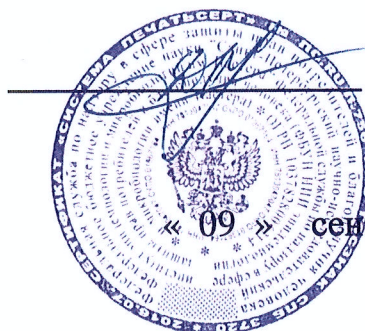


«Утверждаю»

И.о. директора Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, к.м.н.



В.Г. Дедков

« 09 » сентября 2019 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Костюшева Дмитрия Сергеевича «Разработка подходов к разрушению кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В с помощью нуклеаз CRISPR/CAS9», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – Вирусология.

Актуальность темы выполненной работы и её связь с соответствующими отраслями науки и вирусологии.

Проблема хронического гепатита В является одной из самых острых проблем мирового здравоохранения. По последним данным статистического наблюдения, в мире около 2 миллиардов людей контактируют с вирусом гепатита В, при этом более 250 миллионов людей хронически инфицированы и более 1 миллиона человек в год погибает из-за

последствий ХГВ: цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Современные противовирусные средства эффективно подавляют активность вируса в клетках человека, однако не могут полностью элиминировать вирус из организма и, тем самым, не позволяют добиться полного излечения хронического заболевания. Прекращение терапии, как правило, приводит к реактивации вирусной инфекции.

Таким образом, остро стоит необходимость в создании новых, более совершенных, методов и подходов к терапии хронической ВГВ - инфекции.

Хроническая персистенция ВГВ и реактивация инфекции при прекращении терапии связаны в первую очередь с наличием в жизненном цикле вируса особой формы генома – кольцевой ковалентно замкнутой ДНК. Кольцевая ковалентно замкнутая ДНК ВГВ находится в ядре инфицированных клеток на протяжении всей жизни человека, запуская полноценный цикл вирусной инфекции. Она имитирует по структуре геном человека, не распознается внутриклеточными системами противовирусного ответа как чужеродная ДНК и избегает действия иммунного надзора организма.

Системы генетического редактирования CRISPR/Cas9 являются одной из ключевых технологий, созданных для направленного воздействия на целевые, программируемые участки ДНК. Подходы и, в перспективе, лекарства на основе CRISPR/Cas9 могут дать начало новым классам противовирусных средств терапии хронических инфекционных заболеваний. **Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

Научная новизна исследования не вызывает сомнений. В работе Костюшева Д.С. проведено исследование противовирусного действия различных систем CRISPR/Cas9, отличающихся по ряду параметров. Для оценки противовирусного действия был проведен скрининг большого количества РНК-проводников, направляющих белки Cas9 к заданным участкам генома ВГВ. В результате, происходило разрезание генома вируса

системами нуклеаз CRISPR/Cas9, и подавление транскрипции и репликации вируса вплоть до 99%. Большой спектр мишеней, включающий все функционально значимые элементы генома вируса, использование множества уникальных моделей вирусной инфекции и всесторонний анализ противовирусного действия, позволяет с большой достоверностью утверждать, что созданные автором подходы на основе нескольких систем нуклеаз CRISPR/Cas9 могут быть использованы для разрушения кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ, что приведет к полной элиминации вируса.

Автором изучена возможность влияния мутаций устойчивости (несовпадений нуклеотидов между целевой областью ДНК ВГВ и РНК-проводником) на противовирусное действие CRISPR/Cas9, и показано, что одиночные мутации не влияют на разрушение вирусных геномов, тогда как две и более мутации практически полностью блокируют противовирусное действие нуклеаз. Учитывая низкую частоту мутационных изменений в выбранных высоко консервативных регионах генома вируса, можно предположить, что созданные подходы могут эффективно использоваться для элиминации вирусной инфекции у пациентов с практически любым генотипом вируса вне зависимости от наличия одиночных несовпадений нуклеотидов.

Особенно важно, что в диссертационной работе Костюшева Д.С. рассмотрен вопрос о безопасности использования нуклеаз CRISPR/Cas9. За счет сравнения системы CRISPR/Cas9 от организма *Streptococcus pyogenes*, которая может вносить вне целевые разрывы в близкие по последовательностям участки генома человека, с системой CRISPR/Cas9 от организма *Streptococcus thermophilus*, сделан вывод о том, что последняя является высокоточной системой, которая не вносит разрывы ДНК во вне целевые участки и, тем самым, является безопасной для использования у человека.

Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов.

Костюшев Д.С. в своей работе представил исчерпывающий анализ противовирусного действия систем CRISPR/Cas9, направленных ко всем известным функционально значимым регионам ВГВ.

Для решения поставленных автором задач использованы современные вирусологические, биоинформатические, молекулярно-биологические и клеточные методы исследования.

Результаты работы имеют и фундаментальное, и практическое значение, о чем свидетельствуют патенты и публикации Костюшева Д.С. в ведущих мировых изданиях.

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ в ведущих рецензируемых журналах, включенных в перечень Высшей Аттестационной Комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации. По теме диссертации получен один патент и зарегистрирована одна заявка на патент.

Оценка структуры и содержания работы.

Диссертационная работа Костюшева Д.С. оформлена традиционна, изложена на 139 страницах компьютерного набора, состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной описанию материалов и методов исследования, двух глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Работа содержит 28 рисунков, 4 таблицы и 2 приложения. Библиографический указатель содержит 141 источник литературы. Диссертация написана хорошим литературным языком, выполнена на высоком методическом уровне.

В выводах и практических рекомендациях, сделанных автором, отражены основные результаты диссертационного исследования.

Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации, написан четко и оформлен в соответствии с ГОСТ.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Результаты диссертационной работы в дальнейшем могут быть использованы для разработки фармакологических препаратов нового класса, предназначенных для эффективной противовирусной терапии хронического гепатита В, направленной на излечение пациентов.

Замечания к работе – отсутствуют.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Костюшева Дмитрия Сергеевича, на тему «Разработка подходов к разрушению кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В с помощью нуклеаз CRISPR/CAS9», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – Вирусология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена актуальная задача – установлен подход к разрушению кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В с помощью нуклеаз CRISPR/Cas9, имеющие существенное значение для вирусологии.

По своей актуальности, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов, представленная работа соответствует требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительством Российской Федерации от 24 сентября 2013г. №842 с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016г. «О внесении изменений в Положение о присуждении научных степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сам автор заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – Вирусология.

Настоящий отзыв обсужден и одобрен на заседании Отдела эпидемиологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора (Протокол №3 от 06.09.2019 года).

Заведующая лабораторией

вирусных гепатитов
ФБУН НИИ эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера
Роспотребнадзора
доктор медицинских наук профессор
Эсауленко

Елена Владимировна

Подпись Эсауленко Е.В. заверяю:

Начальник отдела кадров
ФБУН НИИ эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера
Роспотребнадзора



Чебакова Лариса Владимировна

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
197101, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14. Телефон: (812) 233-20-92, e-mail: pasteur@pasteurorg.ru