

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Колотвина Андрея Васильевича «Прогностическая значимость генетического полиморфизма патогена и хозяина для оценки эффективности терапии и развития фиброза печени при хроническом гепатите С», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Диссертационная работа А.В. Колотвина представляет собой ассоциативное исследование, направленное на установление взаимосвязи между генетическим полиморфизмом вируса гепатита С (ВГС), полиморфизмами генов-кандидатов человека, с одной стороны, и тяжестью течения заболевания хроническим гепатитом С и эффективностью терапии, с другой. Актуальность работы определяется непрекращающейся эпидемией вирусного гепатита С, высокой полиморфностью вируса, недостаточной изученностью факторов вируса и пациента, влияющих на скорость патогенеза вирусного гепатита и эффективность противовирусного лечения. Отечественные исследования подобного характера малочисленны, а данные зарубежных работ зачастую противоречивы, что связано, в том числе, с этнической неоднородностью изучаемых групп пациентов.

В этой связи полностью оправданным представляется выбор цели предпринятого А.В. Колотвиным исследования, направленного на определение прогностической значимости генетического полиморфизма ВГС и ряда генов, регулирующих иммунитет, воспаление и ответ на окислительный стресс при хроническом ВГС для прогноза эффективности терапии и скорости развития фиброза печени у пациентов восточнославянского происхождения. В задачи работы входила относительная оценка прогностической значимости вирусных факторов (генотип/субтип, репликативная активность и набор генетических вариантов по 1-му гипервариабельному региону белка Е2) и факторов хозяина (полиморфизм генов цитокинов, гемохроматоза и эндотелиальной дисфункции) в прогрессировании ХГС и формирования ответа на ПВТ.

Структура работы традиционна. Диссертация состоит из введения, четырех глав, включающих: обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, выводов. Список литературы насчитывает 24 отечественных и 243 зарубежных источников. Работа изложена на 173 страницах текста, иллюстрирована 32 таблицами и 34 рисунками.

Во введении Колотвин А.В. подробно останавливается на актуальности и научной новизне темы диссертационной работы, характеризует объект и методы исследования,

формулирует цели и задачи диссертации, приводит данные о практической ценности результатов, области их применения, апробации работы и списке публикаций по теме исследования.

Обзор литературы состоит из двух частей. Первая часть посвящена характеристике ВГС и роли отдельных генов в патогенезе вирусной инфекции. Колотвин А.В. сначала приводит общие данные о строении и жизненном цикле ВГС, его таксономии, структуре и функциях отдельных вирусных белков, затем более подробно останавливается на организации генома ВГС, механизме его экспрессии, его вариабельности и таксономии, роли 5'- и 3'-НТО в регуляции репликации и трансляции вирусной РНК. В изложении этих сведений чувствуется эрудиция автора и его глубокая заинтересованность в целом ряде обсуждаемых проблем. Завершает эту главу литобзора раздел, посвященный описанию особенностей течения ВГС-инфекции при острой и хронической форме.

Вторая часть обзора посвящена характеристике значимых при ВГС генов цитокинов, гемохроматоза и ферментов, связанных с эндотелиальной дисфункцией. Колотвин справедливо указывает, что нарушение баланса продукции цитокинов Т-хэлперами играет важную роль в иммунопатогенезе ВГС. Далее соискатель приводит конкретные сведения о свойствах отдельных цитокинов и других белков, важных для патогенеза ВГС инфекции, анализирует полученные ранее литературные данные о корреляции между различными полиморфизмами этих генов и течением заболевания. Как оказалось, целый ряд полиморфизмов в генах *IL-1B*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-28B*, *TGF-β1*, *TNF-α*, *eNOS* и др. могут быть ассоциированы с такими показателями течения ВГС как стадия фиброза печени, риск развития гепатоцеллюлярной карциномы, степенью вирусной нагрузки, скоростью элиминации вируса, окислительным стрессом и т.д. В итоге А.В. Колотвин выявил 11 полиморфных локусов генов, наиболее подходящих для разработки прогностической модели развития ВГС инфекции у пациентов и наиболее эффективной стратегии их лечения. Изучение взаимосвязи между генетическим профилем пациентов по этим локусам, полиморфными особенностями генома ВГС и особенностей течения ВГС инфекции и составило предмет предпринятого соискателем исследования.

Раздел «Материалы и методы» включает подробное описание когорты пациентов, принципов их разделения на группы, клинико-anamнестических данных, вирусологических методов, молекулярно-генетических методов, приемов статистической обработки результатов. В перечень вирусологических методов в частности входило выявление РНК ВГС (и антител к вирусным антигенам – надо убрать, т.к. не включили как его данные), генотипирование вируса, определение межгенотипной рекомбинации, вирусной нагрузки, количества квазивариантных форм. Молекулярно-генетические

методики включали выделение геномной ДНК пациентов, определение аллельных вариантов генов пациентов, обработку данных различными статистическими методами и многофакторный анализ. Одно перечисление этих методов свидетельствует о высоком, разнообразном и самом современном уровне работы. Все методики описаны достаточно для их воспроизведения, наглядно документированы многочисленными иллюстрациями, убеждающими в достоверности полученных результатов.

Первая часть предпринятого Колотвиным А.В. исследования была посвящена изучению роли факторов ВГС. Было выявлено преобладание генотипов 1 и 3 и обнаружена также тенденция к постепенному увеличению встречаемости субтипа 3а. При анализе влияния факторов вируса на эффективность ПВТ было выяснено, что пациенты с первым генотипом вируса достоверно чаще не достигают устойчивого вирусологического ответа (УВО), а у больных с вирусом субтипа 3а достоверная ассоциация с результатом терапии не обнаруживалась. При этом анализ данных по вирусной нагрузке и количеству квазивариантных форм не выявил достоверных различий в двух группах пациентов.

С эффективностью ПВТ коррелировала частота встречаемости аллельных вариаций генов цитокинов *IL-1B* и *IL28*. Так, «минорный» генотип ТТ по гену *IL-1B* достоверно чаще встречался в группе пациентов, не отвечающих на терапию, по сравнению с группой больных с УВО. Для гена *IL-28* было показано, что его аллельный вариант ТТ в локусе rs8099917 достоверно чаще встречался в группе с УВО, при этом при появлении хотя бы одной «G»- аллели вероятность достижения УВО снижалась. Результаты терапии слабо коррелировали с наличием различных аллельных вариантов полиморфных локусов генов цитокинов *IL-6*, *IL-10*, *TGF-B1* и *TNF-A*, а также генов NO-синтазы и субъединицы НАДФ-оксидазы и гена гемахроматоza.

Обобщив полученные данные, Колотвин А.В. пришел к выводу, что для больных восточнославянского происхождения неблагоприятный результат ПВТ ассоциирован со следующими факторами патогена и хозяина: инфицированием ВГС первого генотипа, отсутствием у пациента аллельных вариантов СС и ТТ по локусам rs12978860 и rs8099917 гена *IL-28B* и наличием генотипа ТТ в локусе (-511) гена *IL-1B*.

Иная картина наблюдалась при анализе влияния генетических факторов ВГС и хозяина на развитие фиброза печени (ФП). Была обнаружена достоверно значимая ассоциация между вирусом субтипа 3а и медленной скоростью развития ФП, и субтипом 2а – и умеренной скоростью. С высокой, умеренной и медленной скоростью развития ФП коррелировали и определенные полиморфизмы генов *IL1-B*, *TNF-A*, *TGF-B1*, *p22phox*. Сопоставление полученных данных позволило автору выявить предикторы формирования цирроза печени у больных восточнославянского происхождения.

Итак, целый ряд вирусных факторов и ОНП генов-кандидатов пациентов по данным Колотвина А.В. влияют на эффективность ПВТ и скорость ФП. А каков будет эффект от сочетания значимых ОНП по изучаемым генам и вирусным факторам? На этот вопрос Андрей Васильевич постарался ответить, построив прогностическую модель, основанную на многофакторной статистической обработке с системой условных баллов. Модель наглядно демонстрирует негативное влияние минорных аллелей генов *IL-1B*, *IL-28* на эффективность ПВТ независимо от генотипа вируса.

Для прогнозирования скорости ФП также была создана модель, учитывающая ОНП генов *TNF-A* и *HFE*. С появлением хотя бы одной минорной аллели по этим генам количество условных баллов увеличивалось, также как и вероятность быстрого ФП. Модель показала, что для вирусов обоих исследованных субтипов (3а и 1b) гетерозиготность по данным аллелям приводит к быстрому развитию ФП. При многофакторном анализе была также выявлена ассоциация высокой скорости ФП с инфицированием ВГС субтипов 2а и 3а и наличием в геноме пациентов аллельной вариацию ТТ гена *IL-1B*, а также при сочетании любого субтипа вируса с генотипом GA гена *TNF-A*.

В главе «Обсуждение результатов» Колотвин А.В. весьма обстоятельно анализирует полученные экспериментальные данные и сопоставляет их с данными других авторов. Выявленные различия Колотвин А.В. склонен относить к этническим особенностям исследованных групп пациентов. Нам представляется, что причиной расхождений могут быть и различия в численности исследованных когорт пациентов.

Замечания по диссертационной работе Колотвина А.В. незначительны и касаются в основном наличия в работе отдельных неудачных выражений, мелких опечаток. Качество некоторых иллюстраций также могло бы быть улучшено.

Высказанные замечания, впрочем, носят рекомендательный характер и ни в коей мере не снижают значимости предпринятых диссертантом усилий и полученных результатов.

Подводя итог анализу диссертации А.В. Колотвина, следует заключить, что работа, несомненно, является увлекательным и оригинальным экспериментальным исследованием, выполненным на высоком методическом и теоретическом уровне.

Автором впервые изучено комбинированное влияние генетических факторов ВГС и ОНП генов пациента на эффективность ПВТ и развитие ФП у пациентов восточнославянского происхождения. В результате впервые установлена ассоциация определенных аллельных вариантов генов *IL-28B* и *IL-1B*, сочетания субтипа вируса и аллельных вариантов генов *IL-1B*, *IL-28B*, *TNF-A*, *HFE* с этими параметрами.

Предложенная автором прогностическая модель с количественной оценкой данных по полиморфным локусам генов пациента и генотипу/субтипу вируса позволяет рассчитать вероятность достижения УВО при стандартной двойной терапии и является определенным этапом в развитии современного персонафицированного подхода к терапии пациентов с ХГС.

Результаты диссертации доложены на представительных конференциях и отражены в публикациях в ведущих отечественных журналах. Их достоверность, а также обоснованность выводов работы не вызывают сомнения. Автореферат диссертации А.В. Колотвина соответствует требованиям ВАК РФ и полностью отражает содержание диссертационной работы.

Таким образом, диссертационная работа по актуальности, объему выполненных исследований, методическому уровню, научной новизне и практической значимости полностью отвечает требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, утвержденных постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор, Колотвин Андрей Васильевич, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология .

Ведущий научный сотрудник
Центра "Биоинженерия", к.б.н.
Личную подпись М.А.Эльдарова заверяю

М.А.Эльдаров

Ученый секретарь Центра «Биоинженерия» РАН
К.б.н.

« _____ » 2014 года



Н.Г.Степанова