

**ТОШКЕНТ ТИББИЁТ АКАДЕМИЯСИ,  
РЕСПУБЛИКА ИХТИСОСЛАШТИРИЛГАН ЭПИДЕМИОЛОГИЯ,  
МИКРОБИОЛОГИЯ, ЮҚУМЛИ ВА ПАРАЗИТАР КАСАЛЛИКЛАР  
ИЛМИЙ-АМАЛИЙ ТИББИЁТ МАРКАЗ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ  
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.04/30.12.2019.Tib. 30.01 РАҚАМЛИ  
ИЛМИЙ КЕНГАШ АСОСИДАГИ БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**РЕСПУБЛИКА ИХТИСОСЛАШТИРИЛГАН ЭПИДЕМИОЛОГИЯ,  
МИКРОБИОЛОГИЯ, ЮҚУМЛИ ВА ПАРАЗИТАР КАСАЛЛИКЛАР  
ИЛМИЙ-АМАЛИЙ ТИББИЁТ МАРКАЗИНИНГ ВИРУСОЛОГИЯ  
ИЛМИЙ-ТАДҚИҚОТ ИНСТИТУТИ**

**КАЗАКОВА ЕВГЕНИЯ ИВАНОВНА**

**ВИРУСНИНГ КОВАЛЕНТ ЁПИҚ ҲАЛҚАСИМОН ДНКСИНИ  
АНИҚЛАШ ОРҚАЛИ ГЕПАТИТ В НИНГ  
ЯШИРИН ШАКЛЛАРИНИ ТАШХИСЛАШ  
ХУСУСИЯТЛАРИ**

**03.00.04 – Микробиология ва вирусология**

**ТИББИЁТ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)  
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**ТОШКЕНТ – 2022**

**Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси**

**Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)**

**Content of dissertation abstract of the doctor of philosophy (PhD)**

**Казакова Евгения Ивановна**

Вируснинг ковалент ёпиқ ҳалқасимон ДНКсини  
аниқлаш орқали гепатит В нинг яширин шаклларини  
ташхислаш хусусиятлари..... 3

**Казакова Евгения Ивановна**

Особенности диагностики скрытых форм  
гепатита В путем определения ковалентно замкнутой кольцевой  
ДНК вируса ..... 19

**Kazakova Evgeniya Ivanovna**

Diagnostic features of occult form of hepatitis B by determining  
circular covalently closed DNA of the virus..... 35

**Эълон қилинган ишлар рўйхати**

Список опубликованных работ  
List of published works..... 38

**ТОШКЕНТ ТИББИЁТ АКАДЕМИЯСИ,  
РЕСПУБЛИКА ИХТИСОСЛАШТИРИЛГАН ЭПИДЕМИОЛОГИЯ,  
МИКРОБИОЛОГИЯ, ЮҚУМЛИ ВА ПАРАЗИТАР КАСАЛЛИКЛАР  
ИЛМИЙ-АМАЛИЙ ТИББИЁТ МАРКАЗ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ  
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.04/30.12.2019.Тиб. 30.01 РАҚАМЛИ  
ИЛМИЙ КЕНГАШ АСОСИДАГИ БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**РЕСПУБЛИКА ИХТИСОСЛАШТИРИЛГАН ЭПИДЕМИОЛОГИЯ,  
МИКРОБИОЛОГИЯ, ЮҚУМЛИ ВА ПАРАЗИТАР КАСАЛЛИКЛАР  
ИЛМИЙ-АМАЛИЙ ТИББИЁТ МАРКАЗИНИНГ ВИРУСОЛОГИЯ  
ИЛМИЙ-ТАДҚИҚОТ ИНСТИТУТИ**

**КАЗАКОВА ЕВГЕНИЯ ИВАНОВНА**

**ВИРУСНИНГ КОВАЛЕНТ ЁПИҚ ҲАЛҚАСИМОН ДНКСИНИ  
АНИҚЛАШ ОРҚАЛИ ГЕПАТИТ В НИНГ  
ЯШИРИН ШАКЛЛАРИНИ ТАШХИСЛАШ  
ХУСУСИЯТЛАРИ**

**03.00.04 – Микробиология ва вирусология**

**ТИББИЁТ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)  
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**ТОШКЕНТ – 2022**

**Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2018.2PhD/Tib608 рақам билан рўйхатга олинган.**

Диссертация Республика ихтисослаштирилган эпидемиология, микробиология, юкумли ва паразитар касалликлар илмий-амалий тиббиёт марказининг Вирусология илмий-тадқиқот институтида бажарилган.

Диссертация автореферати икки тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифанинг ([www.tma.uz](http://www.tma.uz)) ҳамда «Ziynet» Ахборот таълим порталида ([www.ziynet.uz](http://www.ziynet.uz)) жойлаштирилган.

**Илмий раҳбар:**

**Жураев Ривожиддин Хафзуллаевич**  
тиббиёт фанлари доктори

**Расмий оппонентлар:**

**Шадманова Наргиза Абитовна**  
тиббиёт фанлари доктори, доцент

**Хегай Татьяна Рудольфовна**  
тиббиёт фанлари доктори, профессор

**Етакчи ташкилот:**

**Федерал бюджет илмий муассасасининг  
Екатеринбург вирусли инфекциялар илмий-  
тадқиқот институти**

Диссертация ҳимояси Тошкент тиббиёт академияси, Республика ихтисослаштирилган эпидемиология, микробиология, юкумли ва паразитар касалликлар илмий-амалий тиббиёт марказ ҳузуридаги DSc.04/30.12.2019.Tib.30.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2022 йил «4» апрел соат 13<sup>00</sup> даги мажлисида бўлиб ўтади. (Манзил: 100109, Тошкент ш., Фаробий кўчаси, 2-уй. Тошкент тиббиёт академияси 1-ўқув биносининг мажлислар зали. Тел./факс: +99878-150-78-25, e-mail: tta2005@mail.ru).

Диссертация билан Тошкент тиббиёт академияси Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (№ 820 рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100109, Тошкент ш., Фаробий кўчаси, 2-уй. Тел./факс: (+99878) 150-78-14.

Диссертация автореферати 2022 йил «4» апрел кuni тарқатилди.

(2022 йил «4» апрел даги 5 - рақамли реестр баённомаси).



**Л.Н. Туйчиев**

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаши асосдаги бир марталик илмий кенгаш раиси, тиббиёт фанлари доктори, профессор

**Н.У. Таджиева**

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаши асосдаги бир марталик илмий кенгаш илмий котиби, тиббиёт фанлари доктори, доцент

**Н.С. Атабеков**

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаши асосдаги бир марталик илмий семинар раиси, тиббиёт фанлари доктори

## КИРИШ (фалсафа доктори (PhD) диссертация аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурияти. Сурункали вирусли гепатит В (СВГВ) ва унинг HBsAg манфий бўлган беморлар гепатоцитларида гепатит В вирусининг ДНКси сақланиши билан ифодаланувчи яширин шакли дунё миқёсида долзарб муаммолардан бири бўлиб қолмоқда. Вирусли гепатит В нинг яширин кечиши жигар циррози ва гепатоцеллюляр карцинома каби асоратларнинг ривожланишига олиб келади. ЖССТ нинг маълумотларига кўра, 2015 йилда «...вирусли гепатитлар туфайли 1,34 миллион киши вафот этган. 2015 йилда вирусли гепатит туфайли кузатилган ўлимларнинг асосий қисми сурункали жигар касаллиги (цирроз туфайли 720 000 ўлим ҳолати) ва бирламчи жигар саратони (гепатоцеллюляр карцинома туфайли 470 000 ўлим ҳолати) билан боғлиқ. 2015 йилда бутун дунё бўйлаб 257 миллионга яқин одам сурункали вирусли гепатит В инфекцияси билан яшаган...»<sup>1</sup>. Ҳозирги кунда «...ВГВ яширин шаклининг тарқалиши турли мамлакатларда 1% дан 87% ни ташкил этади. ВГВ яширин шаклининг В ва С генотиплари Хитойда 45,5%, Жанубий Кореяда С2 генотипи 1,7%-6,6% тарқалган...»<sup>2</sup>. Шу жиҳатдан, вирусли гепатит В яширин шаклининг ташхисот усуллари ишлаб чиқиш ва такомиллаштириш амалий тиббиётнинг устувор йўналишларидан бири бўлиб қолмоқда.

Жаҳонда юқори технологияларнинг ривожланиши туфайли улардан фойдаланиш имкониятлари янада қулайроқ бўлиб бормоқда. ВГВ нинг яширин шаклини ташхислаш учун гепатоцитга интегрирланган гепатит В вируси геномининг қисмини ПЗР усулида аниқлаш имконияти пайдо бўлди. Ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКни фақат гепатоцитларда аниқлаш мумкин ва бу оккульт гепатит В ташхисини қўйиш учун асосий ташхисот маркери ҳисобланади. Бу борада, амалий соғлиқни сақлаш ва вирусли гепатит В нинг олдини олиш учун яширин шаклдаги беморларни аниқлаш муҳим аҳамият касб этади.

Мамлакатимизда соғлиқни сақлаш тизимини такомиллаштириш бўйича кенг қамровли тадбирлар амалга оширилмоқда, жумладан, юқумли ва юқумли бўлмаган касалликларнинг олдини олишга алоҳида эътибор қаратилмоқда ва соғлиқни сақлаш тизимида кенг қамровли дастурий тадбирлар амалга оширилмоқда. Бу борада Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 20 июндаги ПҚ-3071-сон «Ўзбекистон Республикаси аҳолисига 2017-2021 йилларда ихтисослаштирилган тиббий ёрдам кўрсатишни янада ривожлантириш чоратадбирлари тўғрисида» ги қарорига мувофиқ, аҳолига тиббий хизмат кўрсатиш даражасини янги босқичга кўтаришда «...аҳолига сифатли тиббий хизматдан фойдаланишни кенгайтириш, уларга ихтисослаштирилган ва юқори технологияларга асосланган тиббий ёрдам кўрсатиш...»<sup>3</sup> вазифалари белгиланган.

<sup>1</sup> WHO Global hepatitis report, 2017; [www.who.int/publications/i/item/global-hepatitis-report-2017](http://www.who.int/publications/i/item/global-hepatitis-report-2017); p.10

<sup>2</sup> Manoochehr Makvandi. Update on occult hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol. 2016. - Oct 21; 22(39): 8720–8734.

<sup>3</sup> Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 20 июндаги «Ўзбекистон Республикаси аҳолисига 2017–2021 йилларда ихтисослаштирилган тиббий ёрдам кўрсатишни янада ривожлантириш чоратадбирлари тўғрисида»ги ПҚ–3071-сон Қарори.

Ушбу вазифаларни амалга оширишда юқумли касалликларни ташхислаш ва даволаш даражасини янги босқичга кўтариш, даволашнинг замонавий усуллари ишлаб чиқиш ва тадбиқ этиш, ҳамда сифатли тиббий ёрдамда инновацион технологияларни қўллаш муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги ПФ-4947-сон Фармони, 2017 йил 29 мартдаги ПҚ-2857-сон «Ўзбекистон Республикасида бирламчи тиббий-санитария ёрдами муассасалари фаолиятини ташкил этишни янада такомиллаштириш чора-тадбирлари тўғрисида» ги ва 2017 йил 20 июндаги ПҚ-3071-сон «Ўзбекистон Республикаси аҳолисига 2017-2021 йилларда ихтисослаштирилган ва тиббий ёрдам кўрсатишни янада ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида» ги қарорлари ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

**Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига боғлиқлиги.** Тадқиқот иши Республикамизда фан ва технологиялари ривожлантиришининг VI. «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишларининг доирасида бажарилган.

**Муаммонинг ўрганилганлик даражаси.** Вирусли гепатит В нинг оккульт шаклини ташхислаш дунёда жуда кам ўрганилгандир. ГВВ нинг ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКсини фақат гепатоцитларда аниқлаш мумкин ва бу оккульт гепатит В ташхисини қўйиш учун асосий ташхисот маркери ҳисобланади (Lixia Guo. et al., 2018). Ушбу усул жуда аниқ ва юқори специфик ҳисобланади, аммо ташхисот муолажаси биопсияни қўллашни талаб этади ва стандартлаштирилган тижорат тўпламларининг йўқлиги туфайли мураккаблашади.

Турли мамлакатларда оккульт гепатит В тарқалишини баҳолашнинг кенг қўлами мавжуд. Турли маълумотларга кўра, сурункали гепатит В билан касалланган беморларнинг умумий сонига нисбатан оккульт гепатит В тарқалиши 7% дан 18% ни ташкил этади (Song E. et al., 2019; Bhatti F. et al., 2017; Yuen M. et al., 2010). Ушбу маълумотлар оккульт гепатит В билан касалланган беморлар қон зардобиди ва жигар биоптатларида гепатит В вирусининг (ГВВ) ДНК миқдори жуда паст бўлганлиги сабабли жуда кам баҳоланган. Шундай қилиб, оккульт гепатит В билан касалланган беморлар қон плазмасидаги ГВВ ДНК виремиясининг даражаси 200 ХБ/мл дан пастроқ кўрсатилган, аммо 90% дан ортиқ беморлар қон зардобиди ГВВ ДНК миқдори 20 ХБ/мл ни ташкил этади (Morales-Romero J., 2014). ГВВ ДНКсининг бундай паст даражалари ва уларнинг тебранишлари ҳатто ГВВ ДНКни таҳлил қилиш учун мавжуд стандартлаштирилган ва ўта сезгир тўпламларнинг қўлланилишига қарамасдан оккульт гепатит В ни аниқлашни қийинлаштиради.

Ўзбекистонда вирусли гепатит В нинг яширин шакллари ташхислаш илгари ўрганилмаган. Гепатит В вирусининг молекуляр-генетик хусусиятларини ва генотипларнинг тарқалишини ўрганиш бўйича маълумотлар гепатит В га қарши эмлашни жорий этиш даври билан боғлиқ бўлган айрим илмий ишларда келтирилган (Даминов Т. ва бошқалар., 2003; Таджиев Б.М. ва бошқалар., 2008;

Avazova D. et al., 2008). Аммо, ушбу тадқиқотларда ГВВнинг ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКси ўрганилмаган.

**Диссертация тадқиқотининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги.** Диссертация тадқиқоти Вирусология илмий-тадқиқот институтининг ПЗ-2017090726 «Сурункали В ва Д гепатитларнинг турли вариантлари натижасида жигар циррози ва гепатоцеллюляр карцинома ривожланиш хавфини баҳолаш ҳамда уларнинг олдини олиш, башоратлаш ва даволашнинг дифференциал ёндашув усулларини ишлаб чиқиш» (2020-2018 йй.) илмий тадқиқот ишлар режаси, шунингдек, Вирусология ИТИ ҳамда Пастер номидаги Санкт-Петербург эпидемиология ва микробиология илмий-текшириш институти ўртасидаги ҳамкорлик Меморандуми режаси доирасида бажарилган.

**Тадқиқотнинг мақсади** турли генезли гепатитлар билан касалланган беморларда вируснинг ковалент ёпиқ ҳалқасимон ДНК сини текшириш орқали гепатит В нинг яширин шаклларини ташхислаш хусусиятларини аниқлаш ҳамда касалликнинг оккульт шаклида гепатит В вирусининг молекуляр-биологик хусусиятларини таҳлил қилишдан иборат.

**Тадқиқотнинг вазифалари:**

номаълум генезли гепатитлар билан касалланган беморларда гепатит В яширин шаклининг маркери сифатида ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКни аниқлаш аҳамиятини real-time ПЗР усулини такомиллаштириш орқали баҳолаш;

гепатит В нинг яширин шакли бўлган беморлар орасида гепатит В вирусининг генотипларини аниқлаш;

гепатит В вируси субтиплари бўйича олинган нуклеотид кетма-кетликларнинг филогеник тавсифини таҳлил қилиш;

вирус фенотипи ва дориларга чидамлилиги билан боғлиқ бўлган молекуляр-генетик тавсифларнинг хусусиятларини таҳлил қилиш;

вирусли гепатит В нинг яширин шаклларини аниқлаш учун лаборатор-ташхисот алгоритминини ишлаб чиқиш.

**Тадқиқотнинг объекти** сифатида 2013-2018 йилларда Вирусология илмий-тадқиқот институти клиникасида 19-63 ёшдаги 79 нафар сурункали вирусли гепатит В, С, Д, ноаниқ этиологияли гепатитлар ташхиси қўйилган беморлар ва соғлом жигар донорлари олинган.

**Тадқиқотнинг предмети** сифатида сурункали вирусли гепатит В, С, Д, ноаниқ этиологияли гепатитлар билан касалланган беморларнинг клиник намуналари, соғлом жигар донорлари (вирусли гепатитлар маркерлари мавжудлигини аниқлаш учун қон плазмаси ҳамда гепатит В вирусининг ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКси ва Сенгер бўйича секвенирлашни амалга ошириш учун жигарнинг биопсия материали) олинган.

**Тадқиқотнинг усуллари.** Тадқиқотни амалга ошириш учун умумклиник, биокимёвий, молекуляр-биологик, инструментал ва статистик таҳлил усулларидан фойдаланилган.

**Тадқиқотнинг илмий янгилиги** қуйидагилардан иборат:

гепатит В вирусининг ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКси мавжудлигини аниқлаш учун real-time ПЗР усули такомиллаштирилган;

вирусли гепатит Внинг яширин шаклини ташхислашда гепатит В вирусининг ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКсининг ташхисий аҳамияти исботланган; ноаниқ генезли гепатитларда вирусли гепатит Внинг оккульт шакли катта улушни ташкил этиши аниқланган;

филогенетик таҳлилни амалга ошириш орқали гепатит В вируси D1, D2 ва D3 субтипларининг Pre-S1/Pre-S2/S қисмларининг нуклеотид ўхшашлиги асосланган;

вирусли гепатит Внинг яширин шакли бўлган беморлардан олинган нуклеотид кетма-кетликларда специфик мутациялар мавжудлиги исботланган.

**Тадқиқотнинг амалий натижалари** куйидагилардан иборат:

вирусли гепатит В яширин шакларини ташхислашда гепатит В вирусининг ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКни аниқлашнинг аҳамиятли роли баҳоланган;

ноаниқ этиологияли гепатитлар ҳамда С гепатити бўлган беморларда ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКни аниқлаш усулидан фойдаланиш тавсия этилган;

вирусли гепатит В нинг яширин шакларини аниқлаш учун лаборатор-ташхисот алгоритмини ишлаб чиқилган.

**Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги** диссертацияда услубий жиҳатдан тўғри назарий ёндашувлар ва усуллардан фойдаланилганлик, беморларнинг етарли сони, қўлланилган серологик, молекуляр-биологик ва статистик таҳлил усулларининг асосланганлиги, олинган маълумотларга замонавий компьютер технологияларидан фойдаланган ҳолда ишлов берилганлиги, шунингдек, вирусли гепатит Внинг яширин шакларида гепатит В вирусининг ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКси мавжудлигини аниқлашни ўрганишни баҳолаш натижасида олинган маълумотларнинг маҳаллий ва хорижий тадқиқотлар билан таққосланганлиги билан изоҳланади. Статистик усуллардан фойдаланиш натижаларининг ишончлилиги таъминланган.

**Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.** Тадқиқот натижаларнинг илмий аҳамияти шундан иборатки, тадқиқотда вирусли гепатит Внинг яширин шакларини ташхислаш усули мослаштирилган. Сўнгги йилларда вирусга қарши давони кенг қўллаш, гепатит В вирусининг мутант штаммларининг пайдо бўлишига олиб келди ва уларни тижорат тест тўпламлари ёрдамида одатий равишда аниқлаш қийиндир. Ҳозиргача бир қатор ҳолатларда вирусли гепатит В ташхисоти қийинчиликларни келтириб чиқаради, чунки касалликнинг намоён бўлиши ва кечиши жуда хилма-хилдир. Диссертация тадқиқотида ўтказилган филогенетик таҳлил ноаниқ этиологияли гепатит бўлган беморларда гепатит В вирусининг D1 субгенотиби аниқланганлигини кўрсатди ва адабиётларда бизнинг худудимизда ушбу субгенотип энг кўп учраши баён этилган.

Тадқиқот натижаларнинг амалий аҳамияти шундаки, мослаштирилган усул вирусли гепатит Внинг яширин шаклари ташхисотини амалга ошириш имконини беради. Жуда кўп миқдордаги тижорат тест тўпламлари мавжудлигига қарамай, гепатит Вни аниқлаш лаборатория ташхисоти учун мураккаб вазифадир. Гепатит В яширин шаклининг белгиси сифатида ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКни аниқлаш ташхисотда, тўғри давони танлашда ва касалликнинг



оқибатини башорат қилишда, шунингдек беморларда оғир асоратлар ривожланишининг олдини олишда муҳим усулдир. Гепатит В вирусининг ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКсини аниқлаш учун ишлаб чиқилган лаборатор-ташхисот алгоритми вирусли гепатит В нинг яширин шакллари аниқлаш имконини беради. Вирусли гепатит Внинг яширин кечишини аниқлаш инфекциянинг тарқалиши ва беморларда касалликнинг ножўя оқибатларини камайтиришга ёрдам беради.

**Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши.** Вирусли гепатит Внинг яширин шаклларида гепатит В вирусининг ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКси мавжудлигини аниқлашни ўрганиш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

Вирусли гепатит Внинг яширин шаклини ташхислашнинг модификацияланган усули бўйича олинган натижалар асосида «Вирусли гепатит Внинг яширин шаклини ташхислашнинг модификацияланган усули» номли услубий тавсияномаси тасдиқланган (Соғлиқни сақлаш вазирлигининг 2020 йил 28 февралдаги 8н-д/35-сон маълумотномаси). Натижалар номаълум этиологияли гепатит ташхиси қўйилган беморлар орасида вирусли гепатит Внинг яширин шаклини аниқлаш имконини берган;

олинган илмий тадқиқот натижалари соғлиқни сақлаш амалиётига, жумладан, Самарқанд ва Наманган вилоят юқумли касалликлар шифохоналари амалиётига жорий этилган (Соғлиқни сақлаш вазирлигининг 2021 йил 6 декабрдаги 08-09/18184-сон маълумотномаси). Тадқиқот натижалари беморларнинг ҳаёт сифатини яхшилаш, ножўя оқибатлар сонини камайтириш ва беморларга этиотроп давони буюриш имконини берган. Иқтисодий самарадорликка беморларни касалхонага ётқизиш харажатларини камайтириш ва меҳнатга лаёқатсизлик кунларини камайтириш орқали эришилган.

**Тадқиқот натижаларининг апробацияси.** Мазкур тадқиқот натижалари 4 та илмий-амалий анжуманларда, жумладан, 2 та халқаро ва 2 та республика анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

**Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги.** Диссертация мавзуси бўйича жами 9 та илмий иш чоп этилган, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертациялар асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 4 та мақола, жумладан, 1 таси республика ва 3 таси хорижий журналларда нашр этилган. Халқаро GenBank маълумотлар базасида KY210468–KY210499 рақами остида 32 та нуклеотид кетма-кетликлар депонентланган.

**Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми.** Диссертация таркиби кириш, тўртта боб, хулоса ва фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми 105 бетни ташкил этади.

## ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Диссертациянинг **кириш** қисмида тадқиқотнинг долзарблиги ва зарурияти асосланган, изланишнинг мақсади, вазифалари, объекти ва предмети ҳамда республикада фан ва технологияларни ривожлантиришнинг устувор йўналишларига мувофиқлиги келтирилган, тадқиқотнинг илмий

янгилиги ва амалий натижалари тасвирланган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга тадбиқ этиш, рўйхати, чоп этилган ишлар ва диссертациянинг тузилиши тўғрисида маълумотлар мавжуд.

Диссертациянинг «**Гепатит В вирусининг молекуляр-биологик тавсифи ҳамда вирусли гепатит Внинг яширин кечиш шакллари**» деб номланган биринчи бобида хорижий ва маҳаллий адабиётлардаги мавзуга доир манбаларнинг таҳлили ёритилган. Гепатит В вирусининг молекуляр-биологик тавсифи тўғрисидаги замонавий қарашлар, гепатит В вирусининг антиген оқсиллари, гепатит В вирусининг генотиплари, гепатит В вируси геномидаги мутациялар, шунингдек, вирусли гепатит В кечишининг яширин шакллари ҳақида маълумотлар баён этилган.

Диссертациянинг «**Текширилган беморларнинг умумий тавсифи ва қўлланилган тадқиқот усуллари**» деб номланган иккинчи бобида текширилган беморлар, жигар биопсиясида гепатит В вирусининг ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКси мавжудлигини аниқлашнинг модификацияланган усули тасвирланган, гепатит В вирусининг S ва Pol соҳаларини Сенгер бўйича секвенирлаш усули келтирилган, олинган нуклеотид кетма-кетликларда мутациялар мавжудлигининг баҳоланиши ва уларнинг филогенетик таҳлили баён этилган.

Тадқиқотни амалга ошириш учун 2013 йилнинг июл ойидан 2018 йилнинг март ойигача бўлган даврда Вирусология илмий-тадқиқот институти клиникасининг жадал даволаш бўлимига ётқизилган беморлардан олинган жигар биопсияси ва қон плазмаси клиник намуналари материал сифатида қўлланилди. Тадқиқотга жами 79 нафар бемор қамраб олинди. Беморлар 19 ёшдан 63 ёшгача бўлиб, улардан 16 нафарини аёллар (20,2%) ва 63 нафарини (79,8%) эркаклар ташкил этди. Барча текширилган беморлар орасида вирусли гепатит Внинг оккульт шакли 22 ҳолатда (27,8%) аниқланди. Вирусология илмий-тадқиқот институтида беморлар қонида вирусли гепатит маркерлари мавжудлигини аниқлаш учун текширувлар ўтказилди, инструментал эластография, жигар биопсиясининг морфологик текшируви амалга оширилди, шунингдек, вирусли гепатит Внинг ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКси мавжудлиги ўрганилди. Гепатит В вирусининг ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКси мавжудлиги аниқланган тақдирда, гепатит В вируси геномининг large S protein (S) gene, polymerase (Pol) gene, middle S protein (S) ва S protein (S) соҳалари қўшимча тарзда Сенгер бўйича секвенирланди.

Диссертациянинг «**Гепатит В вирусининг ҳалқасимон ковалент ёпиқ ДНКси мавжудлигини аниқлашнинг аҳамияти**» деб номланган учинчи бобида вирусли гепатит Внинг яширин шакли ташхисоти натижалари баён этилган. Эластография, цитология ва зардоб M2BP фиброз маркерларининг яққол ривожланган даражасига эга жигардаги сезиларли ўзгаришлар кузатилган беморлар тадқиқотга қамраб олинди. Фибросканирлаш билан бажарилган эластографиянинг медиана қиймати 2.65, F3 модасида дисперсия 1,046 ни ташкил этди. Бунда 53,0% беморларда жигар фиброзининг даражаси F3-F4 ни ташкил этди.

Мослаштириш учун Pollicino T. ва ҳаммуаллифларининг 2013 йили модификация қилинган усули асос қилиб олинди ҳамда реал вақтдаги полимераза занжирли реакция (ПЗР) учун TaqMan зондлари қўлланилди. Реал вақтдаги детекцияли ротор типдаги амплификаторлар билан ишлашда тестни мослаштириб олиш учун усулни модификациялаш зарур эди (чунки оригинал усул планшет типдаги амплификаторлар ва якуний нуқта бўйича детекция учун мўлжалланган эди). Бир қатор тажрибалар давомида ротор типдаги амплификаторлар учун амплификациянинг вақти ва ҳароратининг оптимал нисбати топилди (1-жадвал).

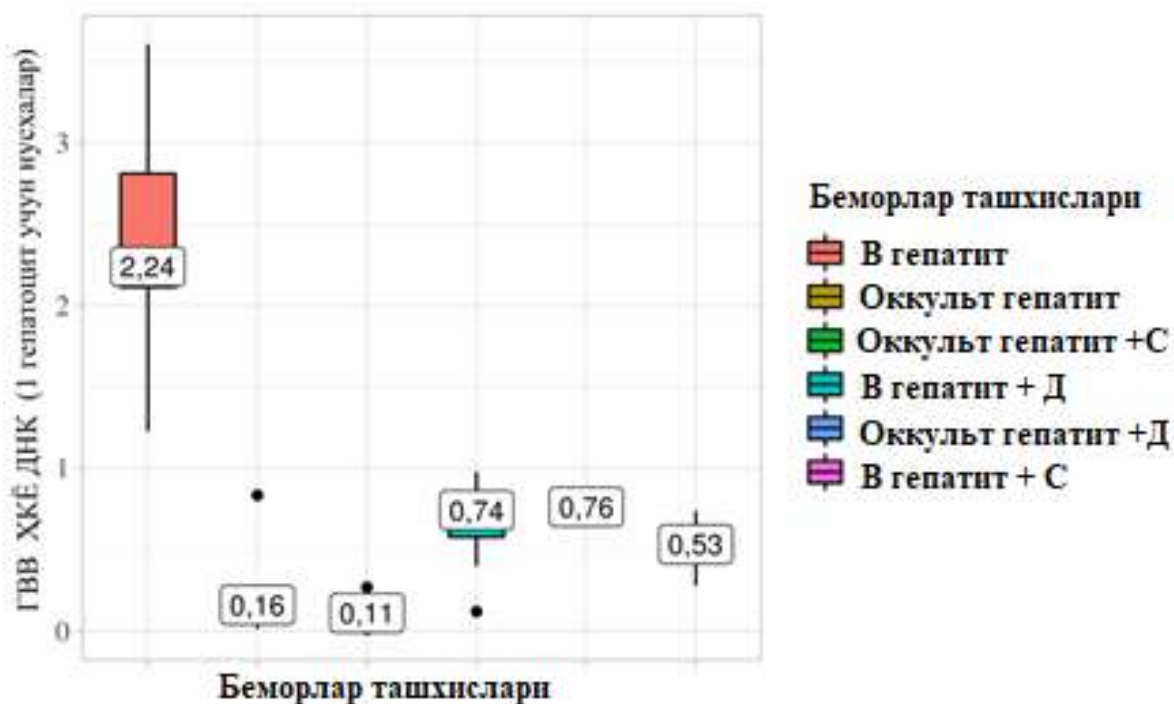
### 1-жадвал

#### Ротор типдаги ускуналар учун амплификация дастури

Амплификация босқичлари	Вақт	Ҳарорат	Такрорлашлар сони
Денатурация	5 дақиқа	95°C	1
Денатурация	30 сония	95°C	40 (Orange (ROX) канали бўйича сигнал детекцияси)
Қиздириш (отжиг)	30 сония	57°C	
Элонгация	60 сония	72 °C	
Якуний элонгация	5 дақиқа	72 °C	1

Тадқиқот натижасида гепатит В вирусининг ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКси мавжудлигини аниқлаш учун мослаштирилган усул ёрдамида вирусли гепатит Внинг яширин шакли вирусли гепатит С ташхиси қўйилган гуруҳдаги 18 нафар бемордан 13 нафарида (72,2%) ва номаълум этиологияли сурункали гепатит ташхиси қўйилган 21 нафар беморнинг 16 нафарида (76,1%) аниқланди.

Вирусли гепатит Внинг оккульт шаклида аксарият ҳолларда вируснинг репликацияси ва геномларнинг экспрессияси шундай бостирилган бўлиши мумкинки, бунда бемор жигарининг тўқимасида вирус кучи жуда паст бўлади ва ҳатто вирусли гепатит Вда ДНКни стандарт усуллар орқали аниқлаш имкони бўлмайди, аммо репликацияни бостириш вақтида вирус элиминацияси кузатилмайди. Периферик қонда HBsAg бўлмаслигига қарамай, оккульт гепатит В бўлган беморлар бир ёки бир неча серологик маркерлар бўйича касаллик кечиши фазасига қараб серологик ижобий ҳисобланади (анти-HBs, HBeAg, анти-HBe, анти-HBcor). Бироқ адабиётлардаги маълумотларга кўра, вирусли гепатит Внинг барча маркерлари бўйича беморларнинг 20% дан ортиғи серологик салбийдир (Locarnini S., 2014). Ушбу тадқиқотда вирусли гепатит Внинг оккульт шакли бўлган беморларнинг 4 нафарида (19,0%) – HBsAb, 7 нафарида (33,0%) – HBeAg, фақат битта ҳолатда (4,7%) – HBeAg ва 3 та ҳолатда (14,0%) – HBeAb аниқланди. Бинобарин, 11 нафар беморда (55,0%) вирусли гепатит Внинг биронта ҳам маркери аниқланмади.



**1-расм. Беморларнинг ташхисларидан келиб чиққан ҳолда ГВВ халқали ковалент ёпиқ ДНК (1 та гепатоцитга ш.б.) таркибининг таҳлили**

Шунингдек, ушбу тадқиқотда турли ташхис қўйилган беморларда гепатит В вирусининг халқали ковалент ёпиқ ДНК миқдори муҳим аҳамият касб этди. Гепатит В вирусининг (ГВВ) халқали ковалент ёпиқ (ХКЕ) ДНК таркибини миқдорий баҳолашда вирусли гепатит Внинг сурункали кечиши кузатилган беморлар жигар тўқималарида ўрта ҳисобда 2,4 шартли бирлик (ш.б.)/хужайра (ХКЕ ДНК кўринишида ГВВ геномининг хужайрага 1,2 дан 3,6 нусхасигача), СВГВ+Д бўлган беморларда ўрта ҳисобда 0,7 (ш.б.)/хужайра (ХКЕ ДНК кўринишида ГВВ геномининг хужайрага 0,12 дан 0,94 нусхасигача), ВСГ+ВГВ коинфекцияси бўлган беморларда 0,52 (ш.б.)/хужайра (ХКЕ ДНК кўринишида ГВВ геномининг хужайрага 0,27 дан 0,74 нусхасигача), сурункали ВСГ ташхиси қўйилган беморларда ўрта ҳисобда 0,12 (ш.б.)/хужайра (ХКЕ ДНК кўринишида ГВВ геномининг хужайрага 0,03 дан 0,2 нусхасигача), вирусли гепатит Внинг яширин шакли аниқланган беморларда 0,2 (ш.б.)/хужайра (ХКЕ ДНК кўринишида ГВВ геномининг хужайрага 0,01 дан 0,27 нусхасигача) аниқланди. Беморларнинг ташхисларидан келиб чиқиб, 1-расмда кўрсатилган ГВВ ХКЕ ДНК (1 та гепатоцитга нусхалар) таркибининг статистик таҳлили ўтказилди.

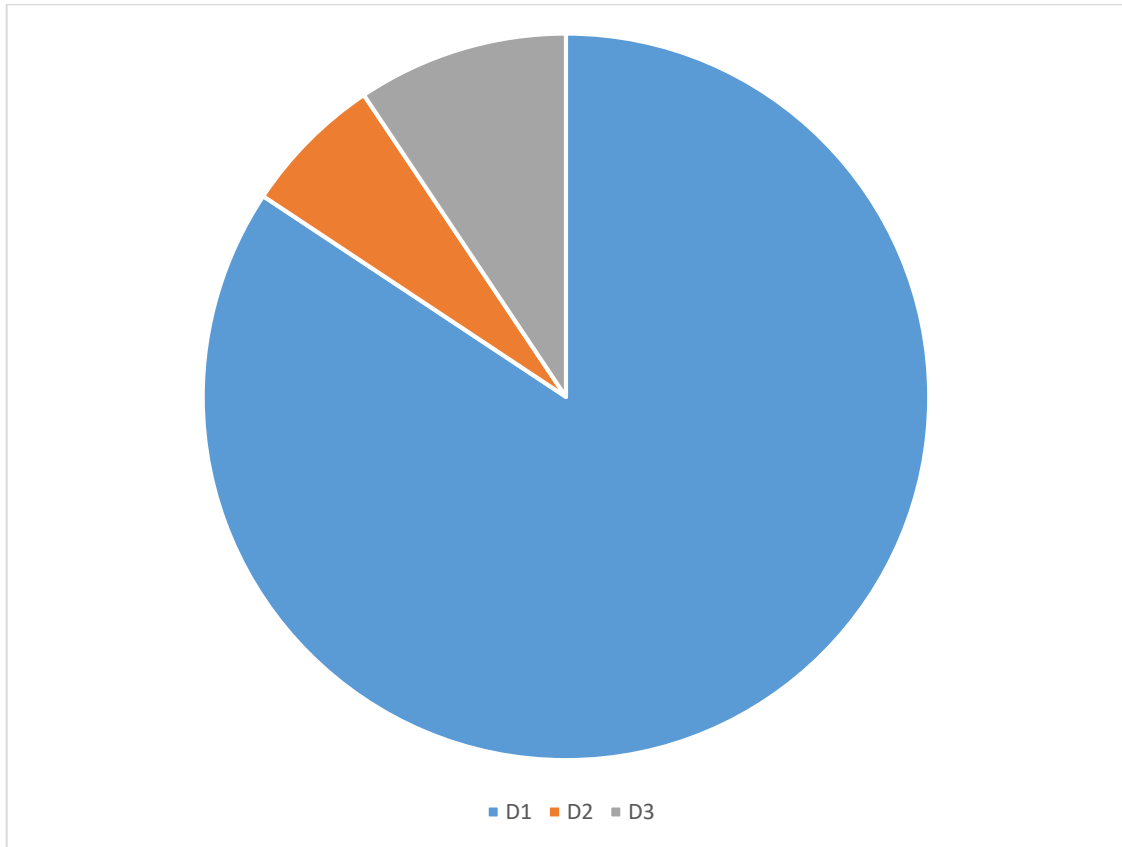
Адабиётлар маълумотларига кўра, СВГВ аниқланган беморларда ўртамеъна фаоллик билан деярли ҳар бир гепатоцит касалланган (ўрта ҳисобда 1,7 (ш.б.)/хужайра, яъни ХКЕ ДНК кўринишида ГВВ геномининг хужайрага 0,3 дан 2 нусхасигача), касаллик табиий кечаётган ҳар хил фазали гуруҳларда эса (иммун назорати ва рефаоллик) ГВВ ХКЕ ДНК даржаларида тафовут кузатилмаган (ўрта ҳисобда 1,02 (ш.б.)/хужайра), шу билан бир қаторда, HBsAg нофаол ташувчиларида ХКЕ ДНК даражаси ўрта ҳисобда 0,15 (ш.б.)/хужайра бўлган (Семенов А.В. ва бошқалар., 2014). Шундай қилиб, олинган натижалар

жигар фибрози ва циррозининг турли даражадаги фаоллиги кузатилган СВГВ билан касалланган беморларда ГВВнинг ХКЁ ДНКсининг юқори даражасини кўрсатди ҳамда, аксинча, ёндош инфекцияларда, жумладан, HBsAg салбий бўлган беморларда жигарнинг касалланган ва касалланмаган хужайраларининг анчагина паст нисбати ҳамкасбларнинг ВГС ва ВГД билан ҳамроҳ касалланишда ГВВ репликациясининг паст даражасини кўрсатган изланишларига мос келади. Бу Alghamdi A. et al., 2013 томонидан қонда HBsAg даражаси жигарда ГВВ ДНК таркиби билан корреляцияланиб, унинг мутлақ миқдорини эмас, балки транскрипцион фаол ГВВ ХКЁ ДНКни аниқлаш борасида этилган фикрларининг исботи бўлиши мумкин. Бунда зардобда HBsAb мавжуд эмаслиги, эҳтимол, жигар тўқимасида ГВВ ХКЁ ДНК паст миқдорини намоён этса керак.

Оккульт гепатит В кам учрайдиган касаллик ҳисоблансада, ўтказилган тадқиқотлар ноаниқ этиологияли гепатит ташхиси қўйилган ва ВГС хавфли кечаётган беморларда унинг тарқалиши анча юқорилигини кўрсатди. Бундай юқори даража – 76,1% текширувга қамраб олинган барча беморларда ёрқин ифодаланган жигар фибрози бўлгани билан изоҳланади. Шунингдек, таъкидлаб ўтиш жойизки, ХКЁ ДНК ўртача таркиби 1 та гепатоцитга 0,2 нусхани ташкил этди. Бу жуда паст кўрсаткич, бундай паст миқдорда вирус мавжуд бўлганида уни эскича усуллар билан аниқлаш анча мураккабдир. Аммо сурункали кечишда вирус заррачаларининг ҳатто шундай катта бўлмаган миқдори ҳам жигар фибрози, циррози ва гепатоцеллюляр карцинома каби жиддий асоратларга олиб келиши мумкин. Хулоса қилиб шуни айтиш мумкинки, беморлар гуруҳи ортганида оккульт ВГВ тарқалиш частотаси бундай беморлар орасида ўзгаради ва анча юқори бўлади. Ушбу тахмин хорижий ҳамкасбларнинг вирусли гепатит юқори эндемик бўлган худудларда жигарнинг оғир касалланиши кузатилган беморларда HBsAg салбий бўлганида оккульт ВГВ тарқалиш даврийлиги (частотаси) 59,0% ни, гепатоцеллюляр карцинома билан касалланган беморларда эса бу кўрсаткич – 85% гачани ташкил этганлиги билан билвосита тасдиқланади (Huang X., 2014). Бунда ноаниқ этиологияли гепатит билан касалланган беморлар жигаридаги паст даражадаги ГВВ ХКЁ ДНКси СВГВ бўлган беморлар билан таққосланганда бошқа тадқиқотчилар маълумотларига зид келмайди (Wong D.K. et al., 2015).

Диссертациянинг «**Олинган нуклеотид кетма-кетликларнинг молекуляр-генетик тавсифи**» деб номланган тўртинчи бобида олинган нуклеотид кетма-кетликларнинг филогенетик таҳлили ва мутацияларнинг мавжудлиги баҳоланган. Барча намуналар учун генотип ва субтип аниқланган. 55 та изолятларнинг филогенетик таҳлил асосида сурункали гепатит ифодаланган жигар фибрози ва циррози билан кечган беморлар текширилганда уларда фақат Марказий Осиёда энг кенг тарқалган ВГВ D генотиби аниқланди. Бунда ВГВ D1 субтипи (84,3%) D3 (9,4%) ва D2 (6,3%) субтипларига қараганда кўпроқ учраши кузатилди (2-расм). Фрагмент кетма-кетликларни таҳлил қилишда гуруҳда нуклеотид ўхшашлик  $99,10 \pm 0,4\%$  ни ташкил этди.

Аниқланишича, ўрганилган гуруҳда жинсий мансублик беморларнинг ёши ва географик жойлашуви каби ВГВ субтипларининг тарқалишида аҳамиятли бўлган омиллар сирасига кирмайди.



**2-расм. Текширилган гуруҳда ВГВ геновариантларининг учраш частотаси (D1 – 84,38%, D2 – 6,3%, D3 – 9,4%)**

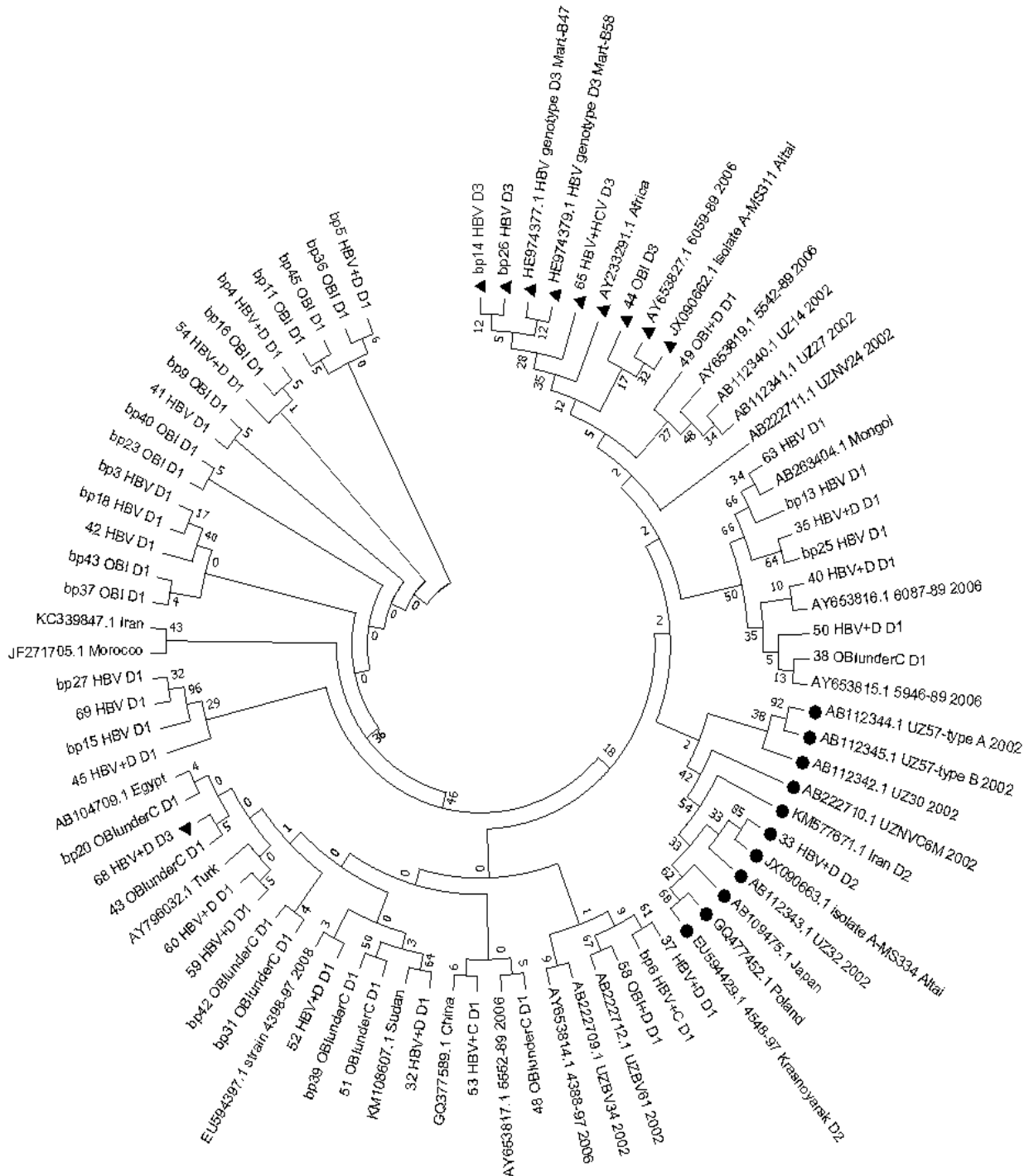
Бирок гуруҳ таркибида, яъни ифодаланган жигар фибрози билан клиникага муурожаат қилганлар орасида эркаклар сони аёллар сонидан 4 марта кўп бўлди. Вирус генотипининг Ўзбекистоннинг географик ҳудудлари билан боғлиқлиги кузатилмади. Масалан, гуруҳлар ичидаги нуклеотид ўхшашлик 99,0% дан ошган ВГВ D3 субтипи бўлган беморлар республиканинг турли ҳудудларидан бўлган: Тошкент, Бухоро ва Наманган. Бу у ёки бу генотип ва/ёки субтипларнинг тарқалиши географик яқинликдан кўра, кўпроқ юқиш йўлларига боғлиқлиги билан изоҳланади.

Текширилган гуруҳда ВГВ нинг аниқланган геновариантлари, умуман олганда, Ўзбекистон ва Марказий Осиё учун хосдир. Вирусли гепатит В нинг оккульт шаклида вирус геновариантларининг тақсимланиши таҳлил қилинганда, фақат битта D3 субгенотипидан истисно тариқасида аксарият ҳолларда ВГВ D1 субгенотипи аниқланди.

Шундай қилиб, ВГВ субгенотипларининг тарқалишини баҳолашда беморларнинг ўрганилган гуруҳида бизнинг ҳудудимиз учун хос бўлган ВГВ D1, D2 ва D3 субгенотиплари кенгрок тарқалганлиги тасдиқланди. Олинган маълумотлар, Ўзбекистон Республикаси ҳудудида ВГВ D генотипи циркуляциясининг эндемиклигидан далолат беради.

Тақдим этилган 79 намунадан 53 тасида ВГВ мавжудлиги Сенгер бўйича секвенирлаш усули ёрдамида муваффақиятли тасдиқланди. Тадқиқотга

қониқарли сифатдаги ва сўнгги таҳлиллар учун муқобил бўлган давомийликдаги Pre-S1/Pre-S2/S соҳа нуклеотид кетма-кетлигидаги 49 та намуна киритилди. Бевосита антивирус дори воситалари билан даволанган беморлардан олинган намуналар аниқланганлиги сабабли, филогенетик таҳлидан иккита консенсус истисно қилинди (3-расм).



**3-расм. Мазкур тадқиқотда таҳлил қилинган ВГВ D генотиби изолятларининг GenBank халқаро маълумотлар базасига илгари тақдим этилган ВГВ изолятларининг кетма-кетлиги билан таққосланган филогенетик дендрограммаси**

Шартли белгилар: D1 субгенотиби белгиларсиз; ▲ – D3 субгенотиби;  
● – D2 субгенотиби

Эволюция тарихи Тамура-Ней моделига асосланган максимал ҳақиқатнамолик усули ёрдамида бажарилди. Бутстрап консенсус дараҳти 500 та такрорланишдан олинди ва таҳлил қилинаётган таксонларнинг эволюцион тарихини тақдим қилиш учун фойдаланилди. 50% дан камроқ юкланган репликаларга мос келувчи бўлимларнинг тегишли шохлари истисно қилинди. Таҳлилга 82 та нуклеотид кетма-кетликлар киритилди (53 та кетма-кетликлар тадқиқот изланишларидан ва 29 та референс консенсус GenBank халқаро нуклеотид кетма-кетликлар маълумотлар базасидан юклаб олинган).

Бўш жойлар ва етишмаётган маълумотларни ўз ичига олган барча ўринлар ўчирилди. Якуний маълумотлар тўпламида фақат 427 та ўринлар бўлди. Эволюцион таҳлил MEGA7 дастурида амалга оширилди.

Мазкур изланишда аниқланган ва GenBank халқаро маълумотлар базасида тақдим этилган изолятларнинг қиёсий филогенетик таҳлилида ВГВ D генотипининг ўхшашлиги юқори эканлиги қайд этилди. Бунда ВГВ D1 ва D3 субтипларининг ўхшашлиги эътиборни ўзига тортади. Бу ВГВ+Д ко-инфекцияли 68-чи изолят мисолида айниқса, сезилди ва Geno2Pheno воситаси ёрдамида D3 субгенотипи сифатида аниқланди, аммо филогенетик таҳлил натижасида D1 субгенотипи билан кластерланди.

Шунингдек, D1 субгенотипининг икки филогенетик шохга бўлиниши қизиқиш уйғотди. Уларнинг бири молекуляр тавсифига кўра D3 субгенотипига яқин бўлиб, D1 субгенотипи нуклеотид кетма-кетликларининг классик вариантларидан алоҳида кластерни ташкил этди. Ушбу шохда GenBank халқаро базасидан юклаб олинган нуклеотид кетма-кетликлар, 2002 ва 2006 йилларда Ўзбекистон ҳудудидан олинган изолятлар, Монголиядан олинган изолятлар ва ушбу тадқиқотда олинган 8 та изолятлар кетма-кетликлари кластерланди. D1 субгенотипининг иккинчи филогенетик шохиди мазкур тадқиқотда олинган консенсуслар, GenBank халқаро базасидан юклаб олинганлар Хитой, Судан, Туркия, Миср, Марокаш, Эрон изолятларининг нуклеотид кетма-кетликлари ҳамда 2002, 2006 ва 2008 йилларда Ўзбекистон ҳудудидан юклаб олинган изолятларнинг нуклеотид кетма-кетликлари билан кластерланди.

D3 субгенотипининг филогенетик шохиди ушбу тадқиқотда олинган, Африка ва Россия Федерациясининг Олтой ўлкаси ҳамда GenBank халқаро базасидан юклаб олинган ҳамда 2002 ва 2006 йилларда Ўзбекистондан олинган консенсуслар кластерланди. Ушбу кластернинг ички гуруҳий ўхшашлиги жуда юқори бўлди ва 99,0% дан ошди.

D2 субгенотипининг филогенетик шохиди ушбу тадқиқотда олинган консенсуслар, шунингдек, GenBank халқаро базасидаги Япония, Польша, Эрон, Россия Федерацияси (Олтой вилояти ва Красноярск шаҳри) ҳамда 2002 ва 2006 йилларда Ўзбекистондан юклаб олинган нуклеотид кетма-кетликлар кластерланди.

Филогенетик дендрограммада таҳлил қилинаётган ҳудуднинг юқори ўхшашликка эга бўлган оккульт вирусли гепатит В билан касалланган беморлардан олинган консенсуслар гуруҳлаштирилган кластер кўпроқ эътиборни тортади. Ушбу гуруҳдаги барча беморларнинг қон зардобиди HBsAg салбий бўлган, шунингдек, жигарда вирус ДНКси жуда паст даражаси қайд

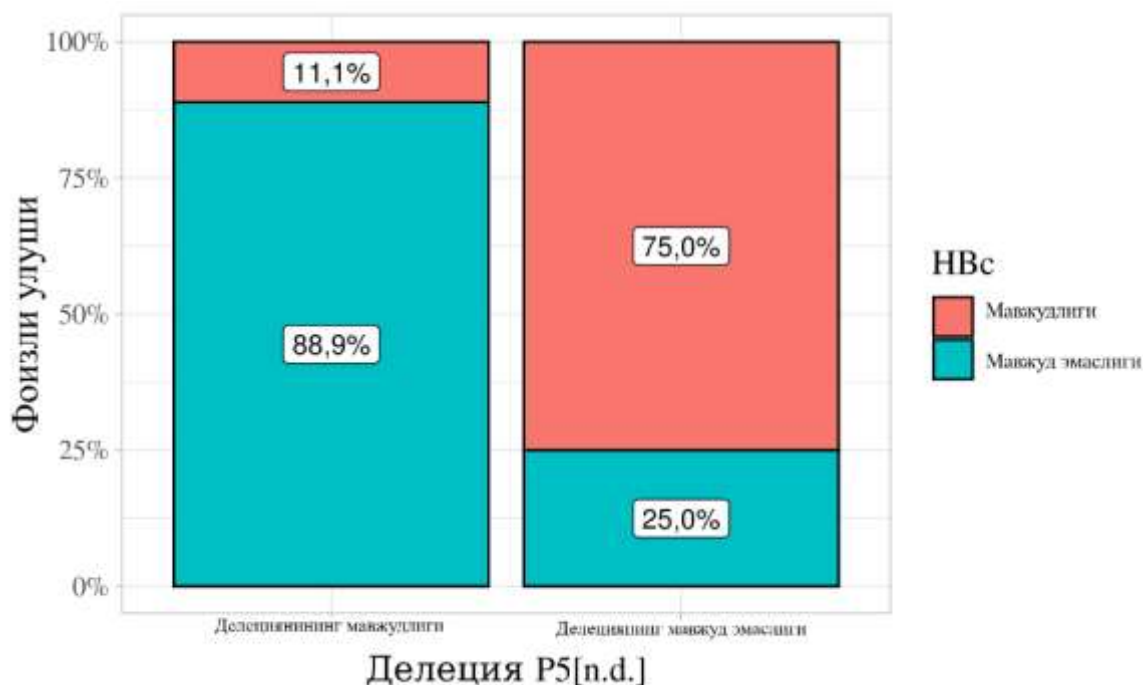


этилди. Ушбу консенсусларнинг бундай яқин кластерланишини филогенетик таҳлил қилиш учун таҳлил қилинаётган ҳудуднинг 500 жуфт нуклеотид асосларидан кам бўлганлиги билан изоҳлаш мумкин. Ушбу гуруҳнинг ўхшашлигини тўлақонли баҳолаш учун тўлиқ геномли секвенирлашни ўтказиш орқали янада чуқурроқ изланишлар олиб бориш зарур.

Олинган нуклеотид кетма-кетликларда мутацияларни ва бевосита вирусга қарши дориларга қарши мутацияларнинг мавжудлигини баҳолаш амалий соғлиқни сақлаш учун катта қизиқиш уйғотади. Зеро, айнан географик ҳудудга хос (инфекциянинг юқиш йўллари) дориларга чидамлик профилени аниқлаш тўғри давони тайинлаш натижасида беморларнинг ҳаёт давомийлиги ва яшаш сифатини яхшилашга ёрдам беради.

Geno2Pheno воситаси ёрдамида бевосита вирусга қарши таъсир кўрсатувчи дориларга чидамлик мутацияларининг мавжудлиги аниқланмади. Бироқ тавсифий мутацияларнинг чуқур таҳлили ўтказилганда, қуйида батафсил баён этилган қизиқарли ўзаро боғлиқликлар аниқланди. Шунингдек, ВГВ зардоб маркерларининг мутациялар мавжудлиги/йўқлиги билан ўзаро боғлиқлиги чуқур таҳлил қилинди.

HBc ва HBsAg маркерларининг мавжудлиги билан RT домени делециясининг P5 делецияси мавжудлиги солиштирилганда статистик аҳамиятли натижалар аниқланди (4-расм). Бунда Йетс тузатишлари билан Пирсон усули орқали HBsAg мавжудлиги ва RT домени мутациялари ўртасидаги ўзаро боғлиқлик ўрганилганда сезиларли фарқлар аниқланмади.



**4-расм. P5 [n.d.] делецияси мавжудлигига боғлиқ ҳолда HBc маркери мавжудлигининг таҳлили**

Хулоса қилиб айтиш мумкинки, RT доменининг P5 делецияси вирусли гепатит Внинг оккульт шакли ривожланишида муҳим аҳамият касб этади

( $p < 0,001$ ) ва D генотипига боғланган, субгенотипга боғланмаган ҳолда (субгенотипнинг делеция мавжудлиги билан ўзаро боғлиқлиги баҳоланганда сезиларли фарқлар аниқланмади,  $p = 0,455$ ).

RT доменининг P5 делецияси мавжудлиги беморлар қон зардобида HBsAg йўқлиги билан боғлиқ ва бу ўз навбатида вирусли гепатит Вни одатий усуллар ёрдамида ташхислашни мураккаблаштирди. Y135S/F ва T127P мутацияларининг мавжудлиги D1 ва D3 субгенотипларига хос бўлди, D2 генотипида эса кузатилмади. A21S ва Q215H/P мутацияси D1 субгенотипи учун хос бўлмади. N248H мутациясининг мавжудлиги жигар фиброзининг ифодаланган даражаси билан ўзаро боғлиқ бўлди. Умуман олганда, вирусли гепатит Внинг оккульт шаклига RT доменининг A7T, N248H, S78T/Y, N76D мутациялари, P5 делецияси ҳамда SHB доменининг P70T, F20S, P11L, C69 мутацияларининг мавжудлиги хос бўлди. Ушбу мутациялар адабиётларда гепатит В вирусининг фитнессини камайтирувчи мутациялар сифатида таърифланган.

Шундай қилиб, ушбу тадқиқотда вирусли гепатит Внинг оккульт шаклида вирус фитнесси камайиши билан боғлиқ бўлган ГВВ геноми таркибида ўзига хос ўзгаришлар кузатилганлиги, шунингдек, одатий усуллар ёрдамида HBsAg мавжудлигини ташхислашнинг имконсизлигини хулоса қилиш мумкин.

## ХУЛОСАЛАР

**«Вируснинг ковалент ёпиқ ҳалқасимон ДНК сини аниқлаш орқали гепатит В нинг яширин шакллари ташхислаш хусусиятлари»** мавзусида олиб борилган тадқиқот асосида қуйидаги хулосалар қилинди:

1. Оккульт гепатит В HCV этиологияли жигар циррози билан касалланган 72,2% беморларда ва номаълум этиологияли жигар циррозлари билан касалланган 76,1% беморларда аниқланди.

2. Генотипик манзара таҳлил қилинганда фақат D генотипи аниқланди. ВГВ D3 (9,4%) ва D2 (6,3%) субтипларига нисбатан D1 субтипи (84,3%) устунлик қилди.

3. Филогенетик таҳлилда ВГВ D1 ва D3 субтипларининг яқин ўхшашлиги аниқланди. Шунингдек, D1 субгенотипининг 2 та филогенетик шохга бўлиниши кузатилди ва улардан бири молекуляр-генетик хусусиятлари бўйича D3 субгенотипига яқин бўлди. Оккульт вирусли гепатит В мавжуд беморларнинг кетма-кетлиги гуруҳланган кластери таҳлил қилинаётган қисмнинг юқори ўхшашлиги билан фарқланди.

4. Олинган нуклеотид кетма-кетликларда бевосита вирусга қарши таъсир кўрсатувчи дориларга чидамлик мутациялар аниқланмади. Гепатит В нинг оккульт шаклида маркер профилининг ўзгариши билан боғлиқ мутациялар спектри аниқланди.

5. Real-time ПЗР усулидан фойдаланган ҳолда гепатит В вирусининг ҳалқали ковалент ёпиқ ДНКсини аниқлаш учун ишлаб чиқилган лаборатор-ташхисот алгоритми вирусли гепатит В нинг яширин шакллари аниқлаш имконини берди.

**РАЗОВЫЙ НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.04/30.12.2019.Tib.30.01  
ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ  
ТАШКЕНТСКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИИ,  
РЕСПУБЛИКАНСКОМ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОМ  
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОМ МЕДИЦИНСКОМ ЦЕНТРЕ  
ЭПИДЕМИОЛОГИИ, МИКРОБИОЛОГИИ, ИНФЕКЦИОННЫХ И  
ПАЗАРИТАРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

---

**НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ВИРУСОЛОГИИ  
РЕСПУБЛИКАНСКОГО СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО НАУЧНО-  
ПРАКТИЧЕСКОГО МЕДИЦИНСКОГО ЦЕНТРА ЭПИДЕМИОЛОГИИ,  
МИКРОБИОЛОГИИ, ИНФЕКЦИОННЫХ И ПАЗАРИТАРНЫХ  
ЗАБОЛЕВАНИЙ**

**КАЗАКОВА ЕВГЕНИЯ ИВАНОВНА**

**ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ СКРЫТЫХ ФОРМ  
ГЕПАТИТА В ПУТЕМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
КОЛЬЦЕВОЙ КОВАЛЕНТНО ЗАМКНУТОЙ  
ДНК ВИРУСА**

**03.00.04 – Микробиология и вирусология**

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ  
ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD) ПО МЕДИЦИНСКИМ НАУКАМ**

**ТАШКЕНТ-2022**

The thesis of the doctor of philosophy (PhD) was registered at the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan under No. B2018.2PhD/Tib608

The dissertation (PhD) has been prepared at the Research Institute of Virology of the Republican specialized scientific practical medical center of epidemiology, microbiology, infectious and parasitic diseases.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of Scientific Council ([www.tma.uz](http://www.tma.uz)) and on the website of «Ziyonet» information and educational portal ([www.ziyonet.uz](http://www.ziyonet.uz)).

**Scientific adviser:**

**Juraev Rivojiddin Khafuzullaevich**  
Doctor of Medical Sciences

**Official opponents:**

**Shadmanova Nargiza Abitovna**  
Doctor of Medical Sciences, docent

**Khegay Tatiana Rudolfovna**  
Doctor of Medical Sciences, professor

**Lead organization:**

**Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections of the Federal Budgetary Institution of Science**

Defense will take place « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 at \_\_\_\_ at the meeting of Single Scientific Council DSc.04/30.12. 2019.Tib.30.01 at the Tashkent Medical Academy, The Republican specialized scientific practical medical center of epidemiology, microbiology, infectious and parasitic diseases (Address: 100109, Tashkent city, Farobi 2. Tel/Fax: (+99878) 150-78-25, e-mail: tta2005@mail.ru).

Dissertation can be reviewed at the information Resource Center of Tashkent Medical Academy (is registered under number No \_\_\_\_ ) (Address: 100109, Tashkent, Farobi str., 2. Phone/Fax: (+99871)150-78-14).

Abstract of dissertation sent out on « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 y.

(mailing report No \_\_\_\_ on « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022y).



**L.N. Tuychiev**

Vice-chairman of the one-time scientific council on awarding of scientific degrees, Doctor of Medical Sciences, Professor

**N.U. Tadjieva**

Scientific secretary of the one-time scientific council on awarding of scientific degrees, Doctor of Medical Sciences, Associate Professor

**N.S. Atabekov**

Chairman of a one-time scientific council on awarding of scientific degrees, Doctor of Medical Sciences

## **ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))**

**Актуальность проблемы и востребованность темы диссертации.** Проблема хронического вирусного гепатита В (ХВГВ) и его скрытой формы, характеризующейся сохранением ДНК вируса гепатита В в гепатоцитах у пациентов с негативным HBsAg, остается глобальной и злободневной. Скрытое течение вирусного гепатита В приводит к развитию таких осложнений как цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома. По оценкам ВОЗ в 2015 г. «...вирусные гепатиты стали причиной 1,34 миллиона смертей... Большинство случаев смерти от вирусного гепатита в 2015 г. было вызвано хроническим заболеванием печени (720 000 случаев смерти от цирроза) и первичным раком печени (470 000 случаев смерти от гепатоцеллюлярной карциномы). В 2015 году во всем мире около 257 миллионов человек жили с хронической инфекцией ВГВ...»<sup>1</sup>. На сегодняшний день «...Распространенность скрытой формы ВГВ варьируется от 1% до 87% в разных странах. Распространенность скрытой формы ВГВ составляет 45,5% с генотипами В и С в Китае и 1,7% -6,6% с генотипом С2 в Южной Корее...»<sup>2</sup>. Таким образом, разработка и усовершенствование методов диагностики скрытой формы вирусного гепатита В становится приоритетным направлением практической медицины.

В мире, благодаря развитию высоких технологий, возможности их использования становятся доступнее. Так, стало возможным проводить ПЦР части генома ВГВ, интегрированной в гепатоцит для выявления скрытой формы течения ВГВ. Обнаружение кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ возможно только в гепатоцитах, и является основным диагностическим маркером для постановки диагноза оккультный гепатит В. При этом, для практического здравоохранения и профилактики вирусного гепатита В, выявление пациентов со скрытой формой имеет весомое значение.

В настоящее время в стране проводятся широкомасштабные мероприятия по усовершенствованию системы здравоохранения, при этом особое внимание уделяется профилактическим мероприятиям, направленным на борьбу с инфекционной и неинфекционной патологиями. В то же время в системе здравоохранения реализуются масштабные программные мероприятия. В связи с этим, в соответствии с Постановлением Президента Республики Узбекистан № ПП-3071 «О мерах по дальнейшему совершенствованию оказания специализированной медицинской помощи населению Республики Узбекистан на 2017-2021 годы» от 20 июня 2017 года определены следующие задачи, как «...расширение доступа населения к медицинским услугам, оказание специализированной и высокотехнологичной медицинской помощи...»<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> WHO Global hepatitis report, 2017; <https://www.who.int/publications/i/item/global-hepatitis-report-2017>; p.10

<sup>2</sup> Manoochehr Makvandi. Update on occult hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol. 2016. - Oct 21; 22(39): p. 8720–8734.

<sup>3</sup> Постановление Президента Республики Узбекистан № ПП-3071 «О мерах по дальнейшему совершенствованию оказания специализированной медицинской помощи населению Республики Узбекистан на 2017-2021 годы» от 20 июня 2017 года.

Данные задачи способствуют снижению инфекционной заболеваемости за счет повышения уровня современной медицинской помощи на новый уровень в диагностике и лечении инфекционных заболеваний у населения и совершенствования использования современных технологий для качественного медицинского обслуживания. Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренным в Указе Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 года №УП-4947 «О стратегии действий дальнейшему развитию Республики Узбекистан», в Постановлениях Президента Республики Узбекистан от 29 марта 2017 года №ПП-2857 «О мерах по совершенствованию организации деятельности учреждений первичной медико-санитарной помощи Республики Узбекистан» и №ПП-3071 «О мерах по дальнейшему развитию специализированной медицинской помощи населению Республики Узбекистан на 2017-2021 годы» от 20 июня 2017 года, а также в других нормативно-правовых документах, принятых в сфере медицины.

**Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с приоритетными направлениями развития науки и технологий Республики Узбекистан по разделу VI «Медицина и фармакология».

**Степень изученности проблемы.** Диагностика оккультной формы вирусного гепатита В является малоизученным направлением в мире. Обнаружение кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ возможно только в гепатоцитах, и является основным диагностическим маркером для постановки диагноза оккультный гепатит В (Lixia Guo., et al., 2018). Данный метод является высокоточным и высокоспецифичным, однако диагностическая процедура осложняется необходимостью использования биопсии и отсутствием стандартизированных коммерческих наборов.

Существует широкий диапазон оценок распространённости оккультного гепатита В в разных странах. По различным данным распространённость оккультного гепатита В варьирует от 7 до 18% (Song E. et al., 2019; Bhatti F. et al., 2017; Yuen M. et al., 2010) от общего числа пациентов с хроническим гепатитом В. Эти данные сильно недооценены, так как пациенты с оккультным гепатитом В имеют чрезвычайно низкие уровни ДНК ВГВ в сыворотке крови и биоптатах печени. Таким образом, уровень виремии ДНК ВГВ в плазме крови у пациентов с оккультным гепатитом В указывается ниже 200 МЕ/мл, но более чем у 90% пациентов уровень ДНК ВГВ составляет 20 МЕ/мл в сыворотке крови (Morales-Romero J., 2014). Такие низкие уровни ДНК ВГВ, а также их колебания, затрудняют обнаружение оккультного гепатита В даже при использовании существующих стандартизированных и высокочувствительных тестов для анализа ДНК ВГВ.

В Узбекистане ранее диагностика скрытых форм вирусного гепатита В не изучалась. Отдельные исследования молекулярно-генетической

характеристики вируса гепатита В и распространённости генотипов представлены в научных работах, связанных с периодом внедрения вакцинации против гепатита В в Республике Узбекистан (Даминов Т. и соавт., 2003; Таджиев Б.М. и соавт., 2008; Avazova D. et al., 2008). Однако перечисленные исследования не затрагивали изучение кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ.

**Связь диссертационного исследования с планами научно-исследовательских работ научно-исследовательского учреждения, где выполнена диссертация.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Научно-исследовательского института Вирусологии: ПЗ-2017090726 «Разработка методов оценки риска развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы в результате различных вариантов хронических гепатитов В и Д, и дифференцированного подхода к их прогнозу, профилактике и лечению» (2018-2020 гг.), а так же меморандума о взаимопонимании между Научно-исследовательским институтом Вирусологии и Санкт-Петербургским НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

**Цель исследования** состоит в выявлении особенностей диагностики скрытых форм гепатита В путем определения кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса у пациентов с гепатитами различного генеза, а также анализе молекулярно-биологических характеристик вируса гепатита В при occultной форме заболевания.

**Задачи исследования:**

оценить значимость определения кольцевой ковалентно замкнутой ДНК в качестве маркера скрытой формы гепатита В среди пациентов с гепатитами неясного генеза путем усовершенствования real-time ПЦР методики;

определить генотипы вируса гепатита В среди пациентов со скрытой формой гепатита В;

проанализировать филогенетические характеристики полученных нуклеотидных последовательностей субтипов вируса гепатита В;

проанализировать особенности молекулярно-генетических характеристик ассоциированных с вирусным фенотипом и лекарственной устойчивостью;

разработать лабораторно-диагностический алгоритм для выявления скрытых форм вирусного гепатита В.

**Объектом исследования** явились 79 пациентов в возрасте 19-63 года, с диагнозами хронический вирусный гепатит В, С, Д, гепатитами неясной этиологии, а также здоровые доноры печени, проходившие лечение в клинике Научно-исследовательского института Вирусологии в 2013-2018 годах.

**Предмет исследования** составляют клинические образцы больных хроническими вирусными гепатитами В, С, Д, гепатитами неясной этиологии, здоровых доноров печени (плазма крови для определения наличия маркёров вирусных гепатитов и биопсийный материал печени для

определения наличия кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ и проведения секвенирования по Сенгеру).

**Методы исследования.** В исследовании были использованы общеклинические, биохимические, молекулярно-биологические, инструментальные и статистические методы.

**Научная новизна исследования** заключается в следующем:

усовершенствована real-time ПЦР методика определения наличия кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ;

доказана диагностическая значимость кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ как важного маркера скрытой формы вирусного гепатита В;

установлена большая доля оккультной формы вирусного гепатита В при гепатитах неясного генеза;

установлена нуклеотидная идентичность Pre-S1/Pre-S2/S участка субтипов D1, D2 и D3 вируса гепатита В путём проведения филогенетического анализа;

**Практические результаты исследования.** На основе изучения диагностики скрытых форм гепатита В путем определения кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса:

оценена значительная роль определения кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ при диагностике скрытых форм вирусного гепатита В;

рекомендовано использование методики определения наличия кольцевой ковалентно замкнутой ДНК у пациентов с гепатитами неясной этиологии и с гепатитом С;

разработан лабораторно-диагностический алгоритм определения скрытых форм вирусного гепатита В.

**Достоверность результатов исследования** достигается использованием в диссертационной работе научно-обоснованных методических и теоретических подходов и методов, репрезентативностью выборок, необходимыми эпидемиологическими, ретроспективными, молекулярно-генетическими, экономическими и статистическими методами анализа, программным подходом к статистической обработке полученных данных, а также сравнением результатов исследований, полученных в ходе изучения определения наличия кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ при скрытых формах вирусного гепатита В, с результатами отечественных и зарубежных исследований. Использование релевантных методов статистической обработки обеспечили достоверность полученных результатов.

**Научная и практическая значимость результатов исследования.** Научная значимость полученных результатов заключается в том, что в проведенном исследовании адаптирован метод диагностики скрытых форм вирусного гепатита В. Широкое распространение в последние годы противовирусной терапии привело к появлению мутантных штаммов вируса гепатита В, которые сложно диагностировать рутинными методами при помощи коммерческих тест-систем. До сих пор в ряде случаев диагностика вирусного гепатита В вызывает затруднения, поскольку проявления и



варианты течения заболевания чрезвычайно разнообразны. Проведенный в диссертационном исследовании филогенетический анализ показал, что у пациентов с гепатитами неясной этиологии был выявлен преимущественно субгенотип D1 вируса гепатита В, который описан в литературе как наиболее распространённый в нашем регионе.

Практическая значимость результатов состоит в том, что адаптированный метод делает диагностику скрытых форм вирусного гепатита В доступной. Обнаружение гепатита В представляет собой сложную задачу для лабораторной диагностики, не смотря на большое количество доступных коммерческих тест-систем. Выявление кольцевой ковалентно замкнутой ДНК в качестве маркера скрытой формы гепатита В является важным методом в диагностике, подборе адекватной терапии и прогнозировании исхода заболевания, а также предотвращении развития тяжелых последствий у пациентов. Разработанный лабораторно-диагностический алгоритм выявления кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ позволяет выявлять скрытые формы вирусного гепатита В. Выявление скрытого течения вирусного гепатита В поможет снизить риск распространения инфекции и развития неблагоприятных исходов у пациентов.

**Внедрение результатов исследования.** На основе научных результатов изучения определения наличия кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ при скрытых формах вирусного гепатита В:

утверждены и внедрены в практику методические рекомендации «Модифицированная методика диагностики оккультной формы вирусного гепатита В» (утверждено Министерством здравоохранения №8н-р/44 от 7 февраля 2020 г). Результаты позволили диагностировать скрытую форму вирусного гепатита В среди пациентов с диагнозом гепатит неясной этиологии;

полученные научные результаты внедрены в практику здравоохранения, в том числе Самаркандской и Наманганской Областных инфекционных больницах (Справка Министерства здравоохранения № 8н-д/35 от 28 февраля 2020 г). Полученные результаты позволили улучшить качество жизни пациентов, снизить количество неблагоприятных исходов, назначить пациентам этиотропную терапию. Экономическая эффективность достигается за счет сокращения расходов на госпитализацию пациентов, сокращения дней нетрудоспособности.

**Апробация результатов исследования.** Результаты диссертационной работы обсуждены на 2-х республиканских и 2-х международных научно-практических конференциях.

**Опубликованность результатов исследования.** По материалам диссертации опубликованы 9 научных работ, из них 4 - журнальные статьи. 1 статья опубликована в республиканском и 3 статьи в зарубежных журналах, рекомендованных для публикации основных результатов диссертаций Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан. Также в

международную базу данных GenBank задепонированы 32 нуклеотидные последовательности под номерами KY210468-KY210499.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы. Объём диссертации составляет 105 страниц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во **введении** обоснованы актуальность и востребованность проведенных исследований, указаны цель и задачи, объект и предмет исследования, соответствие исследований приоритетным направлениям развития науки и технологии республики, изложены научная новизна и практические результаты исследования, раскрыты научная и практическая значимость полученных результатов, приведены сведения о внедрении и результатов исследования в практику, опубликованных работах и структуре диссертации.

В первой главе диссертации **«Молекулярно-биологические характеристики вируса гепатита В и скрытые формы течения вирусного гепатита В»**, подробно освещены результаты проведенных исследований, проведен анализ зарубежной и отечественной литературы. Проанализированы современные представления о молекулярно-биологических характеристиках вируса гепатита В, белках антигенов вируса гепатита В, генотипах вируса гепатита В, мутациях в геноме вируса гепатита В, а также информация о скрытых формах течения вирусного гепатита В.

Во второй главе диссертации **«Общая характеристика обследованных пациентов и использованные методы исследования»** дана подробная характеристика обследованных больных, описана модифицированная методика определения наличия кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В в биопсии печени, приведена методика секвенирования по Сенгеру участков S и Pol вируса гепатита В, проведение оценки наличия мутаций в полученных нуклеотидных последовательностях и их филогенетический анализ.

Материалом для проведения исследования послужили клинические образцы биопсии печени и плазмы крови от пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии клиники Научно-Исследовательского Института Вирусологии в период с июля 2013 года по март 2018 года. Всего в исследование было включено 79 пациентов. Возраст пациентов был от 19 до 63 лет, среди них 16 женщин (20,2%) и 63 мужчины (79,8%). Среди всех обследованных пациентов оккультная форма вирусного гепатита В была выявлена нами в 22 случаях (27,8%). В НИИ Вирусологии пациенты проходили обследование на наличие в крови маркёров вирусных гепатитов, инструментальную эластографию, морфологическое исследование биопсии печени, а также обследование на наличие кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ. В случае обнаружения кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ дополнительно проводилось секвенирование по Сенгеру участков генома вируса гепатита В - large S protein (S) gene, polymerase (Pol) gene, middle S protein (S) и S protein (S).

В третьей главе «Значение определения наличия кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В» описаны результаты диагностики скрытой формы вирусного гепатита В. В исследование были включены пациенты со значительными изменениями в печени, зафиксированными при помощи эластографии, цитологии и значительным уровнем сывороточных маркёров фиброза M2BP. Медиана значений эластографии проведенной с помощью фибросканирования составила 2.65, при моде F3, дисперсия 1,046. При этом у 53% пациентов степень фиброза печени составляла F3-F4.

Для адаптации была взята за основу методика Pollicino T., et al., 2013 с модификацией метода, а также с использованием TaqMan зондов для ПЦР в режиме реального времени. Модификация метода была необходима для адаптации теста при работе с амплификаторами роторного типа с детекцией в режиме реального времени (так как оригинальная методика была рассчитана для амплификаторов планшетного типа и детекцией по конечной точке). В ходе ряда экспериментов было найдено оптимальное соотношение времени и температуры амплификации для амплификаторов роторного типа (таблица 1).

**Таблица 1**

**Программа амплификации для приборов роторного типа**

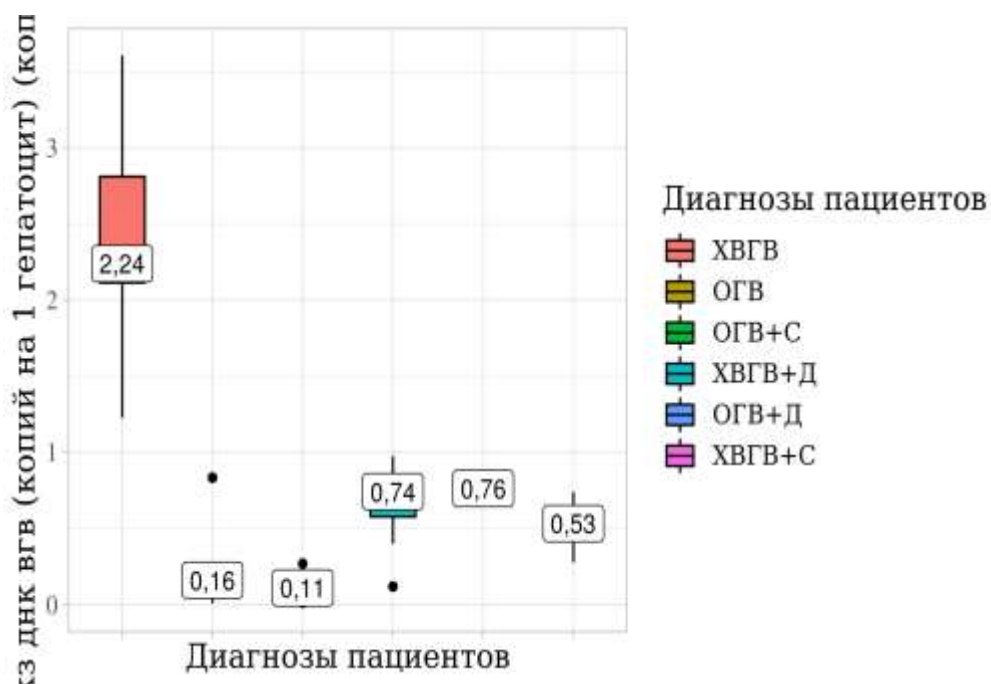
Этап амплификации	Время	Температура	Число повторов
Денатурация	5 мин	95°C	1
Денатурация	30 сек	95°C	40 (детекция сигнала по каналу Orange (ROX))
Отжиг	30 сек	57°C	
Элонгация	60 сек	72 °C	
Финальная элонгация	5 мин	72 °C	1

В результате исследования при помощи адаптированной методики определения наличия кольцевой ковалентно замкнутой (ккз) ДНК ВГВ скрытая форма вирусного гепатита В была выявлена у 13 (72,2%) из 18 пациентов из группы с диагнозом вирусный гепатит С и у 16 (76,1%) из 21 пациентов с диагнозом хронический гепатит неясной этиологии.

При оккультной форме вирусного гепатита В, в большинстве случаев, репликация вируса и экспрессия генов могут быть подавлены настолько, что вирусная нагрузка в тканях печени больного крайне низка, вплоть до невозможности выявить ДНК ВГВ стандартными методами, но элиминации вируса при подавлении репликации не происходит. Несмотря на отсутствие в периферической крови HBsAg, большинство пациентов с оккультным гепатитом В являются серопозитивными по одному или нескольким серологическим маркерам – в зависимости от фазы течения заболевания анти-HBs, HBeAg, анти-HBe, анти-HBcor. Однако, по литературным данным, более 20% больных серонегативны по всем маркерам ВГВ (Locarnini S.,

2014). В данном исследовании среди пациентов с оккультной формой вирусного гепатита В HBsAb были обнаружены у 4 пациентов (19,0%), HBcAg был обнаружен у 7 пациентов (33,0%), HBeAg был обнаружен только в 1 случае (4,7%), HBeAb в 3 случаях (14%). Следовательно, у 11 пациентов (55,0%) не было обнаружено ни одного маркера вирусного гепатита В.

Также важное значение в данном исследовании имела концентрация кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ обнаруженной в пробах от пациентов с различными диагнозами. При количественной оценке содержания кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ в тканях печени у пациентов с хроническим течением вирусного гепатита В было обнаружено в среднем 2,4 условных единиц (у.е.)/клетку (от 1,2 до 3,6 копий генома ВГВ в виде ккз ДНК на клетку), у пациентов с ХВГВ+Д в среднем 0,7 (у.е.)/клетку (от 0,12 до 0,94 копий генома ВГВ в виде ккз ДНК на клетку), у пациентов с коинфекцией ВГС+ВГВ 0,52 (у.е.)/клетку (от 0,27 до 0,74 копий генома ВГВ в виде ккз ДНК на клетку), у пациентов с диагнозом ХВГС в среднем 0,12 (у.е.)/клетку (от 0,03 до 0,2 копий генома ВГВ в виде ккз ДНК на клетку), у пациентов со скрытой формой вирусного гепатита В 0,2 (у.е.)/клетку (от 0,01 до 0,27 копий генома ВГВ в виде ккз ДНК на клетку). Был проведен статистический анализ содержания ккз ДНК ВГВ (копий на 1 гепатоцит) в зависимости от диагнозов пациентов, представленный на рисунке 1.



**Рис. 1. Анализ содержания кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ (у.е. на 1 гепатоцит) в зависимости от диагнозов пациентов**

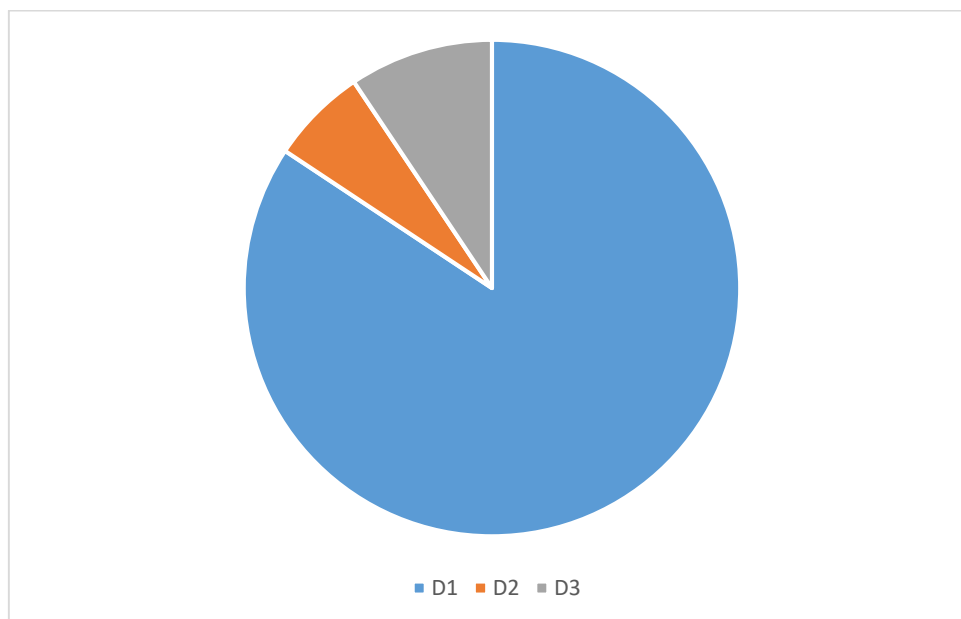
По литературным данным, у пациентов с ХВГВ в группе с умеренной активностью инфицирован практически каждый гепатоцит (в среднем 1,7 (у.е.)/клетку, то есть от 0,3 до 2 копий генома ВГВ в виде ккз ДНК на клетку), а в группе с разными фазами естественного течения заболевания - иммунного контроля и реактивации - нет различий в уровнях ккз ДНК ВГВ (в среднем

1,02 (у.е.)/клетку), в то время как у неактивных носителей HBsAg уровень ккз ДНК в среднем 0,15 (у.е.)/клетку (Семенов А.В. и др., 2014). Таким образом, полученные результаты о высоком уровне ккз ДНК ВГВ у больных ХВГВ с различной степенью выраженности фиброза и циррозом печени и, напротив, значительно более низком соотношении инфицированных и неинфицированных клеток печени у больных с сопутствующими инфекциями, в том числе HBsAg-негативных, согласуются с работами коллег, показавших низкий уровень репликации ВГВ при совместном инфицировании с ВГС и ВГД. Это может служить подтверждением ранее высказанного мнения Alghamdi A., et al., 2013 согласно которому уровень HBsAg в крови, коррелируя с содержанием ДНК ВГВ в печени, отражает не ее абсолютное количество, а транскрипционную активность ккз ДНК ВГВ, при этом отсутствие HBsAg в сыворотке, вероятно, демонстрирует низкую концентрацию ккз ДНК ВГВ в ткани печени.

Несмотря на то, что оккультный гепатит В считается достаточно редкой патологией, его распространённость среди пациентов с диагнозом гепатит неясной этиологии и злокачественным течением ВГС, как показало проведенное исследование, является довольно высокой. Такой высокий процент – 76,1%, в данном исследовании, может быть обусловлен тем, что все включенные в исследование пациенты имели выраженный фиброз печени. Также, стоит отметить, что среднее содержание ккз ДНК составило 0,2 копии на 1 гепатоцит. Это очень низкий показатель и при наличии вируса в таких низких концентрациях, довольно сложно его обнаружить рутинными методами. Однако даже такое небольшое число вирусных частиц с учетом хронического течения, может привести к серьёзным осложнениям, таким как фиброз и цирроз печени, гепатоцеллюлярная карцинома и др. Можно сделать вывод, что при увеличении группы больных частота распространённости оккультного ВГВ у таких пациентов изменится, но, тем не менее, будет достаточно высока. Это предположение косвенно подтверждается результатами работ иностранных коллег, согласно которым в высокоэндемичных по вирусному гепатиту регионах у людей с тяжелыми заболеваниями печени при отрицательном HBsAg оккультный ВГВ встречается с частотой 59,0%, а у больных гепатоцеллюлярной карциномой до 85,0% (Huang X. et al., 2014). При этом низкий уровень ккз ДНК ВГВ в печени пациентов с гепатитом неясной этиологии по сравнению с уровнем у больных ХВГВ не противоречит данным других исследователей (Wong D.K. et al., 2015).

В четвертой главе **«Молекулярно-генетическая характеристика полученных нуклеотидных последовательностей»** даны филогенетический анализ и оценка наличия мутаций в полученных нуклеотидных последовательностях. Для всех образцов были определены генотип и субтип вируса гепатита В. На основании филогенетического анализа 53 изолятов показано, что среди обследованных больных, у которых хронический гепатит сопровождался выраженным фиброзом и циррозом печени был выявлен только генотип D, являющийся наиболее распространенным генотипом ВГВ в Центральной Азии. При этом преобладал ВГВ субтип D1 (84,3%) по

сравнению с субтипом D3 (9,4%) и D2 (6,3%) (рис. 2). При анализе последовательностей фрагмента нуклеотидная идентичность в группе составила  $99,10 \pm 0,4$  %.

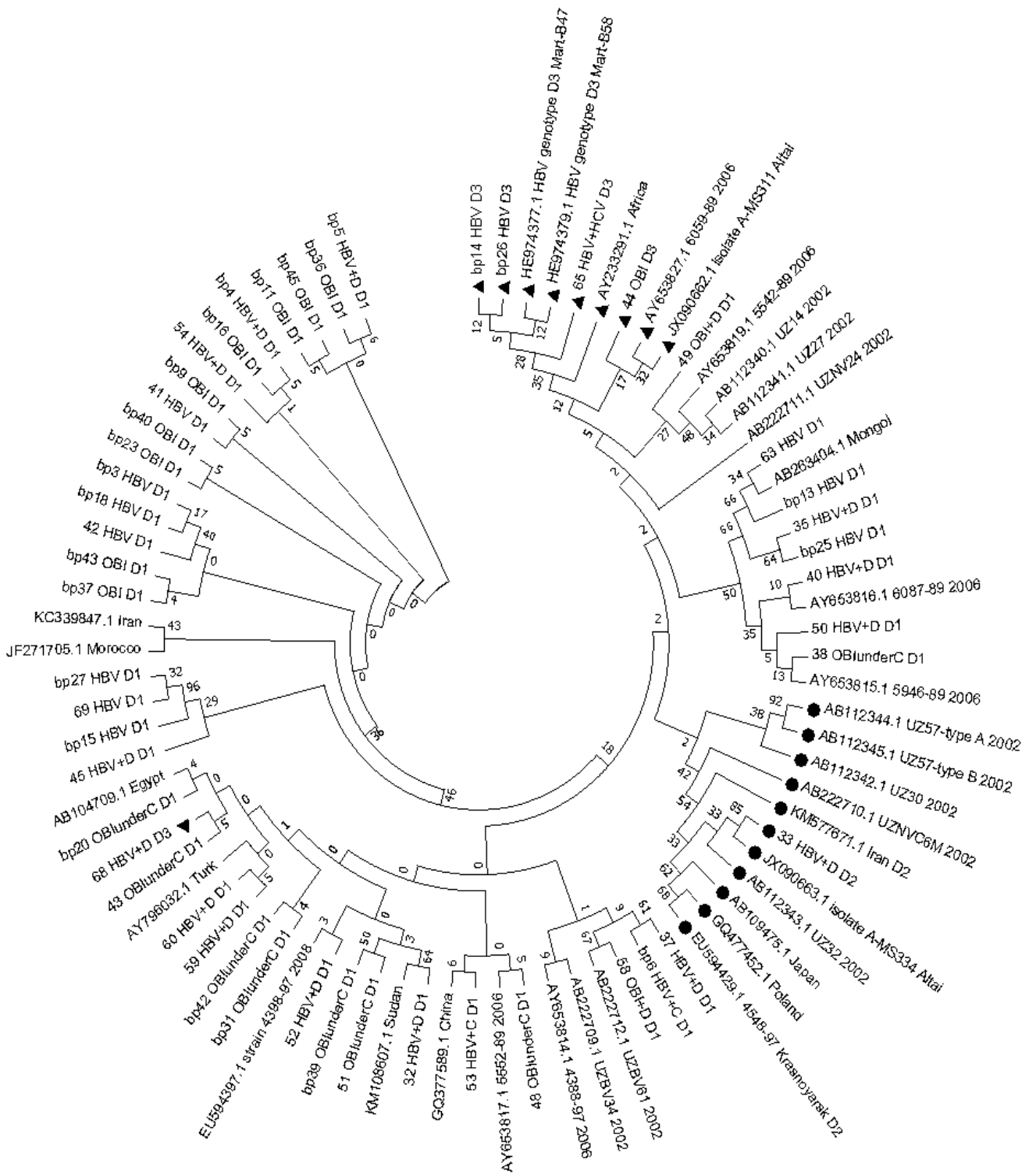


**Рис. 2. Частота встречаемости геновариантов ВГВ в обследованной группе (D1-84,38%, D2-6,3%, D3-9,4%)**

Показано, что половая принадлежность, также, как и возраст пациентов и географическое положение, не относятся к значимыми факторам для распределения субтипов ВГВ в обследованной группе, однако может быть показательным тот факт, что в составе группы, то есть среди обратившихся в клинику с выраженным фиброзом печени, количество мужчин в 4 раза превышало количество женщин. Взаимосвязь между распределением субгенотипа вируса и географических регионов Узбекистана отсутствовала. Так, например, пациенты с ВГВ субтипа D3, внутригрупповой процент нуклеотидной идентичности которых составил более 99%, происходили из разных регионов республики: Ташкента, Бухары и Намангана. Что подтверждает связь распространенности тех или иных генотипов и/или субтипов в различных группах скорее с путями передачи, а не с географической близостью.

Выявленные геноварианты ВГВ в обследованной группе в целом характерны для Узбекистана и Центральной Азии. При анализе распределения геновариантов вируса при оккультной форме вирусного гепатита В был выявлен преимущественно субгенотип ВГВ D1, за исключением 1 случая выявления субгенотипа D3.

Таким образом, при оценке распределения субгенотипов ВГВ в исследованной группе больных было подтверждено характерное для нашего региона преобладание ВГВ субгенотипов D1, D2 и D3. Полученные результаты свидетельствуют об эндемичности циркуляции генотипа D ВГВ на территории Республики Узбекистан.



**Рис. 3. Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения изолятов ВГВ генотипа D, проанализированных в настоящем исследовании в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank последовательностями ранее полученных изолятов ВГВ**

Обозначения: субгенотип D1 без обозначения; ▲ - субгенотип D3; ● - субгенотип D2.

В 53 образцах из представленных 79 успешно подтверждено наличие ВГВ при помощи метода секвенирования по Сенгеру. В исследование включены 49 образцов с нуклеотидной последовательностью Pre-S1/Pre-S2/S региона удовлетворительного качества и протяжённости, пригодной для дальнейшего анализа. Два консенсуса были исключены из филогенетического анализа по причине того, что являлись повторными пробами от пациентов, проходивших лечение препаратами прямого противовирусного действия. История эволюции была выведена с помощью метода максимального правдоподобия, основанного на модели Тамура-Неи. Дерево консенсуса бутстрапа, было выведено из 500 повторов, использовано для представления эволюционной истории анализируемых таксонов. Ветви, соответствующие разделам, воспроизводимым менее чем в 50% загрузочных реплик, свёрнуты. В анализ включены 82 нуклеотидные последовательности (53 последовательности, полученные в исследовании и 29 референсных консенсуса загруженных из международной базы нуклеотидных последовательностей GenBank).

Все позиции, содержащие пробелы и недостающие данные, были удалены. В окончательном наборе данных было всего 427 позиций. Эволюционный анализ проводился в программе MEGA7 (рис.3).

При сравнительном филогенетическом анализе изолятов, выявленных в данной работе, и представленных в международной базе данных GenBank, показано высокое сходство ВГВ генотипа D. При этом обращает на себя внимание близкое сходство ВГВ субтипов D1 и D3. Это особенно заметно на примере изолята 68 с ко-инфекцией ВГВ+Д, который при использовании инструмента Geno2Pheno типировался исключительно как субгенотип D3, однако в результате филогенетического анализа кластеризовался с субгенотипом D1.

Так же интересным оказалось разделение субгенотипа D1 на 2 филогенетические ветви, одна из которых была близка по молекулярным характеристикам к субгенотипу D3 и составляла отдельный кластер от классических вариантов нуклеотидных последовательностей субгенотипа D1. В данной ветви кластеризовались нуклеотидные последовательности, загруженные из международной базы GenBank, изолятов полученных на территории Узбекистана в 2002 и 2006 годах, изолята из Монголии и 8 изолятов, полученных в данном исследовании. Во второй филогенетической ветви субгенотипа D1 консенсусы, полученные в данном исследовании кластеризовались с загруженными из международной базы GenBank нуклеотидными последовательностями изолятов из Китая, Судана, Турции, Египта, Марокко, Ирана, а также нуклеотидными последовательностями изолятов полученных на территории Узбекистана в 2002, 2006 и 2008 годах.

В филогенетической ветви субгенотипа D3 кластеризовались консенсусы, полученные в данном исследовании и загруженные из международной базы GenBank полученные в Африке и Алтайском крае Российской Федерации, а также из Узбекистана в 2002 и 2006 годах. Внутригрупповая идентичность данного кластера была очень высока и составляла свыше 99%.

В филогенетической ветви субгенотипа D2 кластеризовались консенсусы, полученные в данном исследовании, а также загруженные из международной



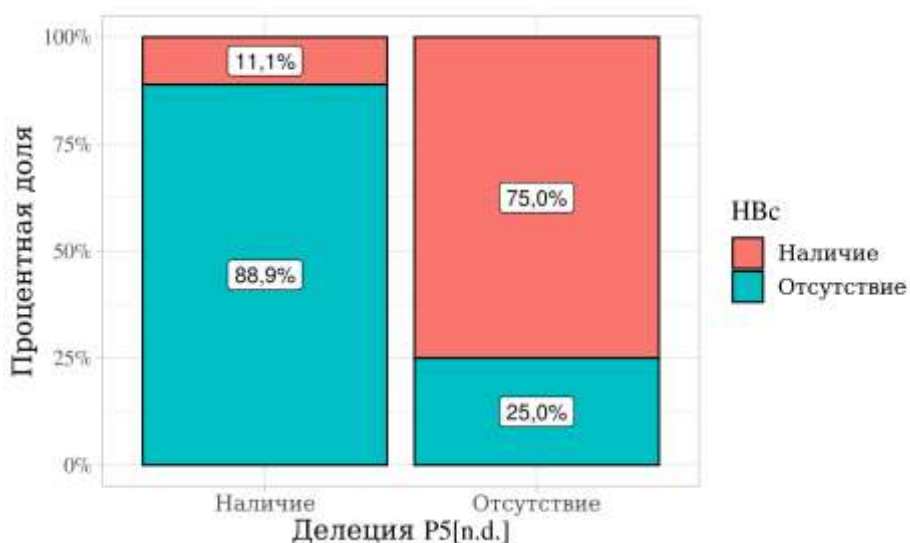
базы GenBank нуклеотидные последовательности из Японии, Польши, Ирана, Российской Федерации (Алтайская область и г. Красноярск) и из Узбекистана загруженные в 2002 и 2006 годах.

На филогенетической дендрограмме обращает на себя внимание кластер, где сгруппированы преимущественно консенсусы от больных оккультным вирусным гепатитом В с высокой идентичностью анализируемого участка. Все пациенты из этой группы имели негативный HBsAg в сыворотке крови, а также крайне низкий уровень вирусной ДНК в печени. Такую тесную кластеризацию данных консенсусов можно объяснить тем, что анализируемый участок для проведения филогенетического анализа составлял менее 500 пар нуклеотидных оснований. Для полноценной оценки идентичности данной группы необходимо более глубокое изучение с проведением полногеномного секвенирования.

Оценка наличия характерных мутаций и мутаций лекарственной устойчивости к препаратам прямого противовирусного действия в полученных нуклеотидных последовательностях вызывает большой интерес для практического здравоохранения. Так как именно определение характерного для географического региона (или пути передачи инфекции) профиля лекарственной устойчивости позволяет улучшить продолжительность и качество жизни пациентов вследствие назначения адекватной терапии.

Оценка при помощи инструмента Geno2Pheno наличия мутаций лекарственной устойчивости к препаратам прямого противовирусного действия не обнаружила. Однако также был проведен глубокий анализ характеристических мутаций и выявлены интересные взаимосвязи, подробно описанные ниже. Также был проведен глубокий анализ наличия/отсутствия мутаций в корреляции с наличием сывороточных маркёров ВГВ.

При сопоставлении наличия маркёров HBc и HBsAg с наличием делеции домена RT делеции P5 выявлены статистически значимые результаты (рис. 4). При этом изучение методом Пирсона с поправкой Йетса взаимосвязи наличия HBsAg и мутаций RT домена не обнаружило значимых различий.



**Рис. 4. Анализ наличия маркёра HBc в зависимости от наличия делеции P5[n.d.]**

Таким образом, мы можем заключить что делеция P5 домена RT является значительной для развития оккультной формы вирусного гепатита В ( $p < 0,001$ ), и привязана к генотипу D, без привязки к субгенотипу (при оценке взаимосвязи субгенотипа с наличием делеции значимых различий не установлено  $p = 0,455$ ).

Наличие делеции P5 домена RT было связано с отсутствием в сыворотке крови пациентов HBsAg, что в свою очередь затрудняло диагностику вирусного гепатита В рутинными методами. Наличие мутаций Y135S/F и T127P было характерно для субгенотипов D1 и D3, а в случае генотипа D2 нет. Мутация A21S не была характерна для субгенотипа D1, так же, как и Q215H/P. Наличие мутации N248H коррелировало с более выраженной степенью фиброза печени. В целом для оккультной формы вирусного гепатита В было характерно наличие мутаций RT домена A7T, N248H, S78T/Y, N76D, делеции P5, а также мутаций SHB домена P70T, F20S, P11L, C69. Данные мутации описаны в литературе как снижающие фитнес вируса гепатита В.

Таким образом, можно подытожить что в данном исследовании при оккультной форме вирусного гепатита В наблюдались характерные изменения в структуре генома ВГВ связанные со снижением фитнеса вируса, а также с невозможностью диагностики наличия HBsAg рутинными методами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По итогам научной работы на тему: «**Особенности диагностики скрытых форм гепатита В путем определения кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса**» сделаны следующие заключения:

1. Оккультный гепатит В выявлялся у 72,2% пациентов с циррозом печени HCV этиологии и у 76,1% пациентов с циррозами печени неясной этиологии.

2. При анализе генотипического пейзажа был выявлен только генотип D. При этом преобладал ВГВ субтип D1 (84,3%) по сравнению с субтипом D3 (9,4%) и D2 (6,3%).

3. При проведении филогенетического анализа выявлено близкое сходство ВГВ субтипов D1 и D3. При этом наблюдалось разделение субгенотипа D1 на 2 филогенетические ветви, одна из которых близка по молекулярно-генетическим характеристикам к субгенотипу D3. Кластер, где сгруппированы преимущественно последовательности от больных оккультным гепатитом В отличается высокой идентичностью анализируемого участка.

4. В полученных нуклеотидных последовательностях не было обнаружено мутаций лекарственной устойчивости к препаратам прямого противовирусного действия. При оккультной форме гепатита В выявлен спектр мутаций ассоциированных с изменением маркерного профиля.

5. Разработанный лабораторно-диагностический алгоритм с использованием real-time ПЦР методики определения кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В позволил выявить скрытые формы вирусного гепатита В.

**ONE-TIME SCIENTIFIC COUNCIL DSc.04/30.12. 2019.Tib.30.01  
ON AWARD OF SCIENTIFIC DEGREES AT THE  
TASHKENT MEDICAL ACADEMY, REPUBLICAN SPECIALIZED  
EPIDEMIOLOGY, MICROBIOLOGY, INFECTIOUS AND PARASITIC  
DISEASES SCIENTIFIC PRACTICAL MEDICAL CENTER**

---

**THE RESEARCH INSTITUTE OF VIROLOGY OF THE EPIDEMIOLOGY,  
MICROBIOLOGY, INFECTIOUS AND PARASITIC DISEASES SCIENTIFIC  
PRACTICAL MEDICAL CENTER**

**KAZAKOVA EVGENIYA IVANOVNA**

**DIAGNOSTIC FEATURES OF OCCULT FORM  
HEPATITIS B BY DETERMINING  
CIRCULAR COVALENTLY CLOSED DNA  
OF THE VIRUS**

**03.00.04 - Microbiology and Virology**

**DISSERTATION ABSTRACT  
OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (PhD) ON MEDICAL SCIENCE**

**The thesis of the doctor of philosophy (PhD) was registered at the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan under No. B2018.2PhD/Tib608**

The dissertation (PhD) has been prepared at the Research Institute of Virology of the Republican specialized scientific practical medical center of epidemiology, microbiology, infectious and parasitic diseases.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of Scientific Council ([www.tma.uz](http://www.tma.uz)) and on the website of «Ziyonet» information and educational portal ([www.ziyonet.uz](http://www.ziyonet.uz)).

**Scientific adviser:** **Juraev Rivojiddin Khafuzullaevich**  
Doctor of Medical Sciences

**Official opponents:** **Shadmanova Nargiza Abitovna**  
Doctor of Medical Sciences, docent  
**Khegay Tatiana Rudolfovna**  
Doctor of Medical Sciences, professor

**Lead organization:** **Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections of the Federal Budgetary Institution of Science**

Defense will take place « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 at \_\_\_\_ at the meeting of Single Scientific Council DSc.04/30.12. 2019.Tib.30.01 at the Tashkent Medical Academy, The Republican specialized scientific practical medical center of epidemiology, microbiology, infectious and parasitic diseases (Address: 100109, Tashkent city, Farobi 2. Tel/Fax: (+99878) 150-78-25, e-mail: [tta2005@mail.ru](mailto:tta2005@mail.ru)).

Dissertation can be reviewed at the information Resource Center of Tashkent Medical Academy (is registered under number No \_\_\_\_\_) (Address: 100109, Tashkent, Farobi str., 2. Phone/Fax: (+99871)150-78-14).

Abstract of dissertation sent out on « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 y.

(mailing report No \_\_\_\_\_ on « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022y).

**L.N. Tuychiev**

Vice-chairman of the one-time scientific council on awarding of scientific degrees, Doctor of Medical Sciences, Professor

**N.U. Tadjieva**

Scientific secretary of the one-time scientific council on awarding of scientific degrees, Doctor of Medical Sciences, Associate Professor

**N.S. Atabekov**

Chairman of a one-time scientific council on awarding of scientific degrees, Doctor of Medical Sciences

## INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

**The aim of the research work** is to assess the significance of determining the circular covalently closed DNA of the hepatitis B virus as a marker for detecting the latent form of viral hepatitis B in patients with hepatitis of different etiology, to analyze the molecular biological characteristics of the HBV in the occult form of the disease.

**The object of the research work** - 79 patients aged 19-63 with diagnoses of chronic viral hepatitis B, C, D, hepatitis of unknown etiology, as well as healthy liver donors who were treated at the clinic of the Research Institute of Virology in 2013-2018.

**Scientific novelty of the research was as follows:**

carried out adaptation of the real-time PCR method for determining the presence of the circular covalently closed DNA of the hepatitis B virus;

shown the diagnostic significance of the circular covalently closed DNA of the hepatitis B virus as an important marker in the diagnosis of the latent form of viral hepatitis B;

genotyping of the hepatitis B virus circular region was carried out using the Sanger sequencing method;

determined the significant role of the occult form of viral hepatitis B in the structure of hepatitis of unknown etiology as a considerable reason;

the nucleotide identity of the Pre-S1/Pre-S2/S region of subtypes D1, D2 and D3 of the hepatitis B virus was established by phylogenetic analysis;

shows the presence of specific mutations in nucleotide sequences obtained from patients with latent form of viral hepatitis B.

**Implementation of the results of research.** Based on the results of the scientific research of studying the determination of the presence of circular covalently closed HBV DNA in latent forms of viral hepatitis B:

approved methodological recommendations "Modified method for diagnosing the occult form of viral hepatitis B" (approved by the Ministry of Health No. 8n-r/44 of February 7, 2020). The results made it possible to diagnose the latent form of viral hepatitis B among patients diagnosed with hepatitis of unknown etiology.

The results of the study aimed at determining the presence of circular covalently closed HBV DNA for the diagnosis of latent forms of viral hepatitis B have been introduced into health care, in particular, in the practice of the Samarkand and Namangan Regional Infectious Diseases Hospitals (Certificate of the Ministry of Health No. 8n-d/35 dated February 28, 2020). The results obtained made it possible to improve the quality of life of patients, reduce the number of unfavorable outcomes, and prescribe etiotropic therapy to patients. Economic efficiency is achieved by reducing the cost of hospitalization of patients, reducing the number of days of disability.

**Structure and volume of the dissertation.** The dissertation consists of the introduction, four chapters, conclusion and list of used literature. The dissertation presented on 105 pages.

**ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ**  
**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ**  
**LIST OF PUBLISHED WORKS**

**I бўлим (I часть; part I)**

1. Семенов А.В., Останкова Ю.В., Файзуллаев Х.Н., Козлов А.В., Мусабаев Е.И., Казакова Е.И., Арег А. Тотолян. Молекулярно-биологические маркеры гепатита В у пациентов с фиброзом // циррозом печени в Узбекистане // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - Москва, 2016. - №5. - С.34-43. (14.00.00; №49).

2. Семенов А.В., Останкова Ю.В., Казакова Е.И., Файзуллаев Х.Н., Козлов А.В., Мусабаев Е.И., Арег А. Тотолян. Кольцевая ковалентно замкнутая ДНК ВГВ как маркер распространенности окултального гепатита В у пациентов с инфекциями HBV, HDV, HCV в Узбекистане // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - Москва, 2016. - №5. - С. 43-49. (14.00.00; №49).

3. Казакова Е.И., Мусабаев Э.И. Диагностическая важность определения кольцевой ковалентно замкнутой ДНК у пациентов с хроническими гепатитами // Инфекция, иммунитет и фармакология. Узбекистан, 2018. - №2. - С.22-26. (14.00.00; №15).

4. Volkova N.N., Kazakova E.I. The Significance of M2BPGi Marker and CCC DNA HBV in Hepatitis of Unknown Etiology // American Journal of medicine and medical science. 2020. - 10(5). – P.290-292. p-ISSN: 2165-901X e-ISSN: 2165-9036 doi:10.5923/j.ajmms.20201005.03. (14.00.00; №1).

**II бўлим (II часть; part II)**

5. Kazakova E. Diagnostic importance of CCC DNA for patients with chronic hepatitis C and D // Сборник тезисов конференции «Инфекции, иммунитет и гастроэнтерология, вопросы этиологии, диагностики, терапии и профилактики». Ташкент, 2018. - С. 71.

6. Мусабаев Э.И., Казакова Е.И., Семёнов А.В., Останкова Ю.В. Диагностическая важность определения кольцевой ковалентно замкнутой ДНК у пациентов с хроническими гепатитами // Сборник трудов Международной научно-практической конференции Молекулярная диагностика. - г. Минск, Беларусь. – 2018. - С. 286-287.

7. Kazakova E.I., Musabaev E.I. Molecular-genetic characteristics of occult hepatitis B in Uzbekistan // European hepatitis conference, Italy, Rome. Reviews in antiretroviral Therapy & infectious diseases. - Rome - 2019. - №5. - P. 109.

8. Kazakova E. Molecular-genetic characteristics of occult hepatitis B in Uzbekistan // APASL single topic conference abstract book. - Baku. - 2019. - P. 27.

9. Казакова Е.И., Мусабаев Э.И., Рахимова В.Ш. Модифицированная методика диагностики окултальной формы вирусного гепатита В. Методические рекомендации. – Ташкент, 2020. 19 с.

Автореферат «Тошкент тиббиёт академияси ахборотномаси» журнали таҳририятида таҳрирдан ўтказилиб, ўзбек, рус ва инглиз тилларидаги матнлар ўзаро мувофиқлаштирилди.

Босишга рухсат этилди: 28.03.2022  
Бичими: 60x84 1/8 «Times New Roman»  
гарнитурда рақамли босма усулда босилди.  
Шартли босма табағи 3. Адади: 100. Буюртма: № 19

100060, Тошкент, Я. Ғуломов кўчаси, 74.  
Тел.: +998 90 9722279, [www.tiraj.uz](http://www.tiraj.uz)

«TOP IMAGE MEDIA»  
босмаҳонасида чоп этилди.