

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

### **на диссертационную работу «УСИЛЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ВИРУСОВ ГРИППА А ПУТЕМ ПОДАВЛЕНИЯ ИММУНОСУПРЕССОРНОЙ ФУНКЦИИ БЕЛКА NS1»**

на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 03.02.02 - Вирусология

**Васильева Кирилла Александровича**

Диссертационная работа Васильева К.А. посвящена изучению способа усиления иммуногенности антигенов вируса гриппа при помощи подавления иммуносупрессорной функции белка NS1. Актуальность работы определяется необходимостью разработки противогриппозных вакцин, обеспечивающих перекрестную защиту от широкого спектра штаммов гриппа, формирующихся в результате антигенного дрейфа и антигенного шифта. Вакцинация традиционными инактивированными вакцинами или живыми аттенуированными вакцинами остается основной стратегией в борьбе с ежегодными сезонными эпидемиями, однако она обеспечивает полноценную защиту только при совпадении антигенной структуры компонентов вакцины и циркулирующих штаммов и не способна предотвратить распространение новых вирусов гриппа с пандемическим потенциалом. Кроме того, постоянный антигенный дрейф циркулирующих вирусов гриппа требует ежегодного перевыпуска сезонных вакцин и серьезно подрывает эффективность вакцинации. Таким образом, разработка новых подходов к вакцинопрофилактике гриппа по-прежнему остается актуальной для здравоохранения.

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 155 страницах текста, включая 30 рисунков и 1 таблицу. Список цитируемой литературы содержит 537 источников.

#### **Структура и результаты работы.**

В главе «Обзор литературы» дается достаточно полное описание современного состояния проблемы создания гриппозных вакцин. В частности описывается структурно-функциональная организация вируса

гриппа, особенности его строения, необходимые для понимания проблем, связанных с созданием вакцин и путей их преодоления. Подробно описываются особенности врожденного и адаптивного иммунного ответа при вакцинировании и инфицировании вирусом гриппа, в том числе уточняются особенности местных и системных реакций. Основываясь на данных литературы, дается подробное описание белка NS1, что подводит к пониманию, почему именно этот белок и далее примененный подход использован при создании гриппозной вакцины. В целом глава «Обзор литературы» дает полное представление современного состояния науки в изучаемом вопросе и дает исчерпывающую информацию для понимания идеологии работы, ее задач и полученных результатов. Глава хорошо и удобно структурирована и, несмотря на некоторую излишнюю объемность, очень хорошо и с интересом воспринимается, не оставляя ощущения перенасыщенности.

Глава «Материалы и методы» описывают объект исследования и использованные методы. Глава написана достаточно подробно. Использованные методы и объемы проведенных исследований являются адекватными для решения поставленных задач и формулировки результатов.

В разделе «Результаты» приводятся результаты изучения патогенности и репликативной активности штамма вируса гриппа с укороченным до 124 а.к. белком NS1 (A/PR/8/34-NS124) в сравнении со штаммом дикого типа (A/PR/8/34 (NSfull)) на мышинной модели. Показано, что укорочение белка NS1 ведет к частичной аттенуации штамма, проявляющейся в уменьшении патогенности для зараженных животных и снижении репродукции вируса в легких. Далее приводятся результаты оценки врожденного и адаптивного иммунного ответа на указанные штаммы при интраперитонеальной иммунизации. Установлено, что вирус A/PR/8/34-NS124 обладает повышенной цитокиногенностью по сравнению с вирусом дикого типа, а также в большей степени способствует активации антигенпрезентирующих клеток. Анализ антигензависимой внутриклеточной продукции цитокинов эффекторными Т-лимфоцитами показал, что укорочение белка NS1 позволяет усилить CD8<sup>+</sup> Т-клеточный иммунный ответ на отдельные эпитопы гриппа. Далее была оценена возможность индукции гетеросубтипической и гетеротипической перекрестной защиты от вирусов A/Aichi/2/68 и B/Malaysia/06/04 при интраперитонеальной и интраназальной

иммунизации штаммами с укороченным и полноразмерным белком NS1. Показано, что интраназальная иммунизация штаммом A/PR/8/34-NS124, наряду с инфекцией, вызванной вирусом дикого типа, способствует формированию защиты от гетерологичных штаммов гриппа A/Aichi/2/68 и B/Malaysia/06/04, в то время как интраперитонеальная иммунизация, несмотря на индукцию выраженного системного гуморального и клеточного иммунного ответа, не приводит к возникновению перекрестной защиты. Для выявления механизмов протекции были изучены локальные реакции врожденного и адаптивного иммунитета в легких у иммунизированных животных после гетерологичного челленджа вирусом A/Aichi/2/68. Установлено, что иммунизация вирусами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 приводит к снижению уровня нейтрофилов и макрофагов в легких иммунизированных животных по сравнению с контролем заражения и увеличению доли FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> Т-регуляторных лимфоцитов. При этом Т-клеточный иммунный ответ у животных, иммунизированных вирусом A/PR/8/34-NS124 после гетерологичного челленджа был существенно выше, чем у мышей, иммунизированных вирусом дикого типа. Таким образом, последовательно и детально оценены реакции (в том числе цитокинпродуцирующая функция) клеток врожденного иммунитета и адаптивного иммунитета (в том числе участие Т-регуляторных клеток, полифункциональных Т-клеток) на иммунизацию вирусом с укороченным белком NS1.

В главе «Обсуждения» детально рассматриваются полученные результаты исследования, а также соотносятся с данными современной литературы. В результате отражается значимость выполненной работы и полученных результатов, а также обозначаются перспективы применения полученных новых знаний в создании новых противогриппозных вакцин.

Цель и задачи сформулированы четко, в полной мере отражают объем и значение планируемых исследований. Выводы полностью соответствуют поставленным задачам.

Научная новизна работы обусловлена демонстрацией преимуществ использования вакцинного прототипа с укороченным белком NS1 в индукции протективного иммунитета при минимальном количестве возможных осложнений. Показано, что иммунизация вирусом гриппа А (H1N1) с укороченным белком NS1 приводит к предотвращению летальности

и ослаблению воспалительных реакций при последующем заражении гетерологичным штаммом вируса гриппа А подтипа H3N2.

Практическая значимость работы обусловлена обоснованием рациональности разработки нового поколения аттенуированных гриппозных вакцин с укороченным белком NS1.

Хотелось бы задать ряд вопросов:

1. В работе у Вас много говорится о полифункциональных Т-лимфоцитов, демонстрирующих различный спектр синтезируемых цитокинов. Как Вы полагаете, какую роль могут играть указанные клетки, а также особенности их функционирования в поствакцинальном иммунитете?

2. Вы не обнаружили достоверных различий в уровне периферических регуляторных Т-клеток в случае использования укороченного белка NS1, вместе с тем в легких уровень этих клеток достоверно повышался. Какое патогенетическое и, возможно, клиническое объяснение Вы можете дать этому наблюдению?

В целом работа вызывает положительные впечатления: работа четко структурирована, язык изложения доступный и интересный. Диссертация читается легко и последовательность изложения материалов и результатов обоснована.

### **Заключение**

Представленная диссертация представляет собой законченное научное исследование, проведенное на высоком методологическом уровне, является актуальным и значимым. По актуальности, научной новизне, объёму проведённого исследования, глубине анализа полученных данных и их доказательности, совокупности использованных методов, научной и практической значимости полученных результатов диссертация Васильева Кирилла Александровича на тему «Усиление иммуногенности антигенных детерминант вирусов гриппа а путем подавления иммуносупрессорной функции белка NS1» соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года № 842, в редакции Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 №335, от 28.08.2017 №1024, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата

наук, а её автор достоин присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.02 – Вирусология».

Официальный оппонент:

Руководитель группы генно-клеточной инженерии,  
института молекулярной биологии и генетики

ФГБУ Национальный медицинский

исследовательский центр им. В.А. Алмазова,

доктор медицинских наук

Головкин Алексей Сергеевич

« 30 » 11 2020 г.

197341, Санкт-Петербург, ул. Акkuratова, д.2

[www.almazovcentre.ru](http://www.almazovcentre.ru)

[Golovkin\\_as@almazovcentre.ru](mailto:Golovkin_as@almazovcentre.ru)

Подпись д.м.н. Головкина А.С. заверяю.

**Недошивин Александр Олегович**

Доктор медицинских наук, профессор

Ученый секретарь

Национального медицинского исследовательского

центра им. В.А. Алмазова

Министерства здравоохранения Российской Федерации

