

«УТВЕРЖДАЮ»  
Заместитель директора  
по научной работе  
ФБУН НИИ  
эпидемиологии и  
микробиологии им. Пастера,  
к.б.н. Дедков В.Г.

« 22 » август 2020 г.



### **ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

о научно-практической значимости диссертации Васильева Кирилла Александровича на тему: «Усиление иммуногенности антигенных детерминант вирусов гриппа А путем подавления иммуносупрессорной функции белка NS1», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

#### **Актуальность темы диссертационного исследования**

Согласно оценкам Центров по контролю и профилактике болезней Соединенных Штатов Америки (ЦКБ США), Всемирной организации здравоохранения и глобальных партнеров в области здравоохранения, каждый год от респираторных заболеваний, вызванных сезонным гриппом, умирает до 650 000 человек. И, хотя по данным ЦКБ США, большинство случаев смерти происходят среди лиц в возрасте старше 75 лет в экономически слабых регионах, ассоциированная с гриппом смертность регистрируются ежегодно и в развитых странах мира.

В Российской Федерации заболеваемость гриппом в 2019 году составила 37,31 на 100 тыс. населения, было зарегистрировано 166 летальных исходов.

Наиболее эффективным способом контроля той или иной инфекции является специфическая профилактика. Однако эффективная

Высокая скорость мутаций в вирусном геноме и его сегментарная природа приводят к быстрой смене циркулирующих штаммов вируса гриппа, что обуславливает необходимость ежегодного пересмотра состава существующих гриппозных вакцин. При этом выпуск сезонных вакцин может сопровождаться ошибками прогнозирования циркулирующих штаммов вируса, что приводит к резкому снижению эффективности вакцинации.

Исследования, направленные на поиск способов усиления иммуногенности консервативных антигенных детерминант вирусов гриппа, способствуют созданию вакцин широкого спектра действия, индуцирующих перекрестную защиту от циркулирующих штаммов данного патогена. Это научное направление особенно актуально в период пандемии COVID19, когда особенно остро стоит задача предотвращения развития сочетанных гриппозной и коронавирусной инфекций. В связи с изложенным, диссертационное исследование Васильева Кирилла Александровича, посвященное созданию модифицированных вирусов гриппа А с усиленными иммуногенными свойствами, следует признать актуальным и своевременным.

#### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, сформулированных в диссертации**

Основные положения диссертации, выносимые на защиту, отражающие научную новизну и практическую значимость работы, хорошо аргументированы. Работа выполнена на модели штаммов вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), кодирующих полноразмерный белок NS1 (A/PR/8/34 (NSfull)), или укороченный до 124 а. к. белок NS1 (A/PR/8/34-NS124). Штаммы были получены из «дикого» вируса A/PR/8/34 методом «обратной генетики».

В работе использован широкий спектр современных вирусологических, серологических, иммунологических, цитологических методов исследования; экспериментальная часть работы выполнена в опытах *in vivo* на лабораторных мышях. Результаты исследования подвергнуты статистической обработке с использованием компьютерной программы RStudio Desktop 1.0.153 (RStudio

экспериментальная часть работы выполнена в опытах *in vivo* на лабораторных мышах. Результаты исследования подвергнуты статистической обработке с использованием компьютерной программы RStudio Desktop 1.0.153 (RStudio Inc, США) и применением адекватных статистических методов (критерий Даннета, t-критерия Стьюдента, тест Манна-Уитни, критерий Тьюки).

**Научная новизна исследования** обусловлена несколькими аспектами.

Автором дана комплексная характеристика врожденного и адаптивного иммунного ответа на вирусы гриппа А с укороченным белком NS1.

Впервые показана возможность усиления иммуногенности Т-клеточных эпитопов вируса гриппа подавлением иммуносупрессорной функции белка NS1.

Впервые установлено, что иммунизация вирусом гриппа А (H1N1) с укороченным белком NS1 приводит к предотвращению летальности и ослаблению воспалительной реакции при последующем заражении штаммом вируса гриппа А подтипа H3N2.

Диссертант экспериментально установил, что тяжелая гриппозная инфекция, вызванная вирулентным вирусом гриппа А (H1N1), приводит к формированию защиты как от вируса гриппа А подтипа H3N2, так и от вируса гриппа В, и доказал, что сопоставимый уровень протекции обеспечивает аттенуированный вирус гриппа А с укороченным белком NS1.

**Теоретическая и практическая значимость работы:**

Полученные результаты расширяют существующие представления о механизмах формирования кросс- протективного иммунного ответа при экспериментальной гриппозной инфекции и интраназальной иммунизации вирусом гриппа с укороченным белком NS1.

Разработан подход, позволяющий проводить сравнительные иммунологические исследования вирусов гриппа с различной репликативной активностью в респираторном тракте мышей. Показано, что интраперитонеальная иммунизация является адекватной моделью изучения



иммуногенности аттенуированных и патогенных вирусов в условиях равной антигенной нагрузки.

Автором получены свидетельства ключевой роли мукозального иммунитета в обеспечении гетерологичной защиты, раскрыты механизмы формирования иммунного ответа на вирусы гриппа с укороченным белком NS1.

Эти результаты служат теоретическим обоснованием использования таких штаммов в качестве живых аттенуированных гриппозных вакцин и векторов, индуцирующих высокий уровень Т-клеточного иммунного ответа к консервативным эпитопам белков вируса гриппа. Важно, что вакцины, созданные на основе таких штаммов, безопасны для человека, поскольку не способны к репродукции в клетках респираторного тракта.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Материалы диссертационного исследования были представлены на трех международных конференциях: Trends in Influenza Research (18-20 сентября 2017 г., Санкт-Петербург, Россия); 12th Vaccine Congress (16-19 сентября 2018 г., Будапешт, Венгрия); OPTIONS X for the Control of Influenza (28 августа - 1 сентября 2019 г., Сингапур).

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них 2 научные статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ и трое тезисов докладов.

### **Характеристика работы**

Цель работы состояла в изучении иммунологических механизмов формирования кросс-протективного иммунного ответа на вирус гриппа с модифицированным белком NS1. Задачи исследования логично вытекают из поставленной цели.

Диссертация К.А. Васильева имеет традиционное построение и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, главы собственных исследований, содержащей 5 подглав, обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой

В обзоре литературы автор квалифицированно и информативно представил теоретическое обоснование актуальности проделанной работы. Подробно изложены современные представления о структурно-функциональной организации вириона и цикле репродукции вируса гриппа, описаны механизмы развития врожденного и адаптивного иммунного ответа на вирус гриппа; представлены современные сведения о белке NS1, как многофункциональном факторе избегания иммунного ответа. В полной мере представлены данные мировой литературы, свидетельствующие о неудовлетворительном состоянии в решении ряда проблем, связанных с вакцинопрофилактикой гриппа, проанализированы современные подходы к созданию универсальной гриппозной вакцины. Критический анализ опубликованных работ позволил автору обосновать актуальность выбранной темы, выделить ключевые задачи исследования.

Качественность и достоверность научных результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, во многом определены использованием современных методов исследования, которые описаны в разделе «Материалы и методы».

Использование вирусологических, серологических, иммунологических, цитологических методов позволило автору провести углубленное изучение в экспериментах на лабораторных мышах линии Balb/c патогенности, репродуктивной активности и кросс-протективных свойств вирусов A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124; изучить продукцию цитокинов воспаления в респираторном тракте мышей в ответ на заражение штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124; провести сравнительное изучение иммуногенности штаммов A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 в условиях равной антигенной нагрузки, для чего обосновано была использована интраперитонеальная иммунизация.

В результате проведенных экспериментов диссертант установил, что использованный в работе штамм вируса гриппа с укороченным до 124 а.к. белком NS1 имеет аттенуированный фенотип по сравнению с аналогичным

штаммом с полноразмерным белком NS1. При этом автор показал, что при интраназальной иммунизации аттенуированным вирусом A/PR/8/34-NS124 формируется перекрестная защита, предотвращающая летальность при заражении вирусами гриппа А (H3N2) и В, как это происходит после экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной вирулентным вирусом A/PR/8/34 (H1N1).

Используя интраперитонеальную иммунизацию, диссертант доказал, что укорочение белка NS1 до 124 а.к. способствует более эффективной презентации вирусных антигенов за счет кратковременного усиления продукции провоспалительных цитокинов, интенсификации миграции дендритных клеток, а также повышения уровня экспрессии CD86. В условиях интраперитонеальной иммунизации было также установлено, что вирус гриппа A/PR8/NS124 вызывает формирование повышенного числа антигенспецифичных эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов по сравнению со штаммом с полноразмерным белком NS1. Наиболее выраженные различия между группами были выявлены по относительному содержанию полифункциональных Т-лимфоцитов, имеющих фенотип CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL2<sup>-</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL2<sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup>.

Кроме того, в ходе проведенных экспериментов К.А. Васильев установил, что, хотя интраназальная иммунизация животных вирусом A/PR/8/34-NS124 (H1N1) не предотвращает от заражения гетерологичным штаммом A/Aichi/2/68 (H3N2), однако приводит к более легкому течению инфекционного процесса за счет достоверного уменьшения вирусной нагрузки, снижения уровня продукции провоспалительных цитокинов и ограничения макрофагальной и нейтрофильной инфильтрации легочной ткани.

В главе "Обсуждение" автор на высоком профессиональном уровне анализирует полученные результаты и обсуждает их в контексте с имеющимися литературными данными.



ограничения макрофагальной и нейтрофильной инфильтрации легочной ткани.

Все полученные в ходе выполнения работы результаты статистически обработаны

В главе "Обсуждение" автор на высоком профессиональном уровне анализирует полученные результаты и обсуждает их в контексте с имеющимися литературными данными.

Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений не вызывает сомнений. Четыре вывода, которыми заканчивается работа, аргументированы и полностью подтверждены полученными результатами.

Проведенные автором исследования имеют большое практическое и социально-экономическое значение, обусловленное важной ролью, которую вирусы гриппа играют в структуре инфекционной заболеваемости во всех странах мира.

Принципиальных замечаний по диссертации нет. Вызывает сожаление, что столь интересные, разноплановые, обладающие несомненной научной новизной и практической значимостью результаты отражены в столь немногочисленных публикациях по теме диссертационного исследования. Это замечание не носит принципиального характера и не влияет на общую положительную оценку работы.

### **ВОПРОС ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ**

Какие иммунологические механизмы могут быть задействованы в обеспечении кросс-протективной защиты от вируса гриппа типа В после инфекции или вакцинации вирусом гриппа типа А?

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Васильева Кирилла Александровича на тему: «Усиление иммуногенности антигенных детерминант вирусов гриппа А путем подавления иммуносупрессорной функции белка NS1» представляет собой самостоятельно выполненную и законченную научно-

квалификационную работу, в которой решена актуальная научная задача по изучению механизмов формирования иммунного ответа и перекрестной защиты при иммунизации вирусом гриппа с укороченным белком NS1. По актуальности, объему проведенных исследований, методическому уровню, научной ценности и практической значимости работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждении ученых степеней» ВАК РФ, (утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Васильев Кирилл Александрович, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Отзыв подготовлен:

Зав. лабораторией экспериментальной вирусологии  
ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ  
эпидемиологии и микробиологии  
им. Пастера», д.м.н.

И.Н. Лаврентьева

Подпись И.Н. Лаврентьевой заверяю  
Ученый секретарь  
ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ  
эпидемиологии и микробиологии  
им. Пастера», к.м.н.

Г.Ф. Трифонова

Отзыв обсужден и одобрен на заседании проблемной комиссии по вирусологии ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» протокол № 08/20 от «25» ноября 2020 г.