

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, доцента, члена-корреспондента НАН Беларуси БАРАНОВА Олега Юрьевича на диссертационную работу ЛОЛОМАДЗЕ Елены Анатольевны на тему «Вертикальная передача и динамика вирусной нагрузки *Torque teno virus* в постнатальном периоде», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.8 Клиническая лабораторная диагностика

Актуальность темы выполненной работы

TTV (*Torque teno virus*) представляет собой безоболочечный вирус, геном которого представлен кольцевой одноцепочечной антисмысловой цепью ДНК размером от 3,6 до 3,9 тыс. н. о. Геном вируса содержит три открытые рамки считывания (ORF): ORF1, ORF2 и ORF3, а также высококонсервативную нетранслируемую область. Открытые рамки считывания кодируют полипептиды размером ≈ 500 (ORF1) – белок капсида, 100 (ORF2) и 200 (ORF3) а. о. Согласно международной классификации (ICTV) TTV относится к роду *Alphatorquevirus* семейства *Anelloviridae*. Классификация вируса была основана на результатах анализа ORF1-региона. При этом, критерием выделения его в качестве отдельного вида явилось отличие нуклеотидной последовательности более чем на 35 %. К настоящему времени TTV разделены на пять генетических групп с отличиями в нуклеотидной последовательности как минимум на 50 %, описаны 29 видов TTV. Кроме того, в состав семейства *Anelloviridae* входит род *Betatorquevirus* (12 видов *Torque teno mini virus* — TTMV, первое сообщение в 2000 г.) и род *Gammatorquevirus* (15 видов *Torque teno midi virus* — TTMDV, первое сообщение в 2007 г.). Геномы TTMV и TTMDV несмотря на отличия сохраняют значительное сходство с TTV.

В многочисленных исследованиях показано, что TTV содержится в сыворотке крови и передается при трансфузиях крови и ее компонентов. В руководстве ВОЗ рекомендовано проводить выявление вирусов TTV в сыворотке молекулярно-генетическими методами. Используя данные подходы, ДНК TTV была обнаружена в различных органах, тканях и биологических образцах, таких как слюна, моча, пот, слезная жидкость, фекалии, печень, желчь, секрция шейки матки, сперма, костный мозг, лимфатические узлы, мышцы, пуповинная кровь, щитовидная железа, легкие, селезенка, поджелудочная железа, почки, цереброспинальная жидкость. В связи с этим обсуждается возможность фекально-орального, вертикального, антенатального и полового путей передачи вируса. Тем не менее показано, что вирусная нагрузка выше в костном мозге, легких, печени, чем в сыворотке того же пациента (нижний лимит детекции — 10^2 – 10^3 копий в 1 мл плазмы крови), что затрудняет обнаружение TTV методом ПЦР. Вследствие высокой изменчивости нуклеотидной последовательности вирусных изолятов, разработка универсального набора праймеров для диагностики всех существующих TTV-генотипов является затруднительной. Также важным требованием, предъявляемым к используемым протоколам диагностики, является их высокая чувствительность и воспроизводимость для получения сходных результатов анализа между лабораториями. Показано, что обнаружение ДНК TTV с помощью ПЦР зависит от структуры праймеров, сконструированных к консервативным или гипервариабельным участкам генома. Использование праймеров к некодирующим

консервативным регионам, как правило, позволяет уменьшить число ложно отрицательных результатов диагностики по сравнению с праймерами, расположенными в кодирующих областях.

Среди методов количественной оценки содержания ДНК TTV ddPCR (цифровая капельная ПЦР), характеризуется наибольшей воспроизводимостью по сравнению с протоколами ПЦР в реальном времени, результаты которых могут в значительной степени различаться между лабораториями. Кроме того, рядом авторов высказаны предположения о существовании TTV-специфичных антител, что в свою очередь послужило основой для разработки иммунологического анализа с использованием ORF1 или ORF2 пептидов. Однако традиционные молекулярно-генетические методы не в полной мере подходят для проведения широкомасштабных исследований или эпидемиологического мониторинга, так как получаемые отрицательные результаты диагностики зачастую являются спорными, что может быть обусловлено как низкой чувствительностью анализа, так высоким генетическим разнообразием вирусов. Все это обуславливает актуальность исследований по совершенствованию подходов диагностики TTV-инфекции.

По данным многочисленных исследований установлена широкая распространенность TTV среди населения многих регионов мира. Столь высокая распространенность делает TTVs космополитным паразитом, что указывает на существование механизмов уклонения данных вирусов от иммунной системы. До настоящего времени патогенность TTV остается предметом дискуссий. С момента открытия TTV проводились исследования ассоциации с различными заболеваниями, такими как гепатит, рак, гематологические и аутоиммунные расстройства, однако прямых доказательств взаимосвязи пока обнаружено не было.

Выявление в течение длительного времени ДНК ТТ-вируса в сыворотке крови пациентов на фоне сохранных показателей морфофункциональной целостности печени указывает на существование бессимптомного носительства. В то же время показано, что наличие TTV осложняет течение хронического вирусного гепатита С, ускоряет прогрессирование фиброза печени, чаще приводит к развитию гепатоцеллюлярной карциномы. Некоторые исследователи отмечают значимую связь тяжести заболевания печени с выявлением TTV как в виде моноинфекции, так и коинфекции с вирусом гепатита В у пациентов с циррозом, которым проводилась трансплантация печени. По некоторым данным репликация TTV отражает функциональность иммунной системы. Уровень TTV-ДНК в сыворотке резко возрастает у пациентов, перенесших трансплантацию органов, предположительно, в результате иммуносупрессии. В литературе также представлены исследования, в которых обсуждается применение TTV в качестве биомаркера для определения состояния иммуносупрессии у пациентов, перенесших трансплантацию легких, для оценки риска инфекционных осложнений и острых отторжений. В последнее время появились сообщения об ассоциации TTV с сахарным диабетом 2 типа и раком молочной железы. Также изучается связь генетических дефектов врожденного иммунитета и величины вирусной нагрузки TTV. Перспективным является изучение TTV с целью выявления особенностей сочетанных инфекций (микст-инфекций), клинические особенности которых недостаточно описаны в литературных источниках.

Изучение TTV находится на стыке многих клинических и фундаментальных дисциплин и представляет интерес для многих специалистов. Обобщение и систематизация имеющихся данных важны для планирования дальнейших научных

исследований. Поэтому представленная диссертационная работа Лоломадзе Е.А., связанная с оценкой (на основании использования молекулярно-генетических подходов) трансплацентарной передачи TTV, его распространенности в постнатальном периоде, а также возможных источников заражения новорожденных, имеет особую актуальность.

Новизна исследования и полученных результатов

Результаты, представленные в работе, отличаются новизной и представляются к защите впервые. На основании большого количества экспериментальных данных молекулярно-генетической диагностики Лоломадзе Е.А. впервые продемонстрировано отсутствие трансплацентарной передачи TTV, вне зависимости от уровня вирусной нагрузки матери. Также впервые показано, что вирусная нагрузка, рассчитанная на основании количественной оценки генетического материала TTV, ребенка не зависит от вирусной нагрузки матери.

Получены новые данные об особенностях патогенеза – первые признаки пролиферации вируса обнаруживаются молекулярно-генетическими методами через 1-2 недели от рождения. Впервые показано, что наивысшие значения показателей вирусной нагрузки TTV достигаются через 3-6 месяцев с активной пролиферацией в течение первых 6-8 недель от рождения. Впервые экспериментально установлено отсутствие статистически значимой разницы в вирусной нагрузке TTV для недоношенных и доношенных детей.

В ходе исследований разработаны три тест-системы для дифференциальной количественной диагностики вирусов TTV, TTMV и TTMDV. Тест-системы внедрены в серийное производство на базе компании ООО «ДНК-Технология ТС» (Москва, РФ).

Значимость результатов, полученных в диссертации, для теории и практики

Результаты исследования имеют высокую **научную значимость** в связи с использованием системного подхода к изучению клинических и молекулярно-генетических аспектов, связанных с TTV. При этом были использованы не только методы разных наук (медицины, микробиологии, молекулярной генетики), но и в рамках одной области применялись методы, основанные на разных технологиях (ПЦР в реальном времени, электрофоретическое фракционирование, секвенирование, спектрофотометрия, биологическая статистика).

Автором на основе анализа полученных данных показано, что TTV широко распространен среди здоровых грудных детей первого года жизни, а присутствие вируса у детей не зависит от вирусной нагрузки матери. Данные результаты расширяют научные представления о механизмах репликации TTV и путях передачи этого вируса в постнатальном периоде. Кроме того, результаты исследований указывают на потенциальную взаимосвязь TTV с иммунитетом ребенка в постнатальном периоде.

Практическая значимость результатов обусловлена разработкой прототипа клиничко-диагностической базы данных пациентов, включающих результаты клиничко-лабораторного обследования пар мать-ребенок на три различных генетических варианта TTV (TTV, TTMV и TTMDV), что позволяет выявлять штаммы вирусов, обладающих более высоким потенциалом трансмиссии; разработкой и внедрением в серийное производство трех тест-систем для

дифференциальной количественной диагностики вирусов TTV, TTMV и TTMDV. При этом, разработанные тест-системы могут быть использованы для выявления клинической значимости трех основных вирусных групп семейства *Anelloviridae* в любых когортах пациентов, включая здоровых пациентов, пациентов с различными заболеваниями/осложнениями, а также беременных женщин в динамике по триместрам.

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс и используются в лекционном элективном курсе «Молекулярная биология» кафедры биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Все основные выводы и положения, вынесенные на защиту, вытекают из экспериментов, проведенных автором с использованием современных методов, адекватных поставленным задачам. Научный анализ и выводы базируются на большом объеме экспериментального материала, явившегося результатом многолетних исследований. Многоплановость работы в соответствии с требованиями современных методик и использование комплекса методов (молекулярно-генетических, микробиологических, биологической статистики, медицинской практики) для решения поставленных задач позволили получить достоверную научную информацию по изучаемым вопросам.

Оценка содержания и завершенности работы

Диссертация написана хорошим научным языком и оформлена согласно требованиям ВАК РФ. Диссертация включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы и список литературы. Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста, включает 10 таблиц и 20 рисунков. Библиографический список состоит из 210 наименований. Автореферат отражает содержание диссертации, включает все основные результаты исследования, сделанные на их основе выводы и положения, выносимые на защиту.

Во введении обоснована значимость диссертационной работы, четко определена цель и обозначены задачи исследования. Изложены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту. Обзор литературы содержит анализ имеющихся данных о механизмах передачи вирусных инфекций; роли плаценты в вертикальной передаче вирусных инфекций; факторах, способствующих проникновению вирусов через плаценту, значении диагностики вирусных инфекций в перинатальном периоде; структуре генома и филогении *Torque teno virus*, распространенности TTVs и ассоциации с заболеваниями, методах обнаружения.

Глава «Материал и методы исследования» включает клиническую характеристику пациентов, описание дизайна исследования, содержит критерии включения и критерии исключения из исследования. В главе подробно описаны клинические и лабораторные методы исследования. Статистическая обработка материала диссертации проведена с использованием современных компьютерных программ, статистические методы подобраны в соответствии с дизайном исследования.

В главе 3 изложены полученные автором результаты. На первом этапе проведена оценка вирусной нагрузки TTV у беременных женщин и исследование трансплацентарной передачи вируса от матери плоду. Анализ полученных результатов показал, что TTV не передается трансплацентарно, поскольку все образцы пуповинной крови были отрицательными независимо от вирусной нагрузки матери. На втором этапе исследований выполнено определение зависимости вирусной нагрузки TTV ребенка от вирусной нагрузки матери. Несмотря на отсутствие генотипического сравнения изолятов TTV для пар мать-ребенок, авторами, на основании данных ПЦР-РВ показано, что достоверная взаимосвязь между уровнем вирусной нагрузки TTV матери и наличием TTV у ребенка отсутствует. Также автором отдельно подчеркивается, что даже в случае прохождения вирусом трансплацентарного барьера, его концентрация в пуповинной крови крайне низка и не зависит от вирусной нагрузки TTV у матери. Третьим этапом работы явилось сравнение вирусной нагрузки TTV у недоношенных и доношенных младенцев в течение первых четырех месяцев после рождения. Проведенный анализ вирусной нагрузки TTV в течение первых недель жизни у недоношенных и доношенных детей в зависимости от способа родоразрешения и веса ребенка при рождении, показал, что первые признаки активной вирусной пролиферации наблюдаются уже через 6-8 недель. При этом статистически значимая разница в вирусной нагрузке TTV для недоношенных и доношенных детей не выявлена. Заключительным этапом исследований явилось определение динамики вирусной нагрузки TTV в течение первого года жизни здоровых детей. На основании полученных результатов было установлено, что вирусная нагрузка TTV увеличивается в течение первых месяцев жизни здоровых грудных детей, достигая плато через 3-6 месяцев с сильной пролиферацией в течение первых 6-8 недель от рождения. При этом первые признаки активной пролиферации вируса диагностируются через 1-2 недели от рождения.

В главе «Обсуждение результатов исследований» представлено обсуждение полученных результатов и известных, в том числе недавно опубликованных, отечественных и зарубежных литературных данных по проблеме. Сравнительный анализ проведен на высоком уровне и подтверждает научную ценность полученных результатов.

Выводы соответствуют сформулированной цели и поставленным задачам диссертационной работы, обоснованы, подтверждены фактическим материалом и базируются на достаточном количестве проведенных исследований, поэтому их достоверность не вызывает сомнений.

Практические рекомендации вытекают из результатов исследования, четко и логично сформулированы.

Автореферат соответствует основным положениям диссертации.

Замечания и предложения.

Замечания по диссертационной работе отсутствуют. В качестве пожеланий хотелось бы отметить следующее:

- с целью уточнения механизмов передачи и путей распространения TTV автору в будущем рекомендуется проводить также и генотипирование выявляемых изолятов вирусов;

- следует избегать термин «филогения», в случаях описания результатов локальных экспериментов, связанных со сравнением отдельных изолятов TTV,

поскольку филогенез рассматривается, как правило, как историческое развитие биологического вида.

По тексту диссертации имеются немногочисленные опечатки и неточности, так, например, на стр. 15, 61, 65 и др.

Приведенные замечания носят редакционный либо рекомендательный характер и не снижают общей высокой оценки рассматриваемой диссертационной работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа ЛОЛОМАДЗЕ Елены Анатольевны «Вертикальная передача и динамика вирусной нагрузки *Torque teno virus* в постнатальном периоде» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора биологических наук, профессора РАН РЕБРИКОВА Дениса Владимировича, содержащей решение научно-практической задачи, имеющей существенное значение для клинической лабораторной диагностики, внедрение современных молекулярно-генетических методов в практическую деятельность для дифференциальной количественной диагностики вирусов TTV, TTMV и TTMDV семейства *Anelloviridae*.

По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, а также по объему и уровню проведенного исследования диссертационная работа ЛОЛОМАДЗЕ Елены Анатольевны полностью соответствует требованиям пункта 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.8 – клиническая лабораторная диагностика.

Академик-секретарь
Отделения биологических наук
Национальной академии наук Беларуси
доктор биологических наук, доцент
03.02.07 – генетика
член-корреспондент Национальной академии
наук Беларуси
22. 02. 2023 г.



Баранов Олег Юрьевич

Адрес: Республика Беларусь, 220072 г. Минск
пр. Независимости, 66
email: biology@presidium.bas-net.by
тел.: +375 17 3180379



Личную подпись

АДЗЕЛ КАДРАВА

начальник отдела кадров Главного
управления кадров и кадровой политики
НАН Беларуси

(подпись)

22.02.2023

Баранов О Ю
(фамилия, инициалы)

(инициалы, фамилия)