

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Васильева Кирилла Александровича

«УСИЛЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ВИРУСОВ ГРИППА А ПУТЕМ ПОДАВЛЕНИЯ ИММУНОСУПРЕССОРНОЙ ФУНКЦИИ БЕЛКА NS1» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – «Вирусология».

### **Актуальность темы**

Основным методом защиты населения от гриппа является вакцинация, однако эффективность современных гриппозных вакцин недостаточна для предотвращения ежегодных эпидемий и периодических пандемий. Высокий уровень эволюционной изменчивости циркулирующих штаммов гриппа приводит к необходимости ежегодного пересмотра состава существующих вакцин. Нередко выпуск сезонных вакцин сопровождается ошибками прогнозирования актуальных штаммов вируса гриппа, что приводит к резкому снижению эффективности вакцинации.

Важное значение для разработки гриппозных вакцин широкого спектра действия имеют исследования, направленные на поиск способов усиления иммуногенности консервативных антигенных детерминант вируса гриппа. Перспективным направлением исследований в данной области является создание рекомбинантных вирусов с укороченным или удаленным неструктурным белком NS1, которые обладают сниженной репродуктивной активностью в респираторном тракте организма-хозяина, однако могут вызывать полноценный гуморальный и клеточный иммунный ответ, что позволяет использовать эти вирусы для создания живых аттенуированных гриппозных вакцин. Безопасность и иммуногенность живых интраназальных сезонных и пандемических вакцин на основе вируса гриппа с удаленной рамкой считывания белка NS1 была показана в ходе 1-2 фазы клинических исследований. Модификация гена NS путем внедрения в его состав фрагментов генома патогенных организмов, не родственных вирусу гриппа, является перспективным подходом для создания векторных вакцин мукозального применения против различных инфекций. Несмотря на большое число исследований, посвященных изучению влияния модификаций белка NS1 на формирование иммунного ответа к вирусу гриппа, малоизученными остаются многие аспекты механизмов формирования перекрестной защиты при иммунизации подобными штаммами. Актуальность работы К.А. Васильева не вызывает сомнений, поскольку целью работы является изучение в эксперименте молекулярно-клеточных



механизмов формирования кросс-протективного иммунитета в ответ на введение вирусов гриппа с модифицированным белком NS1.

В соответствии с целью работы автором были определены **задачи** исследования, включающие оценку гетерологичной защиты против вирусов гриппа А и В на модели гриппозной инфекции у мышей, иммунизированных вирусом гриппа А с укороченным белком NS1, сравнительный анализ маркеров активации факторов врожденного иммунитета при введении вирусов гриппа А с укороченным и полноразмерным белком NS1 и изучение влияния модификации белка NS1 на развитие адаптивного В-и Т клеточного иммунитета.

Диссертация изложена на 155 страницах машинописного текста, включая 1 таблицу и 30 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, пяти разделов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 537 источников на русском и английском языках, из которых более 50% опубликовано за последние 10 лет

В **«Обзоре литературы»** приведены современные литературные данные о структуре и репродукции вирусов гриппа, включая роль белка NS1 в регуляции иммунного ответа, при его написании использовано большое количество работ зарубежных авторов. Автором приводятся интересные сведения о факторах врожденного и адаптивного противовирусного иммунитета, проанализированы современные подходы к разработке универсальных гриппозных вакцин.

В главе **«Материалы и методы»** подробно описаны методы работы, дается характеристика использованных штаммов вируса гриппа, описываются методы оценки популяций клеток в перитонеальных смывах и гомогенатах легких с анализом большого набора активационных маркеров, приводятся методы статистической обработки полученных данных. В целом данная глава свидетельствует, что работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных вирусологических и иммунологических подходов.

Глава **«Результаты»** состоит из 5 разделов. В первом разделе автором приводятся результаты изучения патогенности и репликативной активности вируса гриппа с укороченным до 124 аминокислот белком NS1 (A/PR/8/34-NS124) в сравнении с исходным штаммом (A/PR/8/34) на мышинной модели. Показано, что укорочение белка NS1 ведет к частичной аттенуации штамма, проявляющейся в уменьшении патогенности для зараженных животных и существенном снижении репродукции вируса в легких. Далее была оценена возможность индукции гетеросубтипической и гетеротипической



перекрестной защиты от инфекции вирусам A/Aichi/2/68 (H3N2) и B/Malaysia/06/04 при интраназальной иммунизации штаммами с укороченным и полноразмерным белком NS1. Показано, что интраназальная иммунизация штаммом A/PR/8/34-NS124 способствовала формированию защиты от гетерологичных штаммов гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и B/Malaysia/06/04, так же как и перенесенная инфекция вирусом A/PR/8/34. В последующих разделах приводятся результаты исследований, раскрывающих механизмы наблюдаемой гетерологичной защиты. Установлено, что при интраперитонеальном введении вирусом A/PR/8/34-NS124 обладает повышенной цитокиногенностью по сравнению с исходным вирусом A/PR/8/34, что в большей степени способствует активации антигенпрезентирующих клеток. Анализ антигензависимой внутриклеточной продукции цитокинов эффекторными Т-лимфоцитами показал, что укорочение белка NS1 позволяет усилить CD8+ Т-клеточный иммунный ответ на отдельные эпитопы гриппа. Было установлено, что выраженного системного гуморального и клеточного иммунного ответа недостаточно для обеспечения полной гетерологичной защиты от летальной инфекции, хотя 40% и 20% животных, иммунизированных вирусом A/PR/8/34-NS124, выжили после заражения вирусами A/Aichi/2/68 (H3N2) и B/Malaysia/06/04 соответственно.

Для выявления механизмов протекции, наблюдаемой при интраназальной иммунизации, автором изучены локальные реакции врожденного и адаптивного иммунитета в легких у иммунизированных мышей линии C57Black/6 после гетерологичного заражения вирусом A/Aichi/2/68 (H3N2). Установлено, что иммунизация вирусами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 приводила к снижению уровня нейтрофилов и макрофагов в легких иммунизированных животных при заражении инфекционным вирусом по сравнению с неиммунизированными мышами и увеличению доли FOXP3+Helios+ Т-регуляторных лимфоцитов. При этом Т-клеточный иммунный ответ у животных, иммунизированных вирусом A/PR/8/34-NS124, после гетерологичного заражения был существенно выше, чем у мышей, иммунизированных исходным вирусом A/PR/8/34.

Обсуждение полученных результатов написано в соответствии с логикой изложения диссертационных материалов. В этом разделе обобщаются полученные результаты, обсуждаются различные аспекты иммунного ответа на противогриппозную иммунизацию и возможные пути применения штаммов с укороченным белком NS1 с учетом их высокого интерферогенного потенциала.

Выводы соответствуют основному содержанию работы.

**Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений**

Достоверность полученных автором экспериментальных данных основана на большом объеме проведенных лабораторных исследований с применением различных



моделей гриппозной инфекции и современных методик при большом разнообразии изученных маркеров активации иммунного ответа. Выводы основаны на результатах проведенных исследований и вытекают из материалов диссертации.

По теме диссертации было опубликовано 2 научные статьи в журнале *Microbiology Independent Research Journal*, входящем в Перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ, и 3 тезиса докладов. Материалы диссертационного исследования были представлены на 3-х международных конференциях.

### **Научная новизна диссертационной работы**

Автором впервые показана возможность усиления иммуногенности Т-клеточных эпитопов вируса гриппа путем подавления иммуносупрессорной функции белка NS1. Впервые продемонстрировано, что вирус гриппа А с укороченным белком NS1 при интраназальном введении приводит к формированию гетерологичной защиты как от инфекции вирусом гриппа А (H3N2), так и от вируса гриппа В. Показано, что кросс-протективный эффект при иммунизации вирусом гриппа А (H1N1) с укороченным белком NS1 достигается за счет ослабления воспалительной реакции при заражении гетерологичным штаммом вируса гриппа А (H3N2).

### **Практическая значимость исследования**

В работе обосновывается рациональность использования аттенуированных вирусов гриппа с модифицированным белком NS1 в качестве живых гриппозных вакцин и векторов. Автором оптимизирован метод оценки иммунного ответа на вирусы гриппа при интраперитонеальной иммунизации.

### **Замечания**

Существенных замечаний к работе нет, за исключением нескольких мелких ремарок: отсутствие общего резюме в обзоре литературы; ряд неточностей, вызванных, по-видимому, неудачным переводом с английского языка («индивид», «память врожденного иммунитета»), единичные опечатки в тексте диссертации. Вышеперечисленные замечания несколько не умаляют значимости полученных данных и не влияют на высокую оценку проделанной работы.

### **Вопросы**

**Вопрос 1.** На чем основан выбор параметрических критериев при статистической обработке выборок малого объема?

**Вопрос 2.** В конце раздела 4.4. «Изучение гетерологичной защиты при интраперитонеальной иммунизации штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124» автор предполагает, что для достижения полной защиты от гетерологичной инфекции необходимо формирование локального иммунитета. Одним из важных факторов

локального иммунитета являются IgA, преимущественно секреторные, которые образуются при мукозальной иммунизации. Есть ли данные о формировании сывороточных IgA при интраперитонеальной иммунизации по сравнению с интраназальным введением?

### Заключение

Диссертация К.А. Васильева «Усиление иммуногенности антигенных детерминант вирусов гриппа А путем подавления иммуносупрессорной функции белка NS1», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.02.02 – «вирусология», является завершенным научно-исследовательским трудом. В диссертации изучены механизмы формирования иммунного ответа и перекрестной защиты при иммунизации вирусом с укороченным белком NS1. Полученные автором результаты достоверны, положения и выводы достаточно обоснованы. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации. Опубликованные автором научные статьи полностью соответствуют теме диссертации. Диссертационная работа отвечает критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор – К.А. Васильев заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – Вирусология.

Официальный оппонент

Начальник отдела трансляционной медицины,

Ведущий научный сотрудник отдела вирусологии ФГБНУ «ИЭМ»

Д.м.н. Ю.А. Дешева.

30.11.2020

Подпись официального оппонента заверяю.

