

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию Чуб Елены Владимировны «РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ
ВИРУСА ГЕПАТИТА С ТИПА 2k/1b НА ЮГЕ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ»,
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

Гепатит С продолжает оставаться одним из наиболее серьезных хронических вирусных заболеваний, как во всем мире, так и в Российской Федерации. Несмотря на существующий прогресс в области диагностики и терапии этого заболевания инвалидизация и смертность от гепатита С достаточно высока. Дополнительной сложностью в борьбе с гепатитом С является высокая вариабельность ВГС, и существование почти сотни субтипов этого вируса. Различные субтипы ВГС вызывают гепатиты, отличающиеся характером течения, а также чувствительностью к интерфероновой терапии. С начала XXI века были описаны более десяти межгенотипных и межсубтипных рекомбинантов ВГС, которые также обладают уникальными особенностями. Задача изучения эпидемиологических свойств и молекулярно-биологических характеристик рекомбинантных вариантов ВГС особенно важна, так как полученные данные позволят точнее осуществлять диагностику и эффективнее проводить терапию гепатита С, с учетом особенностей индивидуальных изолятов. В связи с этим, особенную актуальность представляет диссертационная работа Елены Владимировны Чуб, посвященная изучению рекомбинантных вариантов вируса гепатита С типа 2k/1b на юге западной Сибири.

Диссертация Е.В. Чуб написана по традиционному плану, состоит из Введения (7 стр.) и трех глав: Обзор литературы (35 стр.), Материалы и методы (24 стр.), Результаты и обсуждение (33 стр.). Также содержит Заключение (4 стр.), Выводы (2 стр.) и Список литературы (17 стр., 176 ист.).

Во Введении обосновывается актуальность темы, описываются проблемы диагностики и терапии гепатита С, ограничения существующие у имеющихся систем определения генотипа ВГС, особенности рекомбинантных изолятов.

Формулируются цели и задачи исследования, приводится научная новизна и практическая ценность, которая не оставляет сомнений. Далее перечисляются положения, выносимые на защиту, даются сведения о личном вкладе автора в проделанную работу, а

также об апробации работы и имеющихся у автора публикациях. Автором опубликованы в соавторстве 3 работы в отечественных и 2 в зарубежных журналах.

Глава 1 - Обзор литературы. Начинается эта глава с общих сведений о биологии ВГС, строении его генома, различной роли структурных и неструктурных белков ВГС. В этой части обзора литературы доминируют ссылки на работы начала 2000-х годов, что, однако, может объясняться пиком исследований биологии ВГС в это время. Далее следует изложение современных подходов к классификации генотипов и субтипов ВГС, а также клинических и эпидемиологических различий генотипов. После этого, естественным образом автор переходит к изложению сути рекомбинации генотипов ВГС и результатов этого процесса. Обзор литературы написан хорошим научным языком, проиллюстрирован и хорошо логически связан с последующим текстом диссертации.

Глава 2 - Материалы и методы. Приводится методология подбора пациентов различных групп с диагнозами острый (более 1000 человек) и хронический (также более 1000 человек) гепатит С. Далее в деталях описываются экспериментальные процедуры (выделение РНК, ОТ-ПЦР, секвенирование). Приводятся разработанные в результате работы олигонуклеотиды для тест-системы на рекомбинантные субтипы ВГС. Содержатся выравнивания нуклеотидных последовательностей гена NS2. Завершают обзор литературы сведения об инструментах информационной биологии (ClustalW, MEGA, PHYLIP, BEAST), которые применял автор.

Обширный клинический материал и современные методы свидетельствуют о высоком уровне проведенных исследований.

Глава 3 - Результаты и обсуждение. Доботно написанный и прекрасно проиллюстрированный раздел. Еленой Владимировной были проведены обширные эпидемиологические исследования. В результате бивариантного анализа были выявлены статистически значимые факторы риска: внутривенное употребление наркотиков ($n=1043$, $OR=12,5$), интраназальное употребление наркотиков ($OR=3,9$), пребывание пациента в наркологической или психиатрической больнице ($OR=4,6$). Риск серопозитивности по маркерам ВГС был повышен у людей, делавших татуировки в период 6 мес. до начала заболевания ($OR=2,1$), имевших половые контакты с более, чем с одним половым партнером (за тот же период времени). Среди оцененных нозокомиальных факторов статистически значимый эффект ($OR=3,6$) был выявлен для гемотрансфузий. Получена

крайне интересная информация по профессиональным группам риска, ими оказались врачи ($n=894$, $OR=2,4$) и лица, контактирующие с человеческой кровью на рабочем месте ($OR=1,8$). Автором было проанализировано генотипическое разнообразие ВГС среди пациентов г.Барнаул. Было выявлено преобладание генотипа 1b среди медработников (91,6%). Впервые в нашем регионе Еленой Владимировной с соавторами были обнаружены пациенты с рекомбинантным вирусом типа 2k/1b.

В связи с тем, что классическая ПЦР диагностика субтипов ВГС основана на 5' UTR регионе генома вируса, рекомбинантные типы вируса 2k/1b ошибочно определяются в клинической практике как 2k субтип. Это может приводить к неверному выбору терапевтических схем, так как 2k/1b рекомбинант имеет ген NS5a от 1b генотипа, а, следовательно, обладает повышенной устойчивостью к интерфероновой терапии. Чтобы восполнить этот пробел, Еленой Владимировной была разработана ПЦР система для определения рекомбинантных изолятов ВГС. Достоинством этой системы является определение рекомбинантного изолята по длине ампликона, без необходимости секвенирования. Это, безусловно, сделает более легким внедрение системы в клинический обиход (остается надеяться, что это скоро произойдет). Используя полученную систему, Елена Владимировна проанализировала 581 образец сыворотки от больных гепатитом С, и обнаружила еще 5 рекомбинантных изолятов 2k/1b. Для одного из вновь выявленных изолятов был полностью отсеквенирован геном, еще у четырех были определены последовательности генов Core, E1, NS2, NS5b. Далее автором проводилось филогенетическое сравнение выявленных изолятов 2k/1b с описанными ранее. Было обнаружено значительное филогенетическое родство всех 2k/1b изолятов, что указывает на единого общего предка — т. е. одно рекомбинационное событие в прошлом. Дата этого события, определенная Еленой Владимировной байесовским методом датирования, лежит в диапазоне 1957-1970 гг.

Высоко оценивая научный уровень и практическую значимость проведенных Еленой Владимировной исследований, тем не менее, хотелось бы сделать некоторые замечания:

- В статье Raghwanі с соавторами (Raghwanі J et al., 2012) также проводилось филогенетическое исследование и датирование 2k/1b изолятов, однако время возникновения 2k/1b типа оценивается как более раннее — между 1923 и 1956 годами. Елена Владимировна не указывает об этих результатах зарубежной группы, хотя и ссылается на указанную публикацию. Было бы уместно обсуждение

того факта, что время возникновения 2k/1b определенное Еленой Владимировной и Raghwanі с соавторами расходится.

- Ощущается некоторый недостаток клинических данных о течении болезни у тех пациентов, в сыворотке которых Еленой Владимировной был обнаружен 2k/1b рекомбинантный вирус.
- Есть также замечание к оформлению нуклеотидных выравниваний — в настоящее время общепринятым является указание всех нуклеотидных позиций, даже гомологичных, а не замена их точками. Гомологичные нуклеотидные позиции при этом выделяются цветом. Такой тип оформления выравниваний более удобен для восприятия, и является стандартом в ведущих журналах.

Перечисленные замечания, однако, нисколько не снижают научной ценности диссертационной работы.

Результаты диссертационной работы Елены Владимировны Чуб суммированы в 6 выводах, которые полностью и объективно отражают суть проведенного исследования.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Научная новизна полученных результатов, и их практическая значимость очевидны.

Впервые на территории Сибири были выявлены случаи инфицирования рекомбинантной формой CRF01_1b2k ВГС. Подтверждена точка рекомбинации в последовательности гена NS2. Проведены сравнительные годовые исследования структуры генотипов ВГС, в клинических образцах собранных в 2005-2014г. в г.Новосибирске. Было показано близкое филогенетическое родство между 1b/2k изолятами из разных географических точек. Показана общность происхождения изолятов типа 1b/2k и их широкая циркуляция на территории России. Методом молекулярных часов показано, что наиболее вероятное время появления рекомбинантной формы CRF01_1b2k в интервале 1957-1970гг.

Разработанная Еленой Владимировной система детекции 1b/2k рекомбинантных изолятов является простой и крайне востребованной для практического применения.

Заключение

Диссертационная работа Елены Владимировны по объему, новизне, актуальности, достоверности данных, обоснованности выводов и уровню публикаций, полностью соответствует п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», а её автор, Елена

Владимировна Чуб, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент,

к.б.н., с.н.с. лаборатории иммуногенетики
ИМКБ СО РАН



Кулемзин С.В.

Кулемзин Сергей Викторович, ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии,
СО РАН.

г.Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева 8/2.

тел (383)363-90-72, e-mail: skulemzin@mcb.nsc.ru

Подпись с.н.с. лаборатории иммуногенетики ИМКБ СО РАН Кулемзина Сергея Викторовича удостоверяю:

Ученый секретарь ИМКБ СО РАН к.б.н.



Кокоза Е.Б.