

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента**

**на диссертацию Демина Михаила Валерьевича,**

**представленную на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук на тему: «Изучение мутационного статуса гена фосфотрансферазы цитомегаловируса и вируса герпеса человека 6, выделенных от реципиентов гемопозитических стволовых клеток»**

**по специальности 1.5.10 – «Вирусология»**

### **Актуальность темы диссертационной работы**

Изучение вопросов, связанных с механизмами формирования лекарственной устойчивости вирусов, ее распространенностью, а также разработка подходов к ее диагностике и преодолению являются актуальными и важными областями исследования современной вирусологии. Инфекция, вызванная отдельными видами  $\beta$ -герпесвирусов, является одним из частых осложнений у пациентов после трансплантации как аллогенных, так и аутологичных стволовых гемопозитических клеток. Инфекция, ассоциированная с цитомегаловирусом (ЦМВ) и вирусами герпеса человека 6А и 6В типа, возникающая у пациентов после химиотерапии или трансплантации гемопозитических стволовых клеток, является тяжелым осложнением, часто проявляющимся развитием пневмонии с дыхательной недостаточностью, энтеропатией, тяжелыми поражениями кожи и слизистых, а также поражением клеток кроветворения. Возможности противовирусной терапии у таких пациентов инфекций, вызванных ЦМВ и вирусами герпеса человека 6А и 6В типа (ВГЧ-6), ограничены двумя препаратами, зарегистрированными в настоящее время в России – ацикловиром и ганцикловиром. В настоящее время описан целый ряд мутаций в геноме ЦМВ и ВГЧ-6, связанных с устойчивостью к этим препаратам. В то же время, данные о спектре и

распространенности этих мутаций в российской популяции, в том числе среди реципиентов гемопоэтических стволовых клеток, получающих иммуносупрессивную терапию, для которых лекарственная резистентность  $\beta$ -герпесвирусов является критически важным вопросом, крайне ограничены. Вышеизложенное определяет высокую степень актуальности данной диссертационной работы.

### **Структура и содержание диссертационной работы**

Диссертационная работа изложена на 122 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 13 рисунками, содержит 8 таблиц. Список литературы включает 117 литературных источников: 4 отечественных и 113 зарубежных источников.

В главе “Введение”, автор представляет значимость вопроса, ясно определяет цели и задачи исследования, представленные в диссертации, описывает научную новизну работы и ее практическую значимость. Также в этой главе сформулированы положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы дана подробная характеристика ЦМВ и ВГЧ-6, а также рассматриваются вопросы, связанные с этими инфекциями у реципиентов гемопоэтических стволовых клеток. Также глава содержит информацию о современных противовирусных препаратах и механизмах формирования устойчивости к ним.

В третьей главе описывается дизайн исследования, используемые материалы и методики. В разделе представлен подробный план исследования, категории пациентов и методология исследования. Описывается процесс подготовки образцов биологического материала, выделения ДНК и амплификации, методики секвенирования и анализа полученных результатов.

В четвертой главе автор представляет результаты исследования и их обсуждение. Большая часть раздела посвящена результатам выявления мутаций в гене UL97 ЦМВ, в том числе при динамическом наблюдении пациентов. Полученные автором результаты подтверждают клиническую значимость выявленных аминокислотных замен в фосфотрансферазе ЦМВ, поскольку возникновение мутаций с высоким уровнем резистентности было связано с повышением вирусной нагрузки и проявлением клинических симптомов. Также в разделе описаны результаты разработки и апробации теста для обнаружения мутаций в гене UL97 ЦМВ, и проанализирована динамика обнаружения ДНК ЦМВ и ВГЧ-6 с помощью метода ПЦР у реципиентов гемопоэтических стволовых клеток за период с 2015 по 2019 год.

#### **Научная и практическая значимость результатов**

Результаты диссертационной работы Демина Михаила Валерьевича имеют большое значение для оптимизации подходов к противовирусной терапии инфекций, вызываемых  $\beta$ -герпесвирусами. Работа обладает несомненной научной новизной. Так, автором впервые в России проведены исследования по определению спектра и распространенности мутаций лекарственной устойчивости в гене, кодирующем фосфотрансферазу ЦМВ и ВГЧ-6 у взрослых больных гемобластозами и реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Анализ динамики возникновения этих мутаций в геноме ЦМВ позволил подтвердить их клиническую значимость и связь с увеличением вирусной нагрузки и возникновением осложнений у пациентов. Полученные результаты позволили автору доказать необходимость разработки и/или усовершенствования подходов к лечению ЦМВ-инфекции у реципиентов гемопоэтических стволовых клеток при обнаружении мутаций лекарственной устойчивости в геноме вируса. Практическая значимость настоящего исследования заключается в определении спектра наиболее часто встречаемых мутаций,

ассоциированных с лекарственной устойчивостью у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, а также в предложенном диагностическом алгоритме для своевременной идентификации резистентного штамма, который в свою очередь позволяет скорректировать терапевтическую тактику. Разработанный прототип тест-системы на основе аллель-специфичной ПЦР для идентификации мутаций С592G и С603W в гене фосфотрансферазы ЦМВ является значительным вкладом в решение актуальной практической проблемы и имеет существенное значение для таких областей, как вирусология и гематология.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Достоверность и обоснованность положений, выносимых на защиту, и выводов диссертации обусловлены детальным теоретическим анализом проблемы, достаточным объемом собственных исследований, подтверждается выполнением исследований на большом объеме клинических образцов. Выбранные автором мишени для секвенирования и анализа мутаций лекарственной устойчивости в геноме ЦМВ и ВГЧ-6 представляются логичными и обоснованными. Биоинформатическая обработка полученных данных секвенирования проведена с использованием стандартного программного обеспечения. Для валидации разработанного ПЦР-теста для выявления мутаций в гене фосфотрансферазы ЦМВ автором использовались контрольные образцы, наличие в которых мутаций было подтверждено секвенированием по Сенгеру.

**Полнота опубликованности положений и результатов диссертации**

Результаты исследования были опубликованы в семи статьях в рецензируемых научных изданиях, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК и/или индексируемых в международных системах

цитирования (Web of Science, Scopus, PubMed). Текст автореферата диссертации полностью отражает описание проведенного исследования. Публикации отражают основные результаты, полученные в работе. Поставленные в исследовании задачи соответствуют цели исследования. Сформулированные автором выводы по результатам исследования полностью согласуются с приведенным в диссертации фактическим материалом. Все выводы автора, основанные на полученных результатах, и положения, представленные для защиты, являются обоснованными и достоверными, что подтверждается приведенными результатами исследований.

#### **Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе**

Принципиальных замечаний по содержанию диссертационной работы Демина Михаила Валерьевича не имею. При ознакомлении с диссертационным исследованием возникают следующие вопросы и замечания, не снижающие, впрочем, общего достоинства работы:

- 1) Хотелось бы увидеть характеристику пациентов проанализированной группы при поиске мутаций: это только взрослые? Какова медиана возраста? Какое распределение по полу? Сколько пациентов с критерием раннего выявления ДНК ЦМВ (до 30 дней) после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.
- 2) В работе не описаны методы статистического анализа. Какие критерии применялись для оценки статистической значимости различий в частоте выявления ЦМВ и ВГЧ-6, а также показателей вирусной нагрузки?
- 3) Были ли депонированы в GenBank или других базах данных полученные в работе нуклеотидные последовательности?
- 4) В группе пациентов, отнесенных к потенциально имеющим резистентный вариант вируса на основании выбранных автором

критериев, частота выявления мутаций лекарственной устойчивости в гене фосфотрансферазы оказалась только 8,2% для ЦМВ и 0% для ВГЧ-6. С чем могут быть связаны такие низкие уровни выявления среди пациентов с клиническими проявлениями лекарственной устойчивости? С нечеткими критериями включения пациентов в группу имеющих признаки резистентной инфекции? Или с наличием мутаций в других участках вирусного генама, например, в гене ДНК-полимеразы?

5) На рисунке 13 и в таблице 8 приведена динамика выявления мутаций лекарственной устойчивости ЦМВ в динамике для одного пациента. Для остальных 15 пациентов, как утверждается, динамика выявления мутаций и вирусной нагрузки была сходной. Однако эти данные не приведены в работе. Целесообразно было бы представить эти данные обобщенными для всех наблюдавшихся пациентов. Кроме того, автором не представлено объяснения реверсии вируса к дикому типу на фоне проводимой противовирусной терапии, не смотря на очевидное преимущество мутантного (резистентного варианта). Оценивался ли иммунный статус этих пациентов, сохранялась ли одинаковая схема иммуносупрессивной терапии на протяжении всего периода наблюдения у этих пациентов?

### **Заключение**

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.10 – «Вирусология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также

оформлена, согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Демин Михаил Валерьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – «Вирусология».

Официальный оппонент:

Профессор РАН, доктор биологических наук,  
Заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов ФБУН "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Роспотребнадзора,  
Кюрегян Карен Каренович

---

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 974-9639, e-mail: [karen-kyuregyan@yandex.ru](mailto:karen-kyuregyan@yandex.ru)

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:  
03.02.02 – Вирусология

Адрес места работы:

111123, Москва, ул. Новогиреевская, д.3А,  
ФБУН "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Роспотребнадзора  
Тел.: +7 (495) 974-9639; e-mail: [crie@pcr.ru](mailto:crie@pcr.ru)

Подпись сотрудника ФБУН "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Роспотребнадзора  
К.К. Кюрегяна удостоверяю:

Ученый секретарь ФБУН "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Роспотребнадзора



Т.С. Никитина

---