

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о диссертационной работе Лосева Игоря Владимировича на тему:

«Особенности развития адаптивного иммунного ответа к вирусам гриппа А(Н5N1), А(Н5N2) и А(Н2N2)», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

**Актуальность темы.** Постоянная угроза появления новых пандемических вариантов вируса гриппа А обуславливает актуальность изучения механизмов взаимодействия вируса гриппа с иммунной системой для разработки новых, эффективных и все более совершенных подходов к профилактике гриппа. Учитывая изменчивость вируса гриппа, особо актуальной является разработка резервных вакцин, которые можно было бы приготовить заранее для защиты от наиболее вероятных этиологических агентов будущих пандемий. Сегодня кандидатами на эту роль считаются птичьи вирусы с гемагглютинидами Н5, Н6, Н7 и Н9 и человеческий вирус А(Н2N2), циркулировавший в 1957-1968 гг. и имеющий высокую вероятность рециркуляции.

Исследование И.В. Лосева посвящено именно этим двум типам вируса гриппа А – птичьему с гемагглютинином Н5, как наиболее патогенному для людей, и человеческому Н2N2.

Что касается птичьего вируса Н5, то в работе была использована отечественная живая гриппозная вакцина А(Н5N2) и тщательно изучены иммунологические реакции на эту вакцину. Наиболее перспективным и интересным аспектом явилось изучение репертуара вызываемых вирусом А(Н5N2) иммунологических реакций в отношении вирусов других типов, в частности, в отношении потенциально пандемического вируса А (Н5N1).

Целью исследования был вопрос: вызывает ли вакцина А(Н5N2) так называемый гетеросубтипический иммунитет (т.е. перекрестный иммунитет к вирусу другого типа, опасному и потенциально ожидаемому) и может ли готовая вакцина А(Н5N2) использоваться в качестве резервной в случае прихода пандемического штамма А(Н5N1). Более того, цель была поставлена более широко – проверить могут ли возникать гетеросубтипические иммунные реакции (в том числе против гемагглютинина Н5) под влиянием вирусов других типов, не содержащих этого гемагглютинина. С этой целью в качестве иммуногена автор использовал вирусы А(Н1N1) и А(Н3N2), циркулирующие в настоящее время или циркулировавшие в определенные время в прошлом.

Следует признать работу актуальной, а аспект поиска гетеросубтипических иммунных реакций очень современным и важным в практическом отношении.

**Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования.** В работе два больших и интересных раздела. Первый посвящен формированию гетеросубтипического иммунитета к птичьим вирусам гриппа А (Н5N1, Н5N2) и вирусу (Н2N2) в условиях современного эпидемического процесса при гриппе А(Н1N1) и А(Н3N2). Второй – анализу гомологичного и гетерологичного иммунного ответа людей на живую гриппозную вакцину Н5N2.

В первом разделе впервые показано, что при гриппе, вызванном штаммами вируса А(Н1N1) и А(Н3N2), у людей происходит формирование антител не только к гомологичному гемагглютинину Н1 или Н3, но также к вирусам совершенно других типов, а именно к вирусам, содержащим гемагглютинин Н2 или гемагглютинин птичьего гриппа Н5. Эти данные имеют важное практическое значение, т. к. указывают на то, что в ходе иммунного ответа против обычного сезонного гриппа формируется некая иммунная защита против потенциально опасных для людей штаммов вирусов

птичьего гриппа. Очень важно, что при этом формируются соответствующие антитела, а также антигенспецифичные В- и Т-клетки памяти. И здесь автор демонстрирует широкий спектр иммунологических методов, которыми владеет в совершенстве. Это и стандартная реакция торможения гемагглютинации для выявления антител, и реакция микронеutralизации и иммуноферментный анализ для идентификации антител, продуцируемых клетками периферической крови, и определение IgA в секретах верхних дыхательных путей, и проточная цитофлуориметрия, с помощью которой он показал образование и накопление вирусспецифических В- и Т-клеток памяти разного типа. При этом исследованы показатели как системного иммунного ответа (кровь), так и локального (слюна, смывы верхних дыхательных путей).

Во втором разделе впервые показано формирование гетеросубтипического иммунитета у людей к потенциально пандемическим птичьему (H5N1) и человеческому (H2N2) вирусам гриппа А в условиях естественного эпидемического процесса – т.е. при гриппе А(H1N1) и А(H3N2). Эти данные обладают приоритетной новизной и существенно расширяют научные представления о репертуаре перекрестных иммунных реакций, вызываемых вирусом гриппа А.

Автором также впервые показано развитие гетеросубтипического иммунного ответа на потенциально пандемический вирус А(H5N1) при иммунизации безопасной живой гриппозной вакциной H5N2. Эти данные важны в практическом плане, т.к. обосновывают возможность использования живой гриппозной вакцины H5N2 для защиты от потенциально пандемического вируса гриппа А (H5N1).

Практически важным разделом работы является изучение иммунных показателей у людей, имевших контакт с вирусом А(H2N2) в 1957-1968 гг., то есть у родившихся до 1957г. Показано, что эта группа лиц сохраняет

системная и местную В-клеточную память к возбудителю. У них обнаружены сывороточные антитела и локальные IgA-антитела.

Показано, что локальные IgA-антитела и кроссреактивные цитотоксические Т-клетки (возникшие за счет гетеросубтипических реакций на актуальные вирусы гриппа) могут частично защитить людей, не контактировавшие с вирусами А(Н2N2) или А(Н5N1), при возникновении пандемий гриппа. Эти данные расширяют не только теоретические знания об особенностях иммунной защиты против вируса гриппа, но являются основой для разработки новых профилактических мероприятий.

Существенным практическим выводом из настоящего исследования является доказательство того, что отечественная живая гриппозная вакцина Н5N2 вызывает образование высокоavidных антител и индуцирует долговременную иммунологическую память не только к гомологичному вирусу, но и к потенциально пандемическому вирусу Н5N1, и благодаря этим свойствам может быть использована для защиты людей от потенциально пандемического вируса гриппа А(Н5N1).

Впервые четко и убедительно показано, что для надежной оценки эффективности и иммуногенности вакцины должны быть использованы данные не одного, а нескольких иммунологических тестов, в частности, РТГА+РМН+ИФА+Т-клетки. Только комплекс реакций и их совокупные данные позволяют адекватно судить о частоте конверсий иммунных реакций на вакцину. Этот вывод важен для практики. Результаты проведенного исследования обосновывают необходимость дополнения регламентированного теста (РТГА) другими иммунологическими реакциями.

**Общая оценка структуры и содержания работы.** Диссертационная работа И.В. Лосева изложена на 134 страницах, иллюстрирована 28 таблицами и 5 рисунками. Список литературы содержит 216 источников, из которых отечественных – 25, зарубежных – 191. Анализ широкого спектра

публикаций позволил автору глубоко ориентироваться в исследуемой проблеме и логично обосновать и резюмировать собственные результаты в главах «Обзор литературы» и «Обсуждение».

Текст диссертации изложен доступным литературным языком. Таблицы и рисунки обеспечивают наглядность представленных результатов, облегчают их анализ для читателя. Работа выполнена на высоком полиграфическом уровне и в соответствии со всеми требованиями, предъявляемыми к научному изданию. Автореферат и выводы полностью отражают содержание диссертации.

**Апробация результатов.** Следует особо отметить достаточно полную апробацию результатов исследования И.В. Лосева в научных изданиях и активное участие автора в конференциях. По материалам диссертации опубликовано 17 статей в том числе 8 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования материалов диссертационных исследований, 2 статьи в зарубежном профильном журнале, несколько работ в сборниках и 6 тезисов. Результаты исследования доложены на 5 российских и международных конференциях. Т.о., материалы диссертации достаточно полно изложены в опубликованных работах и докладах.

**Вопросы, замечания.** Существенных замечаний, которые вызывали бы принципиальные возражения против основных данных работы, ее выводов и положений, выносимых на защиту, у оппонента нет. Работа хорошая, современная. В ней подняты и решены весьма важные и актуальные для вирусологии вопросы. Вместе с тем, к сожалению, нельзя было не отметить ряд упущений.

Так, в диссертации, в разделе "Материалы и методы" очень неполно описана методика цитометрического определения Т-клеток памяти центрального и периферического типа, не указаны применявшиеся моноклональные антитела к хемокиновому рецептору CCR7 и антигену

клеток памяти CD45RA и не приведена схема самого исследования. В автореферате, правда, описание метода дается, но с опечаткой в названии антитела. К этой части работы относится еще одно замечание. Автором показано формирование вирусспецифических Т-клеток памяти у людей, привитых живой гриппозной вакциной H5N2, и показана разная динамика центральных и эффекторных клеток памяти. Эти новые и чрезвычайно интересные данные важны, однако автор не уделил должного внимания их обсуждению и объяснению. Роль этих двух типов клеток долговременной памяти в формировании противовирусной защиты практически не пояснена. Учитывая новизну этих данных и практически полную неразработанность вопроса в литературе, хотелось бы получить трактовки и объяснение, каково значение этих двух субпопуляций клеток памяти для адаптивного иммунитета при гриппе.

Присутствуют и другие опечатки. Например, в автореферате, на стр. 7 фермент RDE назван "receptor destroid enzyme" (надо "receptor-destroying enzyme"), на стр. 8 антитело CCR7 обозначено как CDR7. И ряд др.

Следует подчеркнуть, что эти недостатки не являются определяющими и не влияют на высокую общую положительную оценку работы.

### **Заключение**

Диссертация И.В. Лосева «Особенности развития адаптивного иммунного ответа к вирусам гриппа А(H5N1), А(H5N2) и А(H2N2)» (научный руководитель – доктор медицинских наук профессор Анатолий Нойевич Найхин), представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельно выполненным завершенным научным квалификационным исследованием.

В диссертации решена актуальная научно-практическая задача современной вирусологии – проведено изучение особенностей формирования системного гуморального, локального гуморального и Т-клеточного

иммунных ответов к вирусам гриппа А(Н5N1), А(Н5N2) и А(Н2N2) и показано формирование гетеросубтипических перекрестных иммунных реакций против потенциальных пандемических штаммов.

По актуальности, объему выполненных исследований, методическому уровню, научной новизне и практической значимости полученных результатов работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней...» (утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Лосев Игорь Владимирович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – Вирусология.

Официальный оппонент:

руководитель отдела иммунологии

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,

доктор медицинских наук, профессор



Назаров Петр Григорьевич

« 15 » марта 2018 г.

Полное название учреждения: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

Почтовый адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

Телефон: 8(812)234-68-68

Факс: 8(812)234-94-89

E-mail: peter\_nazarov@mail.ru, iem@iemrams.ru

Веб-сайт: <http://iemsppb.ru/>



Подпись *Назарова П.Г.*  
Удостоверяется

Исполн. под. кадров ФГБНУ «ИЭМ»

*О.А. Киселева*