

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора, члена-корреспондента РАН Михайлова Михаила Ивановича на диссертационную работу Елпаевой Екатерины Александровны на тему: «Генетические варианты вируса гепатита В, циркулирующего на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

**Актуальность.** Диссертационная работа Елпаевой Екатерины Александровны посвящена изучению и характеристике генетических вариантов вируса гепатита В, циркулирующего на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области. На сегодняшний день не смотря на развитую программу вакцинации гепатит В остается одной из важнейших проблем человечества – большое количество больных острым гепатитом В, огромное число пациентов с хроническим гепатитом и бессимптомных «носителей» вируса гепатита В (ВГВ), прогрессирование гепатита в цирроз и гепатоцеллюлярную карциному. Широкое применение лекарственных препаратов на основе аналогов нуклеоз(т)идов с одной стороны открыло перспективу излечения от гепатита В, но с другой ускорило эволюцию вируса, благодаря чему все чаще стали регистрироваться случаи резистентности ВГВ к данным препаратам. Исследование мутантных форм ВГВ как до терапии, так и при неэффективной схеме лечения способствует решению не только практических задач, но и фундаментальных вопросов вирусологии.

**Степень обоснованности научных положений и выводов** не вызывает сомнений. Они базируются на комплексном использовании адекватных поставленным задачам современных методов молекулярной биологии и вирусологии. Для разработанного соискателем метода определения мутаций устойчивости были определены основные показатели, характеризующие диагностические наборы, такие как специфичность и чувствительность. Полученные результаты были критически анализированы

и обоснованы с учетом существующих в современной литературе сведений. Выводы и научные положения логично вытекают из результатов исследования и являются корректными.

**Оценка новизны и достоверности.** Наряду с разработкой метода выявления мутации устойчивости к противовирусной терапии (rtM204I/V), соискателем изучалась популяция ВГВ в отдельном организме хозяина с использованием современной технологии глубокого секвенирования (NGS). Достоверность обусловлена статистическим анализом данных, полученных в процессе проведения исследования.

**Практическая значимость.** Результаты научных исследований имеют важное прикладное значение для прогнозирования тяжести течения заболевания и эффективности противовирусной терапии. Разработка быстрых и точных методик для диагностики и мониторинга мутаций устойчивости вируса найдет применение в клинической медицине при выборе противовирусного терапевтического средства для лечения хронического гепатита В у пациентов. Разработанный метод определения мутаций устойчивости в YMDD-мотиве полимеразы может быть использован в качестве основы для создания диагностической тест-системы.

**Общая характеристика работы.** Диссертация Елпаевой Е.А. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, раздела собственных исследований и их обсуждений, заключения, выводов и списка литературы, включающего 206 источников. Работа хорошо иллюстрирована 14 таблицами и 16 рисунками, которые существенно облегчают восприятие материала.

Во введении отмечена актуальность темы и степень разработанности проблемы, поставлены цели и задачи работы, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, приведены положения, выносимые на защиту и вклад автора в выполнение данного исследования. Обзор литературы изложен на 30 страницах и разделен на четыре раздела. В



первом разделе рассмотрены общие вопросы молекулярной биологии вируса гепатита В (ВГВ). Подробно описаны организация генома и основные этапы жизненного цикла вируса, а также стадии и серологические маркеры ВГВ-инфекции. Во втором разделе проанализированы молекулярные варианты ВГВ. Показано, что генотип ВГВ является одним из наиболее важных факторов, влияющих на тяжесть течения болезни, эффективность противовирусного лечения и вероятность развития цирроза и ГЦК. Рассмотрены мутации в геноме ВГВ, определяющие устойчивость к противовирусным препаратам, снижение синтеза вирусных белков и прогрессирование патологических процессов в печени. Третий раздел посвящен диагностике вируса гепатита В. В четвертом разделе затронуты вопросы вакцинопрофилактики.

Раздел «Материалов и методы» содержит исчерпывающую информацию обо всех этапах выполнения работы. Автором описаны использованные стандартные биохимические, вирусологические, микробиологические, молекулярно-биологические и иммунологические методы, а также основные стадии при разработке оригинального метода для определения замены в YMDD-мотиве полимеразы.

Глава собственных результатов исследований, полученных соискателем, разделена на две части. Первый раздел посвящен исследованию эпидемиологической обстановки в Северо-Западном регионе, на примере Санкт-Петербурга и Петрозаводска. Автором показано изменение частоты встречаемости генотипов ВГВ в данных регионах в период с 2008 по 2014 годы в сравнении с периодом 2002 - 2006 годов. Отмечено, что несмотря на превалирование ВГВ генотипа D в Северо-Западном регионе, отражающее адекватность применяющихся в данном регионе вакцин, увеличение циркуляции ВГВ генотипа А, определяющего субтипы adw и ауw, в Санкт-Петербурге и ЛО за последние годы требует дальнейшего мониторинга для исключения возможного снижения эффективности вакцинации.

Второй раздел посвящен выявлению мутантных форм ВГВ у пациентов с хроническим гепатитом В, получавших терапию аналогами нуклеозидов. Выявление мутаций в геноме вируса выполнено различными методами молекулярной биологии: секвенирование методом Сенжера, ПЦР в реальном времени и глубокое секвенирование нового поколения (NGS). Показано, что выявление аминокислотных замен, которые приводят к появлению устойчивости к противовирусным препаратам, имеет важное практическое значение для прогнозирования эффективности терапии. Разработанный автором метод обнаружения мутаций устойчивости ВГВ rtM204I/V к АН при помощи ПЦР в реальном времени показал высокую специфичность и чувствительность и может быть применен в качестве быстрого и точного инструмента для первичного скрининга пациентов с ХГВ, не отвечающих на лечение.

В целом, представленная диссертация выполнена на высоком научно-техническом уровне и представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную на актуальную тему, связанную с изучением и характеристикой «мутантных» форм вируса гепатита В.

Результаты диссертационной работы, выносимые на защиту, прошли достаточную апробацию на 12 научно-технических конференциях, в том числе с международным участием, и опубликованы в 13 научных трудах соискателя, включая 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Личный вклад в проведенных исследованиях показывает хорошую теоретическую подготовку, практические навыки работы с современным оборудованием, математическая и компьютерная эрудиция.

Краткое изложение глав диссертационной работы, основные выводы и результаты, представленные в автореферате, полностью отражают содержание диссертации.

**Замечания.** Некоторые неточности и опечатки, допущенные в представленной работе, не имеют принципиального значения и не влияют на ее высокий уровень и качество.

**Заключение.** На основе анализа диссертации, автореферата и опубликованных автором работ можно считать, что по актуальности, практической и теоретической значимости диссертационная работа Елпаевой Е.А. является законченным научным исследованием и полностью отвечает требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Соискатель Елпаева Екатерина Александровна заслуживает ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

24 февраля 2016г.

Член-корреспондент РАН,  
профессор, д.м.н

Михайлов М.И.

Подпись М.И. Михайлова заверяю  
Ученый секретарь  
ФГБНУ ИПВЭ им. М.П. Чумакова



Амон Е.П.

Михайлов Михаил Иванович – член-корреспондент РАН, профессор, д.м.н., директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова» 142782, Россия, город Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита, 27 км Киевского шоссе  
+ 7 (495) 841-90-07  
institute@poliomyelit.ru