

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

**доктора биологических наук, профессора, академика РАН,  
заведующего лабораторией бионанотехнологии, микробиологии и  
вирусологии**

**Федерального государственного автономного образовательного  
учреждения высшего образования «Новосибирский национальный  
исследовательский государственный университет»**

**Нетёсова Сергея Викторовича**

**на диссертационную работу Костюшева Дмитрия Сергеевича  
«Принципы полной элиминации вируса гепатита В»,  
представленную на соискание ученой степени доктора биологических  
наук по специальности 1.5.10 – Вирусология**

Хронический гепатит В представляет собой одну из основных инфекционных болезней, которая много лет является проблемой здравоохранения в мировом масштабе с общей смертностью около 1 миллиона человек в год. Разработанные в последние десятилетия лечебные препараты, основанные на нуклеотидных и нуклеозидных аналогах субстратов ДНК-(РНК)-полимеразы вируса гепатита В, эффективно подавляют репликацию вируса, однако не способны полностью устранить его из организма. Основной причиной хронической инфекции является внутриклеточная форма генома вируса — кольцевая ковалентно-замкнутая ДНК. Разработка методов инактивации этой формы открывает возможность полного излечения от этой хронической инфекции и искоренения как заболевания, так и самого вируса гепатита В. Технологии на основе сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 позволяют осуществить высокоспецифичное расщепление ДНК-мишеней в заданных участках, что программируется с помощью коротких последовательностей РНК (РНК-проводников). Таким образом, системы CRISPR/Cas9 представляют собой многообещающие инструменты для разработки новых противовирусных подходов, направленных на разрезание/инактивацию вирусных ДНК непосредственно в зараженных вирусами клетках. С помощью систем

CRISPR удалось достигнуть 99%-ного снижения количества геномов вируса в клетках. Тем не менее, задача полной элиминации инфекции вируса гепатита В из клеток оставалась неразрешенной.

Это вернее всего может быть связано с плохо изученными механизмами вирусной персистенции, репликации вирусных геномов, особенностями реактивации инфекции, а также с ролью эпигенетических модификаций кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК в поддержании хронической инфекции.

Диссертационная работа Костюшева Д.С. посвящена определению ключевых компонентов жизненного цикла вируса гепатита В, которые имеют значение для вирусной персистенции, репликации и реактивации инфекции, а также разработке на их основе принципов полной элиминации вируса гепатита В в инфицированных клетках человека. В ходе исследования было продемонстрировано, что кольцевая ковалентно-замкнутая ДНК в весьма значительной степени разрушается под воздействием сайт-специфических комплексов нуклеаз CRISPR/Cas9. Однако, было выяснено, что даже при разрушении кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК в цитоплазме происходит импорт в ядро другой формы генома вируса - кольцевой частично-двухцепочечной ДНК, которая способна заново запускать вирусный цикл. В настоящей работе продемонстрировано, что для полного удаления вируса из инфицированных клеток, необходимо предварительно предельно снизить количество молекул частично-двухцепочечной ДНК с помощью известных лечебных препаратов - аналогов нуклеотидов. На основе полученных данных предложена стратегия полной элиминации из организма человека вируса гепатита В, основанная на последовательном или совместном использовании ингибиторов обратной транскриптазы и короткоживущих рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9. Разработанная стратегия в перспективе может стать основой для высокоэффективной терапии

пациентов с хроническим гепатитом В и сочетанным хроническим гепатитом В+D.

Параллельно автор изучил, как нуклеазы CRISPR/Cas9 распознают и расщепляют эпигенетически-модифицированную (метилованную по CpG островкам) ДНК вируса гепатита В. Показано ранее, что подобные модификации происходят в ходе прогрессии хронического гепатита и развития рака печени. Предполагается, что различные эпигенетические модификации могут снижать активность CRISPR/Cas9 систем. Для точного прояснения этого Д.С.Костюшев продемонстрировал, что метилирование генома вируса нарушает расщепление нуклеазами CRISPR/Cas9. Более того, он показал, что увеличение используемой дозы CRISPR/Cas9 позволяет преодолеть негативный эффект метилирования и добиться разрушения генома вируса.

Диссертантом также была продемонстрирована роль факторов клеточного ответа на повреждение ДНК ATM и ATR в усилении репликации вируса гепатита В и реактивации инфекции. Также подробно была изучена роль цитидин-дезаминаз APOBEC/AID в инфекции вируса гепатита В. Так, показано, что внутриклеточные дезаминазы способны препятствовать образованию кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК, а при их сверхэкспрессии происходит гипермутация и снижение уровней кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК.

Диссертационное исследование выполнено на высоком современном экспериментальном уровне, и полученные результаты являются достоверными. Это подтверждено наличием множества контролей, стабильной воспроизводимостью результатов в независимых экспериментах и на различных моделях, а также использованием разнообразных методов анализа. Выводы диссертации сформулированы в полном соответствии с полученными результатами и соответствуют задачам, поставленным в начале исследования.

По материалам диссертации опубликовано 16 оригинальных и 9 обзорных статей в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и РИНЦ, зарегистрировано 2 патента, опубликована 1 глава в коллективной монографии. Материалы диссертации были представлены на различных российских и международных научных конференциях.

Диссертационная работа построена по классической схеме и включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, выводы, список использованных сокращений и список использованной литературы. Работа изложена на 289 страницах машинописного текста, иллюстрирована 118 рисунками и 3 таблицами. Список литературы включает 503 источника.

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

Обзор литературы состоит из 3 разделов. В первом разделе автор описывает эпидемиологические особенности, жизненный цикл вируса гепатита В и современные методы лечения инфекции, вызванной этим вирусом. Во втором и третьем разделах рассматриваются способы изменения транскрипции с помощью систем CRISPR, также приводятся данные о номенклатуре и особенностях различных систем CRISPR/Cas. В четвертом разделе описываются данные о репликации вируса в инфицированной клетке.

В главе «Материалы и методы» подробно приведены используемые в работе экспериментальные методы и методы статистического анализа. Используемые подходы и методы соответствуют поставленным задачам.

Глава «Результаты и обсуждение» содержит 4 основных раздела. В первом разделе описывается способ разрушения основной формы генома вируса гепатита В нуклеазами CRISPR/Cas9. Исследованы клеточные пути репарации, которые активируются для репарации генома вируса гепатита В. Предложен метод оценки эффективности CRISPR/Cas9 в отношении генома вируса гепатита В с использованием соединения NU7026. Показано, что матрицы кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК эффективно разрушаются под действием систем нуклеолитического расщепления.

Второй раздел содержит информацию о возобновлении персистенции вируса гепатита В за счет ре-импорта кольцевой частично-двухцепочечной ДНК в условиях элиминации кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК. Продемонстрировано, что с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 можно добиться удаления подавляющего большинства матриц кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК. Однако, было показано, что цикл репликации восстанавливается из-за сохранившихся предшественников генома. Дополнительное применение аналогов нуклеотидов или нуклеозидов устраняет возможность восстановления вирусной репликации после разрушения кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК системами CRISPR/Cas9.

В третьем разделе приводится влияние метилирования ДНК вируса гепатита В и HBx-белка на нуклеолитическое действие CRISPR/Cas9 и реактивацию вирусной инфекции.

Установлено, что метилирование ДНК вируса гепатита В нарушает противовирусное действие систем CRISPR/Cas9. При этом ключевую роль играют как расположение сайта посадки направляющей РНК, так и обогащенность ДНК CpG островками. С целью преодоления этого явления автором было предложено использовать более высокие дозы рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9. Выявлена ведущая роль

факторов повреждения генома АТМ и АТР в усилении вирусной репликации при использовании ДНК-повреждающих химиотерапевтических препаратов и генотоксических агентов. Впервые была обнаружена возможность активации репликации ВГВ из гиперметирированного состояния кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК благодаря активности белка вируса HBx.

Четвертый раздел описывает влияние факторов АРОВЕС/AID на репликацию вируса гепатита В и клетки человека. Автором разработан метод кратковременной активации экспрессии цитидин-дезаминаз из семейства АРОВЕС/AID, проведён анализ их воздействия на вирусную репликацию, мутации вирусных геномов, а также на цитотоксические и генотоксические эффекты. Предложен способ регулирования уровней активации АРОВЕС/AID с использованием аттенуированных РНК-проводников, которые позволяют точно контролировать активацию целевых генов, сохраняя противовирусные свойства с минимизацией токсических эффектов.

Следует также отметить, что в случае успеха клинических испытаний при применении данной стратегии можно попробовать ее применить и для элиминации из инфицированного организма ДНК-копий вируса иммунодефицита человека.

По диссертации можно сделать следующие замечания, переходящие в вопросы:

1. Для преодоления эффекта метилирования автором предлагается использовать более высокие дозы комплексов. Но при этом непонятно, изучалась ли безопасность таких высоких доз на моделях *in vitro* и *in vivo*.
2. Не проверено, наблюдалось ли при данной методике элиминации ДНК ВГВ частичной дегградации клеточных или митохондриальных ДНК.
3. Не изучен практический потенциал применения активации АРОВЕС для терапии хронического гепатита В.

Вместе с тем вышеприведенные замечания не снижают значимости полученных результатов.

В целом работа полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 года (с изменением Постановления Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г.), предъявляемым к докторским диссертациям, а Костюшев Дмитрий Сергеевич заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности «вирусология».

Заведующий лабораторией бионанотехнологии,  
микробиологии и вирусологии Факультета естественных наук  
Новосибирского государственного университета,  
академик РАН, д.б.н., профессор

Сергей Викторович Нетёсов

E-mail: [svn15@hotmail.com](mailto:svn15@hotmail.com); [netesov.s@nsu.ru](mailto:netesov.s@nsu.ru); тел. +7 (383) 363-42-03.  
Сот. +7-913-910-0843

Подлинность подписи С.В. Нетёсова заверяю:

Ученый секретарь НГУ *к.х.н.*

«10» января 2025 года



Е.А.Тарабан

630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ). Тел. (383) 363-43-33.  
<http://www.nsu.ru>.