

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию

Рудометовой Надежды Борисовны

«Конструирование псевдовирuses рекомбинантной формы CRF63_02A и подтипа А6 ВИЧ-1 и их использование для поиска ингибиторов проникновения вируса в клетку-мишень»,

представленную к защите в диссертационный совет 61.1.001.01

на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 1.5.3 - молекулярная биология

Актуальность темы диссертационной работы

Несмотря на все успехи современной медицины, ВИЧ-инфекция является одной из наиболее актуальных проблем здравоохранения в России и мире. В масштабе планеты в целом эпидемическая ситуация с ВИЧ стабилизируется, однако в последнее время Россия заняла третье место в мире по числу новых случаев заражения ВИЧ. Данное исследование посвящено молекулярно-эпидемиологическому изучению распространения ВИЧ-1 в сибирском регионе, конструированию env-псевдовирuses на основе изолятов ВИЧ-1, циркулирующих на территории Российской Федерации, в частности Сибирском федеральном округе, и их использованию для поиска ингибиторов проникновения вируса в клетку-мишень. В настоящее время в работах, связанных с оценкой иммунного ответа против ВИЧ-1, возникающего в ответ на вакцинные конструкции и скринингом потенциальных химиотерапевтических агентов, наилучшим образом себя зарекомендовала технология env-псевдовирuses. Однако доступные в настоящее время в мире псевдовирuses не являются репрезентативными для распространенных в РФ подтипов и рекомбинантных форм.

Актуальность данной работы не вызывает сомнений, так как несмотря на значительный прогресс в борьбе с ВИЧ не существует терапии, позволяющей провести полное излечение от этого заболевания. Задача создания новых эффективных

противовирусных препаратов, направленных против ВИЧ-инфекции, остается на повестке дня.

Научная новизна исследования и полученных результатов

В представленной работе исследовано генетическое разнообразие вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в регионах Сибирского федерального округа. Показано, что в Новосибирской и Кемеровской областях, Алтайском крае и Республике Хакасия продолжает доминировать рекомбинантная форма CRF63_02A. Впервые показано, что в Республике Алтай более 50% изученных циркулирующих штаммов ВИЧ-1 принадлежат к подтипу A6, на долю рекомбинантной формы CRF63_02A приходится менее 30%.

Авторами на современном методическом уровне изучены мутации устойчивости к антиретровирусным препаратам в геноме вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в регионах Сибирского федерального округа. Установлено, что в области протеазы большинство исследованных образцов содержат полиморфные мутации K20I, L10I/V и V11I. В сегменте обратной транскриптазы выявлены мутации резистентности к нуклеозидным (M41L и K65R) и не-нуклеозидным (K103N) ингибиторам обратной транскриптазы.

Получено и охарактеризовано 13 псевдовирuses на основе изолятов ВИЧ-1, циркулирующих на территории Российской Федерации.

Показано, что наиболее высоким ингибирующим потенциалом в отношении псевдовирuses ВИЧ-1 обладают триникотинаты глицирризиновой кислоты, что дает возможность рассматривать данный препарат в качестве перспективного фармакологически активного соединения для дальнейших исследований.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Фундаментальная значимость полученных Н.Б. Рудометовой результатов заключается в молекулярно-эпидемиологической характеристизации распространения ВИЧ-инфекции в Сибири и создании технологии скрининга производных терпеноидов с использованием env-псевдовирuses ВИЧ-1.

Практическая значимость результатов, представленных в данной диссертационной работе, не вызывает сомнений. В результате проделанной работы получено 13 *env*-псевдовирусов, которые относятся к рекомбинантной форме CRF63_02A и подтипу А6 ВИЧ-1 и являются CCR5-тропными. Полученные *env*-псевдовирусы были использованы для скрининга библиотеки соединений с целью поиска таких веществ, которые были бы способны ингибировать слияние ВИЧ с клетками и предотвращать проникновение вируса. Было выявлено 10 соединений, способных блокировать проникновение псевдовирусов.

Общая характеристика диссертационной работы

Текст диссертации Н.Б. Рудометовой изложен на 127 страницах, включая список использованной литературы и Приложение 1.

Диссертация написана в традиционном стиле и включает следующие разделы: «Введение», «Способы борьбы с ВИЧ-инфекцией и методы оценки эффективности вакцин и лекарственных препаратов против ВИЧ-1 *in vitro*», в котором приведен обзор литературы, «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», список использованной литературы, который содержит 248 публикации отечественных (20 источников) и зарубежных авторов (228 источников). Список использованной литературы оформлен согласно требованиям ГОСТ. Диссертация иллюстрирована 26 рисунками и 10 таблицами.

В начале «Введения» приводится обоснование актуальности, степень разработанности темы диссертации и ставится цель исследования. Далее автор выделил раздел «Задачи исследования», «Научная новизна и практическая ценность работы», «Положения, выносимые на защиту», «Степень достоверности и апробация результатов», «Личный вклад автора в диссертационную работу» и «Структура и объем работы». Все разделы написаны корректно и соответствуют тому, что изложено в основных главах диссертации.

Глава «Способы борьбы с ВИЧ-инфекцией и методы оценки эффективности вакцин и лекарственных препаратов против ВИЧ-1 *in vitro*», которая является обзором литературы, написана грамотно и соответствует тематике данной работы: она включает 7 разделов и посвящена обзору современного состояния лечения ВИЧ-

инфекции и методам оценки эффективности вакцин и лекарственных препаратов против ВИЧ-1 *in vitro*. Большое внимание уделено вопросам, касающимся использованию репликационно-компетентных изолятов вируса и псевдовиральной системы для анализа нейтрализации и оценки эффективности вакцинных и химиотерапевтических препаратов против ВИЧ *in vitro*.

Дополнительно представлен обзор публикаций, описывающих морфологию и жизненный цикл ВИЧ-1, а также методы борьбы с ВИЧ-инфекцией, применяемые в настоящее время, а именно антиретровирусную терапию, вакцины и антитела.

В конце этого раздела имеется «Заключение».

Раздел «Материалы и методы» полно представляет использованные методики и свидетельствует о большом объеме проделанной автором работы.

Раздел «Результаты и их обсуждение» имеет 3 подраздела, в которых представлен результат конструирования env-псевдовирусов на основе Западно-Сибирских изолятов ВИЧ-1 и их использование для поиска соединений, способных блокировать проникновение ВИЧ-1 в клетку-мишень. В главе «Результаты и их обсуждение» соискатель приводит достаточно подробный анализ полученных результатов исследования.

В главе «Заключение» суммированы все полученные автором результаты. Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам, они закономерно вытекают из полученных результатов, четко сформулированы и полностью обоснованы.

Автореферат адекватно отражает основные результаты диссертационной работы. По теме диссертации опубликованы 4 научные статьи, из них 2 – в отечественных журналах из списка ВАК и 2 – в зарубежных изданиях. Результаты работы неоднократно представлялись на российских и международных конференциях, что отражено в 10 тезисах материалов конференций.

В целом, диссертация написана ясно и логично, содержит все необходимые рисунки и таблицы, иллюстрирующие полученные результаты.

Замечания к диссертационной работе

Замечания к данной работе незначительны и имеют технический или дискуссионный характер.

1. В оглавлении имеются ошибки в главе «Результаты и их обсуждение».
2. В разделе «Результаты и их обсуждение» автор исследует генетическое разнообразие вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в регионах Сибирского федерального округа. Автор на основе 59 последовательностей гена *pol* установил, что: в Новосибирской, Кемеровской областях, Алтайском крае и Республике Хакасия продолжает доминировать рекомбинантная форма CRF63_02A, тогда как на территории Республики Алтай более 50% изученных циркулирующих штаммов ВИЧ-1 принадлежат к подтипу А6. К сожалению, нигде не говорится о том, проводилась ли молекулярно-эпидемиологическая характеристика распространения ВИЧ-инфекции в Сибири и России ранее или авторы впервые изучили геноварианты ВИЧ в России. Полученные автором результаты не сравниваются с ранее опубликованными данными по размеру выборки по распространенностям генотипов ВИЧ-1 и т.д.
3. В подписи к рисунку 15 (в автореферате №3) указано: по вертикальной оси отмечен процент кластеризации с кладами ВИЧ-1, использованными в анализе. Однако на вертикальной оси приведены значения индекса статистической поддержки перестановочного анализа (bootstrap).
4. Рисунок 20 (в автореферате №8) трудно читаем и не ясно, что означают выделения цветом различных линий.
5. В таблице 4 нужно пояснить, что значит «уровень люминесценции над клетками».
6. В качестве замечаний можно отметить наличие небольшого количества грамматических ошибок и опечаток. Автор в тексте использует как полные слова, так и их сокращения, иногда в одном предложении. Сокращение ОТ не расшифровано. Имеются ошибки оформления и в списке литературы.

Однако приведенные замечания не умаляют высокую значимость полученных результатов.

Достоверность полученных результатов, степень обоснованности научных положений и выводов диссертационной работы

Достоверность полученных результатов определяется экспериментальными данными по изучению соединений, способных блокировать проникновение псевдовирусов. Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современного сертифицированного оборудования и современных методов исследования.

Научные положения, выводы и заключение, сформулированные в диссертации, обоснованы проведёнными исследованиями, методическими подходами, использованием современных методов исследования. Основные положения, выносимые на защиту, и выводы логично вытекают из полученных результатов. Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Рудометовой Надежды Борисовны «Конструирование псевдовирусов рекомбинантной формы CRF63_02A и подтипа Δ6 ВИЧ-1 и их использование для поиска ингибиторов проникновения вируса в клетку-мишень», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - молекулярная биология, является завершённой квалификационной научно-исследовательской работой, в которой были получены псевдовирусы ВИЧ-1 на основе изолятов, циркулирующих на территории Сибирского федерального округа, и использованы для скрининга соединений, способных блокировать проникновение ВИЧ-1 в клетку-мишень.

Актуальность поставленных и решенных в ходе диссертационной работы задач, большой объем и качество проведенных научных исследований, новизна и высокая научно-практическая значимость полученных результатов, обоснованность приводимых выводов позволяют заключить, что представленная диссертационная работа полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, перечисленным в п. 9

"Положения о присуждении ученых степеней" от 24.09.2013 №842 с изменениями от 21.04.2016 №335, а ее автор, Рудометова Надежда Борисовна, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.3 - молекулярная биология.

В.н.с лаборатории молекулярной микробиологии
ФГБУН ИХБФМ СО РАН,
e-mail: babkin@niboch.nsc.ru
Тел. +7 (383)363-51-57
к.б.н. Игорь Викторович Бабкин

И.В. Бабкин

Подпись И. В. Бабкина заверяю
Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН к.х.н.



П.Е. Пестряков

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН),
Новосибирск, 630090, пр-т академика Лаврентьева, д.8.
Тел. +7(383)363-51-50; e-mail: niboch@niboch.nsc.ru; www.niboch.nsc.ru