

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Кихай Татьяны Фёдоровны
на тему: «Влияние клеточного белка SFPQ на репликацию вируса
иммунодефицита человека типа 1»
по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия**

Актуальность темы диссертации

Вирус иммунодефицита человека вот уже несколько десятилетий является угрозой мировой системе здравоохранения, поражая все большее и большее число людей. На сегодняшний день более 40 млн людей живут с ВИЧ-положительным статусом во всем мире и ежегодно выявляется более миллиона новых случаев. Несомненные успехи антиретровирусной терапии (АРТ) привели к тому, что ВИЧ-инфекция приобрела статус хронической, а продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных людей сравнима с условно здоровым населением. Пожизненная необходимость в антиретровирусной терапии приводит к ряду ключевых последствий. Во-первых, возникновение лекарственно-устойчивых форм вируса. Следует отметить, что ранее такие варианты вируса выявлялись только у пациентов на АРТ, тогда как на сегодняшний день растет частота выявления лекарственно-устойчивых вариантов вируса от пациентов, никогда не принимавших АРТ. Во-вторых, и как следствие, необходимость множественных «линий» и комбинаций антиретровирусных препаратов. При этом известно, что стоимость препаратов «второй линии» превышает таковую препаратов «первой линии». Все это несомненно усиливает давление пандемии ВИЧ на мировую систему здравоохранения. По данным различных исследований, АРТ терапия обходится в 130-200\$ в год на одного пациента и эта стоимость будет только расти. В связи с этим остро стоит вопрос о поиске новых антиретровирусных препаратов. Препараты, нацеленные на взаимодействие вирусный-клеточный белок обладают рядом преимуществ относительно классических противовирусных препаратов прямого действия, нацеленных на отдельные вирусные белки. Такие

препараты обладают широким спектром действия и менее чувствительны к различиям между отдельными субтипами/штаммами/изолятами вируса. Кроме того, такие препараты обладают более высоким барьером к появлению мутаций лекарственной устойчивости.

Автор диссертации в своей работе описывает новые клеточные белки-партнеры интегразы ВИЧ-1 и детально изучает их взаимодействие с интегразой как со структурной точки зрения («где именно»), так и с функциональной («на каком этапе жизненного цикла»). Подобные работы несомненно актуальны в области разработки новых антиретровирусных препаратов.

Краткая характеристика основного содержания диссертации

Диссертационная работа написана по традиционной схеме и состоит из введения и 3-х глав основной части диссертации, включающих обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, а также заключение, выводы, список литературы и приложения. Работа изложена на 117 страницах, иллюстрирована 6 таблицами и 24 рисунками. Список литературы содержит 179 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 отдельных белков (поверхностных гликопротеинов, обратной транскриптазы и интегразы), а также описанию ранних этапов жизненного цикла вируса. При этом особое внимание автор уделяет описанию антиретровирусных препаратов, нацеленных на рассматриваемые белки. 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 исследователя.

Глава «Результаты и обсуждения» включает в себя следующие работы: анализ влияния белков SFPQ и NONO на ранние стадии репликации ВИЧ-1 и анализ взаимодействия этих белков с интегразой и обратной транскриптазой ВИЧ-1; поиск аминокислотных остатков интегразы ВИЧ-1, важных для взаимодействия с SFPQ; анализ функциональной активности точечных мутантов интегразы и поиск аминокислотных остатков SFPQ, участвующих во взаимодействии с интегразой ВИЧ-1; выяснение механизма влияния SFPQ на интеграцию и постинтеграционную репарацию. Представленные экспериментальные данные дополнены анализом и интеграцией в существующие мировые данные по теме.

Обобщение полученных результатов приведено в главе «Заключение».

Степень обоснованности и достоверности положений, выносимых на защиту, научных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность выводов и рекомендаций диссертации обеспечивается комплексным использованием современных методик и большим объемом экспериментальных данных. Сформулированные выводы и рекомендации логически вытекают из полученных данных и полностью соответствуют поставленным целям и задачам.

Достоверность полученных результатов определяется большим объемом полученных данных, наличием повторов и применением множества современных методов исследования. Проведена статистическая оценка всех полученных результатов, показана их статистическая значимость. Результаты диссертационной работы Кихай Т.Ф. представлены в статьях, опубликованных в рецензируемых российских и международных журналах. Материалы диссертации Кихай Т.Ф. представлены на нескольких российских и международных конференциях.

Научная новизна выполненной работы

В ходе диссертационного исследования впервые установлена роль клеточных белков SFPQ и NONO в ранних стадиях репликации ВИЧ-1. Показано, что белок SFPQ, связываясь с интегразой (ИН), выступает положительным регулятором интеграции и постинтеграционной репарации, тогда как белок NONO не участвует в этих процессах. В ходе исследования были впервые идентифицированы ключевые аминокислотные остатки, критичные для взаимодействия ИН-SFPQ. Было также впервые продемонстрировано, что данное взаимодействие необходимо для процесса интеграции, но не для постинтеграционной репарации. На основе этих данных комплекс ИН-SFPQ был впервые предложен в качестве новой потенциальной мишени для противовирусной терапии.

Оценка практической значимости диссертационной работы

Практическая значимость диссертационной работы Кихай Т.Ф. не вызывает сомнений. В ходе диссертационного исследования автор не только выявила факт взаимодействия между интегразой ВИЧ-1 и клеточным белком SFPQ, но и детально изучила, какие структурные участки и аминокислоты задействованы в этом взаимодействии. В ходе исследования было показано, что нарушение этого взаимодействия приводит к снижению репликации вируса. Все это является основой для разработки новых антиретровирусных препаратов на основе ингибиторов взаимодействия этих белков.

Замечания

Несмотря на то, что диссертационная работа Кихай Татьяны Фёдоровны 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) Раздел «Список сокращений» не имеет единого оформления.

Кроме того, при расшифровке англоязычных терминов следует

езде указывать полное английское название термина, легшее в основу аббревиатуры, и перевод термина при наличии.

- 2) В ходе диссертационной работы Кихай Т.Ф. исследовала два клеточных белка: SFPQ и NONO. Несмотря на то, что было показано, что белок NONO не взаимодействует с интегразой и не влияет на репликацию ВИЧ-1, белок NONO следовало включить в название и предметы исследования. Отрицательный результат тоже является важным результатом, полученным в ходе исследования. Кроме того, как описывает автор, это опровергает ранее опубликованные данные о взаимодействии белка NONO и интегразы ВИЧ-1.
- 3) Обзор литературы обладает, возможно, избыточным описанием структуры и функций поверхностных гликопротеинов и обратной транскриптазы ВИЧ-1, не относящихся к сути работы и не способствующих ее пониманию.
- 4) В обзоре литературы, в разделе П.2.6.1 автор пишет «предполагается, что активной формой ИН ВИЧ-1 является мультимер [130]. Основными предлагаемыми моделями являются тетрамер, димер тетрамеров или димер октамеров, где мультимеризация необходима для кооперативного связывания с двумя концами вирусной ДНК и последующего выполнения двухступенчатой реакции интеграции [131]». Однако, в 2017 году была разрешена структура интасомы ВИЧ-1. В составе интасомы интеграза представляет собой тетрамер, состоящий из двух димеров интегразы. Более того, автор ссылается на описанные данные и статью, опубликованную в Science Passos D.O. et al “Cryo-EM structures and atomic model of the HIV-1 strand transfer complex intasome” в ходе обсуждения своих результатов.
- 5) В ходе диссертационного исследования автором было получено огромное количество различных плазмидных конструкций. Для

облегчения понимания хода работы следовало сделать таблицу, резюмирующую все полученные конструкторы и область их применения.

- 6) В разделе материалы и методы состав различных буферных растворов предпочтительней приводить в молярностях, а не в концентрациях (г/л).
- 7) При получении рекомбинантных белков наличие целевых белков SFPQ и NONO подтверждали с помощью электрофореза в ПААГ. При выделении интегразы описано только финальное количественное определение концентрации белка по методу Бредфорда. Почему автор не проводила идентификацию целевых белков с использованием специфических антител (по методу Вестерн блот)? Учитывая склонность интегразы к агрегации, оценивали ли полученный рекомбинантный белок с использованием электрофореза в ПААГ?
- 8) В разделе III.14 «Вестерн-блот анализ» автор не указала используемые антитела и их разведение.
- 9) В главе «Материалы и методы» отсутствует раздел «Статистика». Хотя автор указывает используемые статистические методы непосредственно в каждом разделе результатов, следует указывать раздел «Статистика», где кроме используемых статистических критериев указать программу, используемую для обсчета данных.
- 10) В главе «Результаты и обсуждения» на рисунке 13А следует привести не только результаты Вестерн блот анализа, но и графический обсчет уровня экспрессии целевых белков. Хотя, безусловно, из представленных данных видно оверэкспрессию и подавление экспрессии в соответствующих образцах, анализ и интерпретация представленных данных значительно затруднены без искомого графика.

- 11) Некоторые рисунки (Рисунок 22 и Рисунок 23) расположены в тексте довольно далеко от места их упоминания, что затрудняет прочтение текста работы.
- 12) В целом работа написана хорошим литературным языком, но все же содержит небольшое количество неудачных выражений и опечаток.
- а. Так, в главе «Обзор литературы» в разделе II.1 автор пишет «Геном ВИЧ-1, ..., состоит из одноцепочечной молекулы (+)РНК...» при этом особенностью вирусов данного семейства является диплоидный геном, представленный двумя копиями одинаковых одноцепочечных молекул (+) РНК.
 - б. В разделе II.1.2 автор пишет, что вирусный белок nef увеличивает экспрессию комплексов МНС I и МНС II на поверхности зараженных клеток, в то время как он ее уменьшает.

Заключение

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 пункту 1 специальности 1.4.9. Биоорганическая химия (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено 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 Кихай Татьяна Фёдоровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории моделирования
иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой
игрунковых обезьян
ФГАНУ «Федеральный научный центр
исследований и разработки
иммунобиологических препаратов имени
М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)»

Баюрова Екатерина Олеговна

19.11.2025 г