины СО РАН

