

Отзыв официального оппонента

доктора биологических наук Ленёвой Ирины Анатольевны

на диссертацию Лосева Игоря Владимировича на тему: «Особенности развития адаптивного иммунного ответа к вирусам гриппа А (H5N1), А(H5N2) и А(H2N2)», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

Актуальность темы. О том насколько важной проблемой является грипп, как в настоящее время он волнует буквально все население планеты, можно судить по тому, что все чаще и чаще в анонсы газет и телевизионных новостей выносятся не политические и экономические события, а сообщения о вспышках этого заболевания среди людей и животных. В 2009-2010 г. мы явились свидетелями пандемии вызванной вирусом гриппа H1N1, имеющим происхождение от свиных, птичьих и человеческих вирусов гриппа. Несмотря на то, что в настоящее время доминирующими в мире среди вирусов гриппа человека А являются H1N1 2009, H3N2, нельзя упускать из-под надзора другие вирусы, ранее вызывавшие вспышки заболеваемости среди людей и животных. К таковым безусловно относится вирус гриппа H5N1, а также вирус гриппа H2N2, обладающие потенциалом пандемических агентов.

ВОЗ в качестве основной стратегии борьбы с гриппозной инфекцией рекомендована вакцинация. Один из уроков, извлеченных из пандемии 2009 г., таков: несмотря на достижения науки для создания, проверки, производства и распространения вакцины требуется не менее, а часто более 6 месяцев – слишком долгий период времени в условиях надвигающейся эпидемии. Так вакцина к последнему пандемическому вирусу, зарегистрированному в апреле 2009 г. стала доступна для широких слоев населения в США только к декабрю, а в России – в 2010 г. В рамках выполнения задач, поставленных Всемирной организацией здравоохранения в преддверии возникновения пандемии гриппа во всех странах должны быть разработаны государственные программы, предусматривающие быстрое и своевременное обеспечение населения эффективными вакцинами и создание их резерва. Для выполнения этих задач важны как всесторонняя характеристика имеющихся профилактических потенциально пандемических вакцинных препаратов, так и оценка иммунного статуса населения. В связи с вышесказанным актуальность работы Лосева И.В. посвященной изучению особенностей развития адаптивных иммунных реакций к вирусам, А(H5N1) и А(H2N2), обладающих потенциалом пандемических агентов, не вызывает сомнений.

Содержание диссертации. Диссертация написана по традиционной структуре и включает: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, собственные результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Диссертационное исследование изложено на 154 страницах машинописного текста, включает 28 таблиц и 5 рисунков, в списке литературы процитировано 216 источников, из них 25 отечественных и 191 иностранных авторов.

Обзор литературы состоит из трёх глав. Первые две главы посвящены описанию накопленных данных из молекулярной биологии, эпидемиологии, а также иммунологии вирусов гриппа А(H5N1) и А(H2N2), полученных при обследовании переболевших гриппом и вакцинированных людей. Третья глава «Актуальные вопросы формирования адаптивного иммунитета к вирусам гриппа А» включает накопленные литературные данные по затронутым в диссертации вопросам иммунологии гриппа А: роли Т-клеток в защите от гриппа, поствакцинальный Т-клеточный иммунный ответ, формирование поствакцинальной и постинфекционной иммунологической памяти, индукция гетеросубтипического иммунитета, связь иммунного ответа с мутагенезом возбудителя. Можно констатировать, что обзор полон и отвечает поставленным целям и задачам диссертационной работы. Особо хочется отметить, что обзор завершается кратким заключением, в котором представлен анализ литературных данных с точки зрения фокусирования на тему выполняемого исследования.

Раздел **Материалы и методы** содержит полный перечень применяемых автором методик, вакцин, штаммов и описание обследуемых контингентов людей, и проводимых экспериментальных исследований.

Центральной частью работы являются полученные диссертантом **Собственные результаты исследования**, которые условно можно разделить на четыре большие части. **Первая** из них посвящена изучению особенностей формирования постинфекционного гетеросубтипического иммунитета людей к зоонозным (А(H5N1) и А(H5N2)) и антропонозному (А(H2N2)) вирусам гриппа в условиях современного эпидемического процесса во время циркуляции гриппа А(H1N1) и А(H3N2). Эти исследования включали определение сывороточных и локальных антител, а также Т-клеток иммунологической памяти разных фенотипов, специфичных к перечисленным вирусам. У части обследованных лиц обнаружены кроссреактивные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки иммунологической памяти к нециркулирующим вирусам А(H5N1), А(H5N2), А(H7N3) и А(H2N2), при этом сывороточные антитела к этим возбудителям, фиксируемые в РТГА и РМН отсутствовали. **Вторая** глава включает материалы, отражающие особенности развития иммунного ответа людей на двукратную прививку резервной живой гриппозной вакциной, приготовленной из вируса А(H5N2). Эти материалы освещают стимуляцию искусственно индуцированного первичного иммунного ответа взрослых людей на вирус, с которым они ранее не встречались. Изучение факторов, представляющих разные звенья адаптивного противогриппозного иммунитета после первой и второй вакцинации показало, что вакцина активно индуцировала не только иммунный ответ к вакцинному штамму А(H5N2), но и к штамму А(H5N1). Использование дополнительно к РТГА (официально регламентированный тест для оценки иммуногенности гриппозных вакцин) других иммунологических тестов повышало показатели частоты конверсии факторов адаптивного иммунитета с 38% до 97%, повторная прививка ЖГВ (H5N2) увеличивала

число гуморальных и Т-клеточных ответов в 2-3 раза. При высокой частоте поствакцинальных гуморальных иммунных ответов, их интенсивность оказалась весьма низкой. В результате в поствакцинальный период по данным регламентированного теста у волонтеров отсутствовали антитела в защитных титрах. Это затрудняло получение ответа на главный вопрос о гипотетической протективности данной вакцины в отношении вируса гриппа А(Н5N1). Для решения этого вопроса было проведено исследование по оценке способности живой гриппозной вакцины (Н5N2) индуцировать иммунологическую память, являющуюся главным фактором протективности поствакцинального иммунитета, результаты которого представлены в **третьей** части. Для этого использована известная система вакцинации «праймирование – бустирование», то есть оценка у лиц, праймированных живой гриппозной вакциной (Н5N2) количественных параметров иммунного ответа на отдаленную во времени (через 1,5 года) вакцинацию инактивированной гриппозной вакциной (Н5N1). Обнаружен бустлирующий эффект у праймированных лиц, проявляющийся в ускоренной и усиленной продукции сывороточных и секретируемых *in vitro* антител. Это касалось выработки антител как к вирусу гриппа А(Н5N2), так и к А(Н5N1). Кроме того, праймирование повышало и авидность сывороточных IgА- и IgG-антител. Эти данные в совокупности показывают способность резервной отечественной живой гриппозной вакцины (Н5N2) стимулировать долговременную В-клеточную иммунологическую память к вирусу гриппа А(Н5N1), а, следовательно, возможность её применения в новом качестве – праймирующего агента, формирующего предсуществующий иммунитет, в случае угрозы распространения потенциально пандемического вируса гриппа А(Н5N1).

Четвёртая глава посвящена исследованию иммунного ответа к вирусам гриппа А(Н2N2) в эксперименте на животных. Сравнение иммуногенной активности «дикого» вируса гриппа А(Н2N2), как эталонного по иммуногенности штамма, вакцинного штамма, как штамма с полным набором аттенуирующих мутаций внутренних белков, и различных штаммов вируса гриппа А(Н2N2) с набором одиночных и комплексных мутаций внутренних белков от донора аттенуации позволил, во-первых, сравнить иммуногенность «дикого» и вакцинного вируса, во-вторых, оценить вклад каждой мутации или комплекса мутаций в изменение иммуногенности, в-третьих, вычленил наиболее перспективные мутации, которые обеспечивали аттенуацию штамма в сочетании с высокой иммуногенностью.

В разделе **Обсуждение** автор обсуждает полученные данные и оценивает их с позиций мирового научного опыта, полностью отражает результаты исследования, вытекающие из них выводы и практические рекомендации, обобщая проделанную работу.

Выводы из выполненной работы соответствуют поставленным задачам, подводят итог проведенным исследованиям и достаточно полно отражают результаты, полученные автором.

Научная новизна и достоверность полученных результатов. Научная новизна работы Лосева И.В. заключается в комплексном подходе к изучению проблемы, то есть исследование гомологичного и гетерологичного поствакцинального Т- и В-клеточного адаптивного иммунного ответа к изучаемым потенциально пандемическим штаммам. Конкретно автором впервые проведено

1. Комплексное изучение системного гуморального, локального гуморального и Т-клеточного популяционного иммунитета к этим вирусам гриппа А.
2. Комплексное исследование иммуногенности отечественной резервной живой гриппозной вакцины (H5N2) на предмет стимуляции продукции антител и Т-клеток иммунологической памяти к вирусу гриппа А(H5N1) непосредственно после вакцинации, а также по индукции долговременной иммунологической памяти.
3. Сравнительное экспериментальное исследование способности вируса гриппа А(H2N2) индуцировать разные звенья адаптивного иммунитета в зависимости от набора мутаций в генах, кодирующих внутренние белки PB1, PB2, PA, NP, M1 и NS.

Достоверность результатов и объективность выносимых на защиту положений и выводов диссертации подтверждается как значительным объёмом исследований и фактического материала, так и использованием самых современных средств и методик проведения исследований

Апробация результатов. Основные результаты, положения и выводы диссертации отражены в 8 печатных работах в отечественных журналах, рекомендованных ВАК, а также в 2 зарубежных изданиях. Научные достижения автора представлены на 6 отечественных и зарубежных конференциях, и опубликованы в виде тезисов.

Значение полученных результатов для науки и практики. С теоретических позиций вирусологической иммунологии, проведённая работа расширяет знания об особенностях формирования гомологичного и гетерологичного адаптивного иммунного ответа при первичном и вторичном контактах организма с вирусом гриппа А различных подтипов антропонозного и зоонозного происхождения в условиях современного эпидемиологического процесса и противогриппозной вакцинации. Полученные в этой области данные позволяют обосновать ряд практических рекомендаций, касающихся адекватной оценки иммуногенности резервных живых гриппозных вакцин и диапазона их применения при угрозе распространения тех или иных потенциально пандемических вирусов гриппа А. В частности, важнейшим подтверждением практической значимости работы является получение свидетельства о внедрении метода «Технология оценки поствакцинальной секреции антител культурой В-лимфоцитов *in vitro*» (регистрационный номер 557-15008-и, дата регистрации – 16 ноября 2015 года).

Замечания и вопросы.

В рецензируемой диссертационной работе не выявлены существенные недостатки. В качестве отдельных замечаний по оформлению, а также вопросов можно отметить следующие:

1. В разделе Материалы и методы не указано, были ли зарегистрированы клинические испытания ЖГВ, если да, то необходимо указать номера регистрации исследований на сайте <http://www.clinicaltrials.gov/>.
2. В разделе Материалы и методы в пункте 3.3. было бы полезно подробно описать процедуру получения легких и особенно верхних дыхательных путей у животных для дальнейшего определения титра вируса в них
3. При исследовании иммунного ответа к вирусам гриппа А(Н2N2) из-за строгого ограничения на введение людям вируса гриппа А(Н2N2) вы использовали мышиную модель. В настоящее время проводится большое количество исследований с реассортантами, сходными с Вашими, на хорьках, которые по ряду параметров считаются более оптимальной моделью для изучения гриппозной инфекции. Понятно, что проведение исследований на хорьках требует особых условий и вряд ли было бы осуществимо в рамках данной диссертационной работы. Однако, хотелось бы знать есть ли подобные данные в литературе на хорьках, если да, насколько данные, полученные вами на модели мышей коррелируют с данными, полученными на модели хорьков, есть ли различия и если есть, то какие и чем им можно объяснить? Как Вы считаете, насколько данные, полученные Вами на мышах, можно перенести на человеческую популяцию?
4. В тексте присутствуют некоторые стилистические неточности. Так, например, на стр. 28 и 35 есть ошибки в согласовании падежей у существительных в предложениях. При обозначении сокращений не приведен русский перевод MOI – множественность инфекции. Также упоминаются (например, на стр. 78 диссертации) научные направления: «вирусологическая иммунология» и «молекулярно–генетическая иммунология», которые на мой взгляд спорны и не являются общепринятыми, однако использование данных терминов может являться правом и точкой зрения автора.

Возникшие вопросы и замечания носят частный, возможно дискуссионный или субъективный характер, ни в коей мере не снижают значимость, ценность и положительную оценку работы, и не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту.

Заключение. Работа Лосева И.В. представляет собой самостоятельный законченный труд с аргументированными положениями и выводами. Она обладает внутренним единством, содержит

новые научные результаты и положения, выносимые на защиту. Практическая значимость диссертации логически вытекает из полученных автором данных.

Считаю, что диссертационная работа Лосева Игоря Владимировича отвечает требованиям, изложенным в постановлении правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г., а сам автор достоин присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Официальный оппонент

Заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»,
доктор биологических наук

Ленёва И.А.

Россия 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а
Тел.: +7(495)674-7691
wnyfd385@yandex.ru

Подпись официального оппонента
Ленёвой И.А.

Учёный секретарь ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова»
кандидат биологических наук



Н.И. Андропова