

## ОТЗЫВ

**официального оппонента о диссертационной работе Баюровой Екатерины Олеговны «Экспериментальная модель для функциональной оценки иммунного ответа на кандидатные ДНК-вакцины против ВИЧ-1», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. – «Вирусология»**

### **Актуальность темы диссертации**

Тема диссертационной работы Баюровой Екатерины Олеговны является чрезвычайно актуальной. ВИЧ остаётся одной из основных проблем глобального общественного здравоохранения. По данным ВОЗ на сегодняшний день этот вирус унёс 40,4 миллиона человеческих жизней. Распространение инфекции продолжается во всем мире; при этом в ряде стран, в том числе и в России, отмечаются тенденции роста числа новых случаев инфицирования. По состоянию на конец 2022 г. в мире насчитывалось 39,0 миллиона человек, живущих с ВИЧ-инфекцией; от причин, связанных с ВИЧ-инфекцией, умерло 630 000 человек, и было зарегистрировано 1,3 миллиона новых случаев заражения ВИЧ.

Несмотря на достигнутые успехи антиретровирусной терапии, до сих пор не удаётся остановить распространение ВИЧ. Одна из главных причин связана с тем, что распространение препаратов для лечения ВИЧ-инфекции сопровождается формированием устойчивости вируса, масштабы которой в последние годы неуклонно растут. Устойчивость ВИЧ к лекарственным препаратам вызвана изменениями в его геноме, влияющими на способность препаратов блокировать репликацию вируса. Риск частичной или полной утраты активности лекарственного препарата в результате появления разновидности устойчивого к ним вируса, — проблема, касающаяся всех антиретровирусных препаратов.

Автор диссертации предлагает оригинальный подход к борьбе с лекарственной устойчивостью ВИЧ-1, а именно, путём конструирования терапевтических ДНК-вакцин, обеспечивающих формирование иммунного ответа против ВИЧ-1 с мутациями лекарственной устойчивости. В своей диссертации Баюрова Екатерина Олеговна приводит данные об иммуногенности экспериментальных ДНК-вакцин, кодирующих гены вирусной интегразы, обратной транскриптазы и протеазы, несущих мутации лекарственной устойчивости.

Важной проблемой, сдерживающей разработку как профилактических, так и терапевтических вакцин против ВИЧ-1, является отсутствие удобной и адекватной экспериментальной модели данной инфекции на животных. Использование обезьян или гуманизированных мышей для оценки

протективности разрабатываемых вакцины достаточно дорого и требует условий работы уровня BSL2. В диссертации предложена изящная экспериментальная модель проверки протективности ВИЧ-вакцин, основанная на использовании клонов клеток аденокарциномы молочной железы мышей, экспрессирующих гены белков вариантов RT, IN и PR ВИЧ-1 с целью использования их в качестве имитатора заражения ВИЧ-1-инфицированными клетками.

### **Краткая характеристика основного содержания диссертации**

Диссертационная работа написана по традиционной схеме и состоит из введения и 4-х глав основной части диссертации, включающих обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, а также заключение, выводы, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений. Работа изложена на 148 страницах, иллюстрирована 13 таблицами и 32 рисунками. Список литературы содержит 286 источников.

В разделе «Введение» в краткой форме изложены актуальность работы, цель и задачи исследования, научная новизна полученных результатов и их практическая значимость, положения, выносимые на защиту и информация о публикации и апробации результатов.

Глава «Обзор литературы» посвящена описанию строения вируса иммунодефицита, характеристикам его ферментов (обратной транскриптазы, интегразы и протеазы), антиретровирусной терапии и проблеме возникновения лекарственной устойчивости. Рассматриваются различные направления разработки вакцин против ВИЧ-1. Особое внимание уделено характеристике моделей для тестирования вакцин, а также принципам конструирования моделей с использованием мышинных клеточных линий.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание реагентов и методов, использованных автором в работе. Приведено описание большого количества современных методик, что свидетельствует о высокой квалификации экспериментатора.

Глава «Результаты» включает в себя следующие работы:

- дизайн ДНК-вакцин и лентивирусных векторов, кодирующих гены белков вариантов RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU\_A и их вариантов с мутациями лекарственной устойчивости;
- создание производных линии клеток аденокарциномы мышей 4T1luc2, кодирующих варианты генов RT, IN и PR ВИЧ-1;
- подбор дозы имплантируемых клеток линии 4T1luc2 и ее субклонов, а также оценка их туморогенного потенциала;
- оценка эффективности ДНК-вакцин методом «челленджа».

Анализ и обобщение полученных результатов приведены в главах «Обсуждение» и «Заключение».

### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Достоверность полученных результатов, обоснованность научных положений и практических рекомендаций, сформулированных автором диссертации, определяется большим объёмом проведённых исследований с применением современных молекулярно-биологических, вирусологических и иммунологических методов исследования.

Проведена статистическая оценка всех полученных результатов, приведена их статистическая значимость. Все выводы диссертации логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и задачам работы

### **Научная новизна выполненной работы**

Бауровой Е.О. создана оригинальная модель для тестирования вакцин против ВИЧ-1 в лабораторных мышах, основанная на имплантации сингенных опухолевых клеток, экспрессирующих варианты RT, IN и PR, в том числе с мутациями лекарственной устойчивости. Модель основана на использовании производных высоко туморогенных, спонтанно метастазирующих клеточных линий 4T1Luc2, экспрессирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 штамма FSU\_A, включая мутации лекарственной устойчивости.

Автором продемонстрирована адекватность созданной модели для оценки эффективности ДНК-вакцин, кодирующих гены лекарственно устойчивых вариантов RT, IN и PR ВИЧ-1.

Продемонстрирована возможность использования *ex vivo* биолюминесцентного сигнала для оценки миграции опухолевых клеток в дистальные органы, а также применимость параметра миграции опухолевых клеток при оценке эффективности индуцированного иммунного ответа. Показано, что в экспериментах с имплантацией опухолевых клеток иммунизированным мышам индуцированный иммунный ответ обладает разной степенью протективности, несмотря на высокую иммуногенность плазмидных конструкторов при ДНК-иммунизации.

### **Практическая значимость работы**

Линии опухолевых клеток, экспрессирующие антигены ВИЧ-1, аналогичные использованным в этом исследовании, могут служить мощным инструментом для проверки эффективности потенциальных терапевтических вакцин против ВИЧ, компенсируя отсутствие легкодоступных моделей

заражения ВИЧ-1, работающих на мышах. Это позволит значительно ускорить проверку разрабатываемых кандидатных вакцин против ВИЧ-1 и снизить стоимость их разработки.

Полученные данные по иммуногенности ДНК-вакцин, кодирующих варианты генов RT, IN и PR ВИЧ-1, дают надежду на возможность создания терапевтических вакцин против лекарственно-устойчивого ВИЧ-1, что может препятствовать появлению и распространению таких вариантов ВИЧ-1 и продлить успешное антиретровирусное лечение.

### **Замечания по диссертационной работе**

Не смотря на то, что диссертационная работа Бауровой Екатерины Олеговны выполнена на высоком научном уровне и в ней представлены весомые и значимые результаты, следует отметить ряд замечаний и вопросов, возникших у оппонента при прочтении диссертации.

- 1) В диссертации недостаточно чётко обоснована стратегия выбора пептидов, которые использовались в ELISpot для стимуляции спленоцитов иммунизированных животных при оценке клеточного ответа. Нет описания к таблице 3, в которой приведены последовательности этих пептидов.
- 2) Чем можно объяснить тот факт, что количество цитокин-продуцирующих клеток в ELISpot отличается в группах мышей, иммунизированных PR\_Ai, PR\_Ai2mut, PR\_Ai3mut, в случае стимуляции пептидом, который соответствует консервативному району в а.к. последовательностях этих белков (например, пептидом A1-15)?
- 3) Из текста диссертации, не понятно, через какой временной интервал после иммунизации животных ДНК-вакцинами проводили "челлендж" (введение опухолевых клеток).
- 4) Насколько могут быть опасны для клеток млекопитающих ДНК-вакцины, кодирующие гены обратной транскриптазы, протеазы и интегразы ВИЧ-1? Достаточно ли одной мутации, чтобы полностью ингибировать активность интегразы, обратной транскриптазы и протеазы? Какова вероятность реверсии к активному варианту фермента?
- 5) У ряда рисунков подписи очень лаконичные, не всегда информативные.
- 6) По тексту диссертации встречаются опечатки и неудачно используемые выражения, например "ДНК-иммунизированные", которое, вероятно, появилось при неточном переводе с английского языка. Например, стр. 84: - "Рисунок 20. Продукция цитокинов интерферона гамма (ИФН- $\gamma$ ) и интерлейкина 2 (ИЛ-2) спленоцитами мышей, ДНК-иммунизированных плазмидами, кодирующими ...." стр. 5: -"раздел 3.9 Имплантация 4T1luc2 субклонов экспрессирующих гены ферментов ВИЧ-1 мышам, ДНК-иммунизированным соответствующими ферментами".

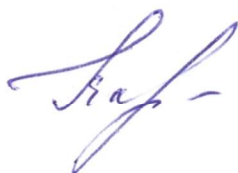
Вместе с тем, указанные замечания не умаляют высокой значимости диссертационного исследования.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Баюровой Екатерины Олеговны на тему: «Экспериментальная модель для функциональной оценки иммунного ответа на кандидатные ДНК-вакцины против ВИЧ-1» представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук является законченной научно-квалификационной работой по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведённых исследований полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в пп. 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в ред. Постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г.; №1024 от 28.08.2017 г.; №1168 от 01.01.2018 г.; № 426 от 20.03.2021 г.; с изменениями в действующей ред. от 18.03.2023 г.), а ее автор, Баюрова Екатерина Олеговна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. – «Вирусология».

### **Официальный оппонент:**

доктор биологических наук, доцент,  
ведущий научный сотрудник отдела биоинженерии  
ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора  
эл. почта [karpenko@vector.nsc.ru](mailto:karpenko@vector.nsc.ru),  
телефон: +7 (383) 363-47-10



Карпенко Лариса Ивановна

Подпись д.б.н. Карпенко Л.И. заверяю.

Начальник отдела кадров  
ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора

И.В. Ильин

«10» октября 2023 г.



Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, <http://www.vector.nsc.ru>  
Адрес: 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово.