«УТВЕРЖДАЮ»

Первый проректор-

Проректор по научной работе РУДН

Доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН

_____А.А. Костин

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН) на основании решения, принятого на заседании кафедры биохимии им. академика Т.Т. Березова Медицинского Института РУДН протокол № 0300-06-БУП-3 от 01.06.2026 года

Диссертация «Роль кольцевой частично двуцепочечной ДНК в ограничении противовирусной и дезаминирующей активности цитидин-дезаминаз APOBEC/AID» выполнена на кафедре биохимии им. академика Т.Т. Березова Медицинского Института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы»

Тихонов Андрей Сергеевич 1997 года рождения, гражданин РФ, в 2021 году окончил с отличием ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России по специальности Медицинская биохимия (диплом 107704 0328423)

В период подготовки диссертации (с 2021 г. по 2026 г.) являлся аспирантом кафедры биохимии им. академика Т.Т. Березова Медицинского Института РУДН.

Экзамены кандидатского минимума сданы по дисциплинам: биохимия – 28 февраля 2025 г., молекулярная биология – 10 июня 2025 г., иностранный язык (английский) - 10 февраля 2025 г., история и философия науки – 20 июня 2024 г. Справка о сдаче кандидатских экзаменов №1695 выдана 20 апреля 2026 года в ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

В настоящее время работает в должности научного сотрудника лаборатории экспериментальной терапии инфекционных болезней Института медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Научные руководители:

Покровский Вадим Сергеевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии имени академика Т.Т. Березова Медицинского института РУДН.

Костюшев Дмитрий Сергеевич, доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии Института фармации им. А.П. Нелюбина Первого МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России.

Название темы диссертационного исследования в окончательной редакции «Роль кольцевой частично двуцепочечной ДНК в ограничении противовирусной и

дезаминирующей активности цитидин-дезаминаз APOBEC/AID» было утверждено на заседании ученого совета Медицинского института РУДН, 17.04.2025, протокол № 0300-УСП-8.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Оценка выполненной соискателем работы:

Диссертация Тихонова Андрея Сергеевича «Роль кольцевой частично двуцепочечной ДНК в ограничении противовирусной и дезаминирующей активности цитидин-дезаминаз APOBEC/AID» представляет собой самостоятельное целостное исследование, являющееся научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области молекулярной биологии и биохимии вирус-клеточных взаимодействий при инфекции вирусом гепатита В. Особое значение работы состоит в выявлении ранее не описанного механизма конкурентного взаимодействия между избыточной кольцевой частично двуцепочечной ДНК (кчдДНК) и ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (ккзДНК) вируса гепатита В за активность цитидин-дезаминаз семейства APOBEC/AID, а также в характеристике различий в противовирусном и мутагенном потенциале отдельных представителей семейства APOBEC3.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации, состоит в:

Все представленные в диссертации данные получены Тихоновым А.С. лично или при его непосредственным активным участием. Соискатель самостоятельно осуществлял поиск и анализ научной литературы по теме исследования, формулировал рабочие гипотезы и планировал дизайн экспериментов, включая разработку экспериментальных моделей трансфекции клеток кчдДНК, выделенной из очищенных вирионов вируса гепатита В, и моделей CRISPR/CRISPRa-опосредованной активации генов APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3H и AID.

Автор лично выполнял основной объем экспериментальной работы, включая культивирование клеточных линий HepG2, HepG2-hNTCP и HepaRG-hNTCP, генетические манипуляции с использованием систем CRISPR-активации и РНК-интерференции, а также молекулярно-биологические и биохимические анализы (3D-PCR, NGS, ChIP-Seq, qRT-PCR, ELISA, вестерн-блоттинг). Соискателем самостоятельно проведена статистическая обработка полученных данных, их критический анализ и биологическая интерпретация в контексте существующих научных представлений о взаимодействии вируса гепатита В с системой врождённого иммунитета.

Тихонов А.С. непосредственно участвовал в подготовке публикаций по теме диссертации, а также лично представлял результаты исследования в виде устных и стендовых докладов на российских и международных научных конференциях. Содержание диссертации и основные положения, выносимые на защиту, отражают персональный вклад автора в опубликованные научные работы.

Степень достоверности результатов проведенных исследований.

Эксперименты были выполнены на сертифицированном оборудовании; результаты подтверждены независимыми биологическими повторностями и методами взаимного контроля (3Д-ПЦР, NGS, ChIP-Seq, qPCR, ELISA, вестерн-блот). Статистический анализ проведён с применением критерия Стьюдента, однофакторного и двухфакторного

дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом Тьюки при пороге значимости $p < 0,01$; расчёты выполнены в программном обеспечении R версии 4.1.2 в среде RStudio. Разработанные экспериментальные модели и методические подходы внедрены в научно-исследовательскую деятельность Института медицинской паразитологии и тропической медицины имени Е.И. Марциновского ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

Новизна результатов проведённого исследования заключается в следующем:

- Впервые идентифицирован механизм «фоновой защиты» вируса гепатита В — механизм «молекулярной ловушки», при котором избыток кольцевой частично двуцепочечной ДНК (кчдДНК) конкурентно насыщает цитидин-дезаминазы APOBEC/AID, ограничивая их мутагенное воздействие на ковалентно замкнутую кольцевую ДНК (ккзДНК).
- Впервые создана экспериментальная модель трансфекции клеток человека кчдДНК, изолированной из очищенных вирионов вируса гепатита В, позволяющая напрямую тестировать субстратную конкуренцию между кчдДНК и ккзДНК.
- Продемонстрировано, что гиперметилированная, транскрипционно инактивированная форма ккзДНК подвергается более интенсивному дезаминированию цитидин-дезаминазами по сравнению с транскрипционно активной формой.
- Изучено влияние APOBEC/AID-дезаминаз на клетках человека с естественной инфекцией вируса гепатита В в условиях фармакологической (аналоги нуклеотидов) и молекулярно-биологической (РНК-интерференция) блокады синтеза кчдДНК.
- Установлена анти-мутагенная роль кчдДНК вируса гепатита В, проявляющаяся в обратной зависимости между уровнем вирусной репликации и степенью внецелевого мутагенеза геномной ДНК клетки-хозяина; показано, что снижение пула кчдДНК при подавлении репликации вируса приводит к дезаминированию онкосупрессора TP53 и других клеточных генов фактором APOBEC3A.
- Впервые показано, что белок APOBEC3A упаковывается в нуклеокапсиды вируса гепатита В, формируя дополнительный внутривирионный компартмент связывания кчдДНК.
- Методом ChIP-Seq картировано взаимодействие белков APOBEC3A и APOBEC3B с хроматином инфицированных клеток при активной репликации вируса и в условиях подавления образования кчдДНК.
- Впервые охарактеризована противовирусная активность APOBEC3C, APOBEC3D и APOBEC3H на инфекционной модели вируса гепатита В: показана их способность подавлять вирусную репликацию и дезаминировать ккзДНК без индукции мутагенеза в онкогенах клетки-хозяина.

Практическая значимость проведенных исследований.

Полученные результаты раскрывают принципиально новый аспект взаимодействия вирусов, в частности, ВГВ с системой врождённого иммунитета - механизм «конкурентного насыщения» цитидиндезаминаз избытком вирусного генома - кчдДНК.

Это открытие меняет концептуальное представление об избегании и противодействии иммунному ответу ВГВ, переориентирует подходы к терапевтической активации APOBEC/AID и указывает на необходимость учёта пула кчдДНК при разработке стратегий направленной элиминации ккзДНК. Практическая значимость работы обусловлена (1) нарастающим риском развития мутагенеза в геноме инфицированных клеток при активации A3A на фоне применения аналогов нуклеозидов/нуклеотидов и инструментов подавления вирусной репликации. Тем самым, был идентифицирован существенный недостаток подходов к лечению ВГВ-инфекции на основе цитидин-дезаминаз. (2) идентифицированы относительно безопасные члены семейства APOBEC3 (A3C, A3D, A3H), не вызывающие внецелевого дезаминирования генома человека, что открывает перспективу создания противовирусных инструментов с приемлемым профилем безопасности, которые могут лечь в основу комбинированных подходов к лечению ВГВ-инфекции.

Ценность научных работ соискателя заключается в формировании целостной концепции, раскрывающей роль различных молекулярных форм вирусного генома в регуляции активности клеточных факторов врождённого иммунитета на примере вируса гепатита В. Предложенная автором модель конкурентного насыщения цитидин-дезаминаз APOBEC/AID избыточной кольцевой частично двуцепочечной ДНК (кчдДНК) объединяет в единую систему ранее разрозненные наблюдения о низкой эффективности естественного и индуцированного дезаминирования ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (ккзДНК) вируса гепатита В и открывает новое направление исследований в области молекулярной вирусологии и биохимии врождённого иммунитета.

Соответствие пунктам паспортов научных специальностей:

Специальности, которым соответствует диссертация: п.10 паспорта специальности 1.5.4. «Биохимия», п. 11 и п. 12 паспорта специальности 1.5.3. «Молекулярная биология».

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем:

По материалам диссертации опубликовано 7 работ в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus, в том числе 7 - в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России. Основные результаты доложены на 10 международных и всероссийских научных конференциях в 2024–2025 гг.

1. Kostyusheva A., Brezgin S., Ponomareva N., Frolova A., Lunin A., Bayurova E., **Tikhonov A.**, Slatinskaya O., Demina P., Kachanov A., Babayeva G., Khan I., Khochenkov D., Khochenkova Y., Sokolova D., Silachev D., Maksimov G., Khaydukov E., Pokrovsky V. S., Zamyatnin A. A. Biologics-based technologies for highly efficient and targeted RNA delivery // Molecular Therapy. 2025. Vol. 33. No. 1. pp. 168-183. (ВАК/Scopus/WoS), Impact factor — 12.

2. Brezgin S, Frolova A, Bayurova E, Slatinskaya O, Ponomareva N, Parshina E, Bochkova Z, Kachanov A, **Tikhonov A**, Kostyusheva A, Karandashov I, Demina P, Latyshev O, Eliseeva O, Belikova M, Pokrovsky VS, Gegechkory V, Khaydukov E, Silachev D, Zamyatnin AA Jr, Maksimov G, Lukashev A, Gordeychuk I, Chulanov V, Kostyushev D. Saponin is Essential for the Isolation of Proteins and RNA from Biological Nanoparticles // Analytical Chemistry. 2024. Vol. 96. No. 43. pp. 17432-17443. (ВАК/Scopus/WoS), Impact factor — 6,7.

3. **Tikhonov A. S.**, Kachanov A., Yudaeva A. D., Danilik O., Ponomareva N., Karandashov I., Kostyusheva A., Zamyatnin A. A., Parodi A., Chulanov V., Brezgin S., Kostyushev D. Biomimetic Nanoparticles for Basic Drug Delivery // Pharmaceutics. 2024. Vol. 16. No. 10. p. 1306. (ВАК/Scopus/WoS), Impact factor — 5,5.

4. Kachanov, A., Kostyusheva, A., Brezgin, S., Karandashov, I., Ponomareva, N., **Tikhonov, A.**, Lukashev, A., Pokrovsky, V., Zamyatnin, A. A., Jr, Parodi, A., Chulanov, V., & Kostyushev, D. The menace of severe adverse events and deaths associated with viral gene therapy and its potential solution // Medicinal research reviews. 2024. Vol. 44. No. 5. pp. 2112–2193. (ВАК/Scopus/WoS), Impact factor — 13.6.

5. **Tikhonov A.**, Mintaev R. R., Glazkova D. V., Bogoslovskaya E. V., Shipulin G. A. HIV Restriction Factor APOBEC3G and Prospects for Its Use in Gene Therapy for HIV // Molecular Biology. 2022. Vol. 56. No. 4. pp. 508-516. (ВАК/Scopus/WoS), Impact factor — 1,2.

6. Karandashov I. V., Brezgin S. A., Ponomareva N. I., **Tikhonov A. S.**, Chulanov V. P., Kostyushev D. S., Kostyusheva A. P. Antiviral and Mutagenic Effects of APOBEC Deaminases A3C, A3D, and A3H in a Hepatitis B Virus Model. // Biochemistry Moscow 2026 Vol. 91, 289–298. (ВАК/Scopus/WoS) Impact factor — 2,2.

7. Bayurova E., Kostyushev D., **Tikhonov A. S.**, Chulanov V., Gordeychuk I. Broad-acting antivirals: the pursuit of pan-viral therapeutics in the era of pandemics // Journal of Virology. 2026. e00077-26. (ВАК/Scopus/WoS) Impact factor — 3,8.

Текст диссертации был проверен на использование заимствованного материала без ссылки на авторов и источники заимствования. После исключения всех корректных совпадений иных заимствований не обнаружено.

Диссертационная работа Тихонова Андрея Сергеевича рекомендуется к публичной защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.4 Биохимия и 1.5.3. Молекулярная биология.

Заключение принято на заседании кафедры биохимии имени академика Т.Т. Березова Медицинского института РУДН.

Присутствовало на заседании 34 человека.

Результаты голосования: «за» – 34 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел.

«01» июня 2026 г., протокол № 0300-06-БУП-3.

Председательствующий на заседании:
Профессор кафедры биохимии
имени академика Т.Т. Березова МИ РУДН
профессор, доктор медицинских наук Д.В. Винников

Подпись Д.В. Винникова удостоверяю
Ученый секретарь ученого совета
Медицинского института РУДН Т.В. Максимова