

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации

РЕГУЗОВОЙ АЛЕНА ЮРЬЕВНЫ

**«Исследование специфической активности полиэпитопных
Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов, полученных с использованием
различных стратегий проектирования», представленной на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.03 - молекулярная биология**

Одним из наиболее эффективных методов борьбы с инфекционными заболеваниями человека и животных является программирование специфических иммунологических механизмов на защиту организма от возбудителей тех или иных инфекций. В последние годы как в России, так и во всем мире вызывает особую тревогу сложившаяся сложная ситуация с социально значимыми инфекционными заболеваниями, среди которых ВИЧ-инфекции представляют одну из важнейших проблем мировой медицины. Необходимо подчеркнуть, что с начала 90-х годов 20-го столетия в мире в связи с распространением ВИЧ-инфекции отмечается неуклонный рост летальных исходов среди заболевших туберкулезом и гепатитом. Таким образом, разработка вакцин нового поколения является ключевым звеном в глобальной программе, проводимой ВОЗ по борьбе с заболеваниями, вызванными ВИЧ-инфекциями. В связи с этим, проблема создания средств профилактики и защиты от ВИЧ-инфекций, в частности, создание полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов и исследование их специфической активности представляется чрезвычайно важной задачей, необходимость решения которой подчеркивается ее высокой социальной значимостью. Актуальность данного направления исследований не вызывает сомнения как в теоретическом, так и практическом плане.

Во все времена борьба с инфекционными болезнями была основана на принципах стимуляции иммунных механизмов путем прямого введения в организм ослабленных инфекционных агентов или их частей. Однако совершенствование методов молекулярной биологии и генной инженерии позволило найти новые современные подходы в разработке и создании современных вакцин нового поколения, с повышенными требованиями к чистоте и их безвредности.

В основу диссертационной работы А.Ю. Регузовой положено использование различных стратегий проектирования искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов с учетом накопленных к

настоящему моменту времени представлений о молекулярных механизмах формирования иммунных ответов и нацелено на исследование специфической активности созданных иммуногенов.

Диссертационная работа хорошо структурирована, состоит из трех частей, посвященных обзору литературы по данной области исследований, описанию материалов и методов, а также полученным экспериментальным результатам и их обсуждению. Первую часть диссертационной работы предваряет «Введение», в котором диссертантом четко обозначены актуальность и социальная значимость выбранного направления исследований, определена цель и сформулированы задачи, подчеркнуты научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Результаты диссертационной работы достаточно полно и четко отражены в выводах. В заключении диссертантом проанализированы различные стратегии создания вакцин нового поколения и возможности их использования против таких высоко вариабельных вирусов как ВИЧ-1. Диссертационная работа написана хорошим языком, прекрасно иллюстрирована и обсуждена на основании анализа работ других исследователей. Список цитируемой литературы составляет 310 источников, основная часть которых (304) является научными публикациями, а также включает адреса баз данных, представленных в Интернете.

Первая часть диссертации посвящена обзору литературы и включает анализ современного состояния исследований в области разработки и создания вакцин против ВИЧ-1. В хронологическом порядке рассмотрен мировой опыт по развитию подходов формирования устойчивости к вирусным инфекциям в организме теплокровных и разработке вакцины против ВИЧ. Сильной стороной этого раздела диссертационной работы является удачно выбранный подход изложения огромного числа работ в данном направлении исследований. На основании сравнительного анализа механизмов формирования иммунитета в ответ на инфекцию, диссертантом прослеживаются три этапа в развитии работ по созданию вакцины против ВИЧ, связанные с формированием гуморального и Т-клеточного иммунных ответов. Большое внимание в этом разделе диссертационной работы уделяется критическому анализу современных методов и подходов для исследования Т-клеточного иммунного ответа. Общая схема, положенная в основу этой части диссертационной работы – скрупулезный анализ достижений современной молекулярной биологии, которые послужили бы обоснованием к разработке новых подходов создания вакцин нового поколения.

Вторая часть рецензируемой работы посвящена описанию объектов и методов, используемых при выполнении экспериментов. Для решения поставленных задач автором использованы современные биологические методы, среди которых необходимо отметить такие, как методы генетического конструирования рекомбинантных ДНК, методы выделения и анализа рекомбинантных белков, современные методы исследования ВИЧ-специфического иммунного ответа, индуцированного вакцинацией. Следует подчеркнуть, что в работе использована методика оценки Т-клеточного иммунного ответа с применением для этих целей пептид-МНС-пентамеров, впервые адаптированная диссертантом для этих целей в России. Применение такого широкого и внушительного арсенала современных биологических методов подчеркивает высокий уровень экспериментальных работ, выполненных диссертантом. Все методы, использованные в работе, адекватны согласно поставленным в работе задачам.

На защиту диссертантом вынесено четыре основных положения, которые убедительно подтверждены экспериментальными результатами, представленными в третьей части диссертационной работы. Общая схема, положенная диссертантом в основу этой части работы, включает выбор, дизайн и проектирование трех искусственных ВИЧ-1 полиэпитопных Т-клеточных иммуногена, создание и наработку на их основе рекомбинантных плазмид, используемых в дальнейшем для оценки их иммуногенности, как на лабораторных животных, так и у добровольцев, иммунизированных вакциной «КомбиВичвак».

В основу дизайна целевых иммуногенов положены накопленные к моменту начала исследований знания о формировании Т-клеточного иммунитета в ответ на консервативные эпитопы ВИЧ-1, рестриктированные наиболее распространенными молекулами HLA I класса. С учетом этих знаний были спроектированы три целевых Т-клеточных иммуногена, один из которых был представлен «коровым» искусственным белком, включающим 50 CD8+ ЦТЛ- и 5 CD4+ Тх-эпитопов, а два других были дополнены последовательностями, нацеливающими «коровый» белок либо на лизосому для усиления ответа Т-хелперов, либо на протеасому для усиления ответа ЦТЛ. С использованием прокариотической (*E.coli*) и эукариотической (293Т-клетки) экспрессионных систем исследованы особенности экспрессии созданных целевых иммуногенов. Диссертантом экспериментально продемонстрирована представленность экспрессируемых целевых иммуногенов в виде фракций белковых фрагментов различной молекулярной массы, что подтверждало правильность и корректность их дизайна, предусматривающего процессинг пептидных фрагментов. Таким образом,

созданные диссертантом ДНК-вакцинные конструкции, включающие полиэпитопные ВИЧ-1-иммуногены, обеспечивали их экспрессию и, как показано в экспериментах на животных (мыши), вызывали статистически значимые ответы ВИЧ-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих синтез IFN-гамма и IL2. На основании сравнительного анализа трех исследуемых иммуногенов диссертантом установлено, что введение в структуру дополнительных последовательностей приводило к усилению иммуногенности полиэпитопных ДНК-конструкций. Одной из сильных сторон оппонируемой диссертационной работы является блестящее применение диссертантом различных современных методов для оценки параметров иммуногенности исследуемых ДНК-вакцинных конструкций и вакцины «КомбиВИЧвак», позволяющих выявлять и исследовать CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки человека. Следует особо подчеркнуть, что используемый для этих целей метод с применением пептид-МНС-мультимерных комплексов, применен в России впервые. Однако у оппонента возник вопрос, почему при наличии такого разнообразия имеющихся в распоряжении методов диссертантом для оценки иммунного ответа у лабораторных животных на полиэпитопные конструкции использовался только один метод внутриклеточного окрашивания цитокинов, и не использовался, например, метод ELISPot.

Представленные в работе результаты обладают высокой степенью научной новизны, выводы соответствуют поставленным задачам и согласуются с полученными результатами. Полученные при выполнении работы данные представляют интерес для специалистов, работающих в области иммунологии и вакцинологии, генной инженерии, генетиков, молекулярных биологов и могут быть использованы в учреждениях РАН и РАМН, на кафедрах генетики и молекулярной биологии университетов. Результаты исследований, полученных при выполнении диссертационной работы, несомненно, найдут применение при чтении различных курсов лекций в различных учреждениях учебного профиля. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Актуальность, научная новизна и практическая значимость выполненной диссертационной работы подтверждается списком научных публикаций автора, две работы из которого опубликованы в солидных зарубежных журналах с высоким импакт-фактором, а также представлением на научных конференциях, как российского, так и зарубежного уровней.

В целом диссертационная работа Регузовой Алены Юрьевны «Исследование специфической активности полиэпитопных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов, полученных с использованием различных стратегий

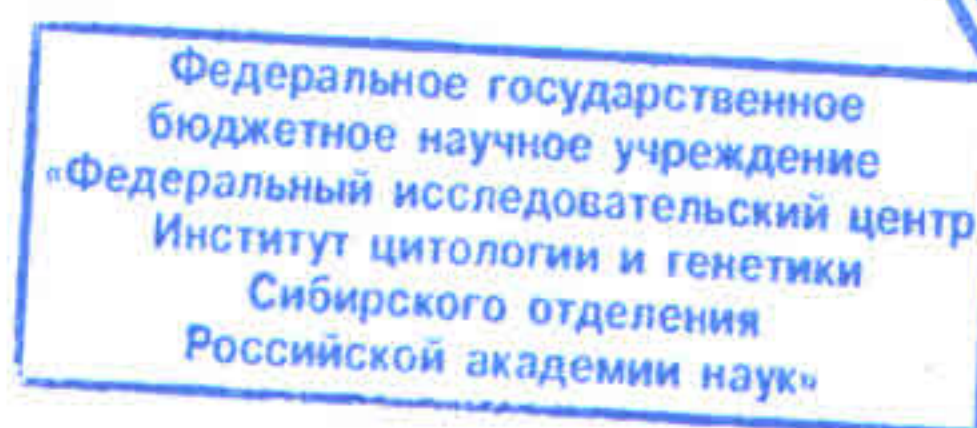
проектирования», является самостоятельным завершенным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне и вносящим существенный вклад в развитие стратегий повышения иммуногенности ДНК-вакцин против ВИЧ-инфекций. По объему выполненных исследований, актуальности полученных результатов представленная диссертационная работа полностью соответствует требованиям ВАК о порядке присуждения научных степеней, а ее автор Алена Юрьевна Регузова несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03-01-03 – молекулярная биология.


Зав. лабораторией биоинженерии растений
Федерального государственного бюджетного
Научного учреждения «Федеральный исследовательский
Центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»
доктор биологических наук, профессор
Елена Викторовна Дейнеко



19 мая 2015 года.

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Федеральный исследовательский
Центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»
проспект акад. Лаврентьева, 10
Новосибирск-90, 630090, (383)363-49-63*3204
deineko@bionet.nsc.ru



Личная подпись _____
Заверяю.
и.о. Нач. отдела кадров: 
Скалкова С. Н.
19.05.2015 г.