

Отзыв

на автореферат диссертации Костюшева Дмитрия Сергеевича

«РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К РАЗРУШЕНИЮ КОЛЬЦЕВОЙ КОВАЛЕНТНО ЗАМКНУТОЙ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В С ПОМОЩЬЮ НУКЛЕАЗ CRISPR/CAS9»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – «Вирусология».

Инфекция вирусом гепатита В (ВГВ) является серьезной проблемой здравоохранения. Несмотря на наличие эффективной вакцины, около 250 миллионов людей хронически инфицированы и более 1 миллиона в год погибают от последствий хронического гепатита В — цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Современные препараты подавляют транскрипцию вируса, но не способны полностью удалить вирус из организма. В силу этого существует острая необходимость в разработке новых, эффективных методов терапии, которые были бы способны полностью излечить пациентов, удалив из организма кольцевую ковалентно замкнутую ДНК вируса.

Диссертационная работа Костюшева Д.С. посвящена разработке нового эффективного подхода к элиминации кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ с помощью систем CRISPR/Cas9, обладающих активностью сайт-специфических нуклеаз. В работе были проанализированы возможности использования для этого системы CRISPR/Cas9 четырех видов, от *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Neisseria meningitides* и *Francisella novicida*, была проведена оценка их эффективности и безопасности на *in vitro* моделях инфекции.

Результаты диссертационной работы и сформированные на их основе научные выводы базируются на солидном массиве экспериментальных данных, полученных в независимых воспроизводящихся экспериментах. Из опробованных автором систем, CRISPR/Cas9 *Neisseria meningitides* снижала уровни прегеномной РНК ВГВ и S РНК на 70%. При использовании системы *Francisella novicida* противовирусного эффекта не наблюдалось. Классическая система CRISPR/Cas9 *Streptococcus pyogenes* снижала уровень полногеномной РНК ВГВ на 85–93% и S-РНК на 82–92%, однако вносила частые нецелевые мутации.

Исследования показали значительные преимущества системы CRISPR/Cas9 *Streptococcus thermophiles*, в том числе, в сравнении с классической системой *Streptococcus pyogenes*. С помощью CRISPR/Cas9 *Streptococcus thermophiles* удалось добиться эффективного подавления транскрипции и репликации ВГВ в культуре клеток на 99%, при нерегистрируемом внецелевом воздействии на геном. Автором были проведены

эксперименты по влиянию нуклеотидных замен в РНК проводниках на противовирусную эффективность. Было показано, что при наличии однонуклеотидных несовпадений между РНК-проводником и ДНК-мишенью эффективность действия системы CRISPR/Cas9 *Streptococcus thermophilus* не изменяется. Это – очень важный результат, показывающий, что система сохранит эффективность на фоне мутаций, возникающих в геноме ВГВ под действием различных факторов. Мишенью найденных автором РНК-проводников системы CRISPR/Cas9 *Streptococcus thermophilus* являются высококонсервативные участки генома ВГВ, что открывает возможность их использования для элиминации широкого спектра вирусов гепатита В различных генотипов.


Диссертационная работа проведена на высоком методическом уровне и является самостоятельным научным исследованием. В процессе работы был получен и обработан огромный объем экспериментальных данных, что позволило сформулировать достоверные выводы о результатах исследования.

Выводы диссертации полностью соответствуют сформулированной цели и поставленным задачам. Положения, выносимые на защиту, в полной мере отражают содержание работы.

В автореферате описаны все этапы проведенного исследования, что делает его полноценным научно-исследовательским трудом, выполненным на высоком уровне.

Основываясь на данных, изложенных автором в автореферате, можно заключить, что диссертационная работа Костюшева Дмитрия Сергеевича является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи по выявлению и разработке подходов для деградации генома вируса гепатита В. Диссертация полностью соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г. и №748 от 02.08.2016 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а автор заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности 03.02.02. – «Вирусология».

Старший научный сотрудник, к.х.н,
ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН».

 М.Г. Беликова-Исагулянц

Подпись М.Г. Беликовой-Исагулянц удостоверяю.
Ученый секретарь ФГБНУ «ФНЦИРИП
им. М.П. Чумакова РАН» к.б.н.





А.В. Белякова

108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института молекулярной биологии,
Домовладение 8, корпус 1, Мария Георгиевна Беликова-Исагулянц
т. +46 70-4853933 Эл. почта: maria.issaguliantis@vsv.lv

