

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

ведущего научного сотрудника кафедры вирусологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» кандидата биологических наук Евтушенко Екатерины Алексеевны на диссертационную работу Баюровой Екатерины Олеговны «Экспериментальная модель для функциональной оценки иммунного ответа на кандидатные ДНК-вакцины против ВИЧ-1», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. – «Вирусология»

### **Актуальность темы диссертационного исследования.**

Работа Екатерины Олеговны Баюровой посвящена разработке экспериментальной модели для функциональной оценки иммунного ответа на кандидатные ДНК-вакцины против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) типа 1. ВИЧ остается серьезной глобальной проблемой общественного здравоохранения: на сегодняшний день он унес жизни более 40 млн человек и продолжает распространяться по всем странам мира. При этом некоторые страны сообщают о тенденциях к увеличению числа новых случаев инфицирования. На настоящий момент не существует методов полного излечения от ВИЧ. Антитретровирусная терапия (АРТ) позволяет контролировать вирусную нагрузку в организме ВИЧ-инфицированных, продлевая и улучшая их качество жизни. Однако применение АРТ провоцирует появление мутаций лекарственной устойчивости (ЛУ), что является причиной снижения эффективности препаратов первой линии терапии и, как следствия, увеличения стоимости лечения. В связи с тем, что большинство препаратов АРТ направлены на подавление активности таких ферментов ВИЧ, как обратная транскриптаза (RT), интегразы (IN) и протеазы (PR), то и мутации ЛУ часто связаны с изменениями в этих белках. Терапевтические вакцины нацеленные на RT, IN и PR могут стать перспективным дополнением к АРТ и повысить ее эффективность. Разработка, как профилактических, так и терапевтических вакцин против

ВИЧ затруднена в связи с ограничениями в выборе адекватных животных моделей для тестирования эффективности иммунного ответа на вакцинные кандидаты. Таким образом, тема диссертационной работы Баюровой Е.О. является крайне актуальной.

#### **Новизна полученных результатов и выводов.**

В ходе диссертационной работы Баюровой Е.О. была разработана оригинальная экспериментальная модель на основе линии клеток аденокарциномы мышей 4T1Luc2 для изучения эффективности кандидатных ДНК-вакцин против ВИЧ-1. Впервые получены субклоны клеточной линии 4T1Luc2, экспрессирующие варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 штамма FSU\_A, в том числе с мутациями ЛУ. Впервые проведен анализ эффективности кандидатных ДНК-вакцин против лекарственно устойчивых вариантов RT, IN и PR ВИЧ-1 путем имплантации иммунизированным мышам субклонов клеточной линии 4кT1Luc2, экспрессирующих соответствующие варианты вирусных белков. Впервые показана возможность использования результатов оценки биолюминесцентного сигнала *ex vivo* для изучения миграции опухолевых клеток в дистальные органы, в том числе при анализе эффективности кандидатных вакцин. Данные, полученные при оценке иммуногенности ДНК-конструктов и при “челлендже” представляются особенно интересными. Выводы, сформулированные по результатам диссертационной работы, обладают несомненной новизной.

#### **Оценка практической значимости диссертационной работы.**

Практическая значимость диссертационной работы Баюровой Е.О. не вызывает сомнения. Разработанные в работе подходы могут быть использованы для создания моделей на основе сингенных клеточных линий мышей, позволяющие оценивать эффективность иммунного ответа к вирусам, вызывающим хроническую инфекцию у человека, но не инфицирующих лабораторных мышей.

### **Степень достоверности представленных результатов.**

Диссертационное исследование выполнено на современном экспериментальном уровне. Достоверность полученных результатов определяется большим объемом полученных данных, наличием повторов, применением современных надежных методов исследования. Выводы диссертации сформулированы в соответствии с полученными результатами и согласуются с поставленными при проведении исследования задачами. Результаты диссертационной работы Баюровой Е.О. представлены в статьях, опубликованных в рецензируемых международных журналах. Материалы диссертации были представлены на различных международных научных конференциях.

### **Структура диссертационной работы.**

Диссертационная работа построена по классической схеме и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, перспективы дальнейшей разработки темы, список использованных сокращений и список использованной литературы. Работа изложена на 148 страницах, иллюстрирована 32 рисунками и 13 таблицами. Список литературы включает 286 источников.

В главе «Введение» автором подробно обоснована актуальность работы, цель и задачи проводимого исследования, научная новизна и значимость полученных результатов.

Обзор литературы состоит из 7 разделов. Первый раздел обзора литературы освящает таксономическое положение ВИЧ, распространение, структуру вириона и генома, а также дает представление об основных вирусных белках. Во втором и третьем разделе обсуждаются антиретровирусная терапия и мутации лекарственной устойчивости. В четвертом разделе описана проблема разработки эффективных профилактических и терапевтических вакцин против ВИЧ-1. В пятом разделе рассказывается о моделях, которые применяются для тестирования вакцин против различных патогенных вирусов. В шестом

разделе описаны принципы создания моделей для тестирования вакцин с использованием клеточных линий мышинной природы. В седьмом разделе автор освещает параметры оценки результатов имплантации опухолевых клеток.

В главе «Материалы и методы» описаны используемые в работе реактивы, праймеры, пептиды, белки, плазмиды, культуры клеток и лабораторные животные, а также подробно описаны вирусологические и молекулярно-биологические методы. Используемые подходы и методики соответствуют поставленным задачам.

Глава «Результаты» включает 9 разделов, посвященных различным этапам работы. В первом и втором разделах автор описывает дизайн консенсусных последовательностей RT, PR и IN ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU\_A и дизайн последовательностей этих белков с мутациями лекарственной устойчивости и аминокислотными заменами, приводящими к инактивации ферментативной активности. В третьем разделе автор уделяет внимание созданию лентивирусных векторов, кодирующих варианты RT, PR и IN ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU\_A, и о получении экспрессирующих эти векторы лентивирусных частиц. Четвертый раздел посвящен созданию производных линии клеток аденокарциномы мышей 4T1Luc2, кодирующих варианты генов RT, PR, IN ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU\_A. В следующих трех разделах рассматривается туморогенный потенциал полученных субклонов 4T1Luc2, способность опухолевых клеток к миграции и метастазированию. В разделе восемь описаны эксперименты по иммунизации лабораторных мышей ДНК-вакцинными конструктами с последующей оценкой иммунного ответа. Раздел девять посвящен оценке эффективности иммунизации экспериментальными ДНК-вакцинами по отношению к «челленджу» субклонами клеточной линии 4T1Luc2, экспрессирующие гены ферментов ВИЧ-1.

В главе «Обсуждение» автор дает критическую оценку полученным результатам настоящей работы с привлечением данных, опубликованных в

других исследованиях. В «Заключении» кратко суммированы основные результаты работы.

#### **Замечания.**

1) В тексте диссертационной работы автор периодически называет апостериорные тесты Даннета и Данна поправками на множественные сравнения, что некорректно, так как это не поправки, а специализированные статистические тесты.

2) При обсуждении данных статистического анализа автор интерпретирует некоторые незначимые результаты, как «тенденцию». Следует избегать подобных трактовок.

3) Неоднозначно воспринимаются цитирования в главе «Результаты» статей, по которым защищается настоящая диссертационная работа.

4) В целом работа написана хорошим литературным языком и содержит небольшое количество неудачных выражений и опечаток. Но таковые все-таки встречаются, например, фраза в главе «Обзор литературы», раздел 1.1., стр. 11: «Вирион ВИЧ представляет собой сферическую частицу диаметром около 100 нм, окруженную липопротеидной мембраной».

Тем не менее, перечисленные выше замечания не снижают высокой значимости диссертационной работы и полученных результатов.

#### **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 ученой степени кандидата биологических наук является законченной научно-квалификационной работой по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного 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 ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. – «Вирусология».

**Официальный оппонент:**

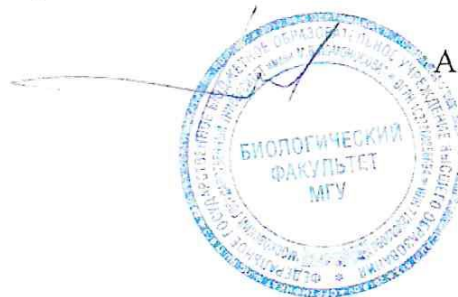
Ведущий научный сотрудник кафедры вирусологии  
биологического факультета Федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова»  
кандидат биологических наук,  
e-mail: trifonova@mail.bio.msu.ru  
тел. 8 499-939-53-67



Евтушенко Екатерина Алексеевна

Подпись к.б.н. Евтушенко Е.А. удостоверяю.  
Зам. декана по научной работе биологического факультета  
Федерального государственного бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования «Московский  
государственный университет имени М.В. Ломоносова»  
профессор, доктор биологических наук

*06.10.23г.*



А.М. Рубцов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». Адрес: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет МГУ. info@mail.bio.msu.ru, тел. +7 (495) 939-27-76.