

## 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.

Хроническая инфекция вирусом гепатита В (ВГВ) остается одним из самых распространенных вирусных заболеваний в мире. Ежегодно из-за последствий хронической ВГВ инфекции в мире погибает более 1 миллиона человек. В последние годы появились препараты, способные эффективно блокировать репликацию вируса и снижать риски исходов хронической инфекции (цирроза и рака печени). Тем не менее, прекращение приема препаратов, как правило, связано с возобновлением вирусной инфекции и возвращением клинических симптомов болезни. Разработка методов элиминации ВГВ из организма человека является одним из центральных направлений научных исследований во всем мире. Причиной хронической ВГВ инфекции является персистенция кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК) ВГВ в ядрах инфицированных клеток. Ни один из современных препаратов не может напрямую воздействовать на ккзДНК ВГВ. В диссертационном исследовании Костюшева Дмитрия Сергеевича впервые был использован подход по нуклеолитическому разрезанию и разрушению ккзДНК ВГВ в инфицированных клетках с помощью разнообразных систем нуклеаз CRISPR/Cas9.

Поставленные и выполненные Костюшевым Д.С. задачи исследования в полной мере раскрывают цель диссертационной работы.

Научная новизна работы несомненна: автором впервые на моделях ВГВ изучено противовирусное действие систем CRISPR/Cas9 от четырех видов организмов, обладающих разными свойствами. Созданы РНК-проводники к высококонсервативным регионам генома ВГВ, всесторонне изучены свойства данных РНК-проводников (эффективность действия при использовании соответствующих нуклеаз, число потенциальных внецелевых мишеней в геноме человека, консервативность целевых регионов в геноме ВГВ и др.). В отличие от других исследований, в качестве потенциальной мишени подразумевался не отдельный тестовый штамм, а все возможное многообразие вируса. Методом высокопроизводительного секвенирования проведено сравнение внецелевого действия классической системы нуклеаз CRISPR/Cas9 от организма *Streptococcus pyogenes* и CRISPR/Cas9 от организма *Streptococcus thermophilus*. Изучено важное для функционирования и использования сайт-специфических нуклеаз свойство игнорировать несовпадения нуклеотидов между РНК-проводником и ДНК-мишенью. Показано, что CRISPR/Cas9 от организма *Streptococcus thermophilus* игнорирует единичные несовпадения нуклеотидов и эффективно разрезает подобные матрицы, в то время как два и более несовпадения нуклеотидов практически полностью блокируют действие CRISPR/Cas9. В работе получены как новые фундаментальные знания, в том числе о механизмах действия системы нуклеаз CRISPR/Cas9 на ккзДНК ВГВ, так и практические наработки, которые в перспективе могут быть использованы для разработки методов лечения хронической ВГВ инфекции.

Достоверность диссертационного исследования Костюшева Д.С. обеспечивается значительным объемом наблюдений и хорошей методической базой с применением ряда вирусологических, молекулярно-биологических, клеточных и биоинформатических методов исследований. При обработке полученных данных использованы адекватные методы статистического анализа.

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями Министерства образования и науки Российской Федерации, написан в хорошем научном стиле, текст сопровождается достаточным количеством иллюстративного материала. Выводы вытекают из результатов исследования и соответствуют поставленным задачам.

Недостатком оформления работы является неудовлетворительная адаптация иллюстраций к формату автореферата, неразборчивые подписи и обозначения на ряде иллюстраций (особенно Рис. 6, 8). Указанные недостатки не умаляют научной значимости работы и не влияют на ее общую оценку.

По теме диссертации опубликованы пять статей в журналах, рекомендованных ВАК, в том числе одна – в зарубежной печати. Получен один патент на изобретение. Результаты работы были представлены на 11 международных конференциях, что подтверждает ее значимость.

Ознакомление с авторефератом позволяет сделать заключение, что диссертационная работа Костюшева Д.С. «РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К РАЗРУШЕНИЮ КОЛЬЦЕВОЙ КОВАЛЕНТНО ЗАМКНУТОЙ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В С ПОМОЩЬЮ НУКЛЕАЗ CRISPR/CAS9», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой. По актуальности темы, методическому уровню, новизне полученных данных, их практической значимости, данная диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Костюшев Дмитрий Сергеевич, заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности 03.02.02 – вирусология.

Доктор медицинских наук, профессор РАН  
Директор Института медицинской паразитологии,  
тропических и трансмиссивных заболеваний  
им. Е.И. Марциновского Первого МГМУ  
им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет)  
Минздрава России



Лукашев А.Н.

**ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ**  
Ученый секретарь *Л.Воск.* С.Н. Воскресенская  
«11» сентября 2019 г.

119435, г. Москва,  
Малая Пироговская ул. дом 20, стр. 1  
Лукашев Александр Николаевич. Тел. +7(499) 245-35-78; сот. +7(915) 160-74-89  
Эл. почта alexander\_lukashov@yandex.ru