

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГРИППА
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

**ЕЛПАЕВА
Екатерина Александровна**

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА В,
ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА И
ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ**

Специальность 03.02.02 — вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
к.б.н.
Грудинин Михаил Павлович

Санкт-Петербург – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Молекулярная биология вируса гепатита В.....	11
1.1.1 Организация генома.....	12
1.1.2 Вирусные белки.....	14
1.1.3 Жизненный цикл ВГВ.....	17
1.1.4 Репликация ВГВ.....	19
1.1.5 Серологические маркеры ВГВ-инфекции.....	21
1.2 Молекулярные варианты ВГВ.....	23
1.2.1 Генотипы и серотипы ВГВ.....	24
1.2.2 Мутанты S гена.....	28
1.2.3 Мутанты preCore и Core гена.....	30
1.2.4 Мутанты X гена.....	32
1.2.5 Мутации устойчивости к аналогам нуклеозидов/нуклеотидов.....	32
1.3 Диагностика ВГВ.....	37
1.4 Профилактика гепатита В.....	39
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1 Пациенты.....	41
2.2 Серологические маркеры и клинические показатели.....	41
2.3 Выделение ДНК ВГВ и ПЦР.....	41
2.4 Секвенирование фрагмента гена полимеразы для определения мутаций устойчивости к АН.....	42
2.4.1 Амплификация участков генома ВГВ.....	42
2.4.2 Анализ и очистка продуктов ПЦР.....	42
2.4.3 Секвенирующая ПЦР.....	43
2.4.4 Очистка продуктов секвенирующей ПЦР.....	43
2.4.5 Анализ продуктов реакции секвенирования.....	44
2.4.6 Обработка секвенированных последовательностей.....	44
2.5 Определение мутаций устойчивости к аналогам нуклеозидов методом ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green.....	45
2.5.1 Постановка ПЦР и расчет эффективности ПЦР.....	45
2.5.2 Клонирование ПЦР-продуктов в вектор pUC18.....	46
2.5.3 Получение культуры компетентных бактериальных клеток <i>E.coli</i>	47
2.5.4 Трансформация культуры бактериальных клеток плазмидной ДНК.....	47
2.5.5 Щелочное выделение плазмидной ДНК.....	47
2.5.6 Рестрикционный анализ плазмидной ДНК.....	48
2.5.7 Секвенирование ДНК.....	48
2.6 Определение нуклеотидной последовательности геномов ВГВ методом NGS секвенирования.....	49

2.6.1	<i>Амплификация полных геномов ВГВ</i>	49
2.6.2	<i>Анализ и очистка продуктов ПЦР</i>	49
2.6.3	<i>Секвенирование ДНК ВГВ</i>	49
2.6.4	<i>Обработка секвенированных последовательностей</i>	50
2.6.5	<i>Построение филогенетических деревьев</i>	50
2.7	<i>Статистический анализ</i>	51
3	РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	52
3.1	<i>Определение генотипа ВГВ и уровня вирусной нагрузки у пациентов с ХГВ в Северо-Западном регионе РФ</i>	52
3.2	<i>Выявление мутантных форм ВГВ</i>	56
3.2.1	<i>Определение мутаций в гене полимеразы ВГВ, определяющих устойчивость к АН, методом прямого секвенирования</i>	56
3.2.2	<i>Выявление мутаций, приводящих к изменениям YMDD- мотива ВГВ, методом ПЦР в реальном времени</i>	65
3.2.3	<i>NGS секвенирование геномов ВГВ</i>	77
3.2.4	<i>Мутации S гена</i>	82
3.2.5	<i>Мутации preCore/Core и X генов</i>	83
	<i>Заключение</i>	87
	ВЫВОДЫ	90
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	91
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	93
	СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	117

ВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Вирусный гепатит В является одной из глобальных проблем мирового здравоохранения. В настоящее время в мире вирусом гепатита В (ВГВ) инфицированы более 240 миллионов человек, и более полумиллиона носителей вируса ежегодно умирает от тяжелых последствий инфекции таких, как печеночная недостаточность, цирроз печени (ЦП) и гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) [2, 56]. В России в последние годы, благодаря развитой программе вакцинации, случаи острого гепатита В (ОГВ) регистрируются все реже, однако заболеваемость хроническим вирусным гепатитом (ХГВ) не только остается на высоком уровне, но и продолжает возрастать. В Санкт-Петербурге и Ленинградской области ежегодно отмечают более высокие показатели заболеваемости ХГВ, чем в среднем по России [10, 11].

В последние десятилетия основные успехи в лечении гепатита В связаны с развитием знаний о молекулярно-биологических особенностях вируса. Показано, что одним из наиболее важных факторов, влияющих на тяжесть течения болезни и вероятность развития цирроза и ГЦК, является генотип ВГВ [77, 93]. Кроме того, эффективность противовирусного лечения также частично связана с генотипом вируса. В настоящее время выделяют десять генетических групп ВГВ, обозначенных как А-J генотипы [15, 77, 93, 127, 128, 130]. Распространенность генотипов ВГВ в мире неоднородна и варьирует в зависимости от географических регионов мира.

Генетическая гетерогенность вирусной популяции у пациента обусловлена двумя ключевыми факторами. Первый из них связан с адаптацией вируса к организму-хозяина и противостоянием противовирусной защите, обусловленной действием иммунной системы организма. Например, показано, что нуклеотидные несинонимические замены в preCore/Core и preS/S областях генома вируса гепатита В приводят к снижению уровня экспрессии вирусных белков HBeAg и

HBsAg, что, в свою очередь, приводит к ложноотрицательным результатам серологической диагностики [93, 115, 174].

Второй фактор связан с внешним воздействием, например при противовирусной терапии. Применяемое в настоящее время длительное лечение с помощью препаратов на основе аналогов нуклеозидов и нуклеотидов (АН) часто приводит к развитию лекарственной устойчивости [41, 56, 97]. Из-за наличия в геноме ВГВ перекрывающихся открытых рамок считывания (ОРС) замены в гене полимеразы могут потенциально влиять на антигенные свойства вируса и, как следствие, приводить к снижению эффективности вакцинации [30, 96, 192].

В связи с этим, чрезвычайную важность для определения точной картины заболевания и назначения своевременного лечения представляют данные о структуре генома ВГВ.

К сожалению, в настоящее время методы молекулярно-генетической диагностики ВГВ развиты недостаточно. Так, первая и единственная коммерческая диагностическая тест-система для определения генотипа ВГВ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) появилась только в 2013 году. Возможно, по этой причине сведения о молекулярно-эпидемиологической обстановке в регионах России остаются весьма отрывочными.

Раннее выявление мутаций устойчивости к АН имеет большое значение для определения стратегии лечения пациентов с ХГВ. В 2013 году стала доступна отечественная коммерческая тест-система для выявления мутаций устойчивости к АН «АмплиСенс® HBV-Resist-Seq». Этот метод основан на амплификации фрагмента гена полимеразы с последующим определением нуклеотидной последовательности методом секвенирования по Сенжеру. Однако данный метод имеет ряд недостатков. Во-первых, трудоемкость и использование ДНК-анализатора приводит к высокой конечной стоимости анализа. Во-вторых, невозможность определить минорные варианты популяции вируса, а также присутствие в одном образце различных вариантов ВГВ. В последние годы все больше исследований связаны с разработкой новых методов для выявления мутаций устойчивости. К наименее трудоемким, быстрым и доступным методам

относятся различные варианты проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени [48, 155, 184]. Недостатком этих методик является невозможность определять большое число точечных мутаций. Кроме вышеописанных методов в настоящее время существует много высокочувствительных технологий обнаружения мутаций устойчивости, таких как, метод обратной гибридизации с использованием олигонуклеотидных зондов (LiPA) [20, 124], масс-спектрометрический метод [78, 147], технология микрочипов [35, 58, 91], секвенирование нового поколения (NGS – next generation sequencing) [80, 125]. Однако эти методы требуют дорогостоящего оборудования и реактивов, поэтому их использование в клинических лабораториях пока не получило широкого применения. Не смотря на этот недостаток применение NGS-технологий для поиска генетических вариантов ВГВ могут быть полезны для понимания механизмов адаптации вируса и его эволюции.

Степень разработанности темы исследования.

Исследования, касающиеся распространенности генетических вариантов ВГВ и их клинической значимости, имеют большое значение не только для эпидемиологического надзора за инфекцией, но и для клинической практики. Однако подобных систематических исследований ВГВ на территории России до сих пор не проводится. Сведения о молекулярно-эпидемиологической обстановке в регионах РФ имеются лишь в отдельных публикациях групп исследователей под руководством Чуланова В.П. [9, 43], Мукомолова С.Л. и Шляхтенко Л.Н. [120, 157], Михайлова М.И. [112] и Эсауленко Е.В. [4].

Проблемами диагностики вирусного гепатита В в России занимались Морозов В.М., Писарева М.М. [135] и Чуланов В.П. [8]. Вопросы распространения мутантных форм ВГВ и их клинической значимости отражены в публикациях групп исследователей под руководством Чуланова В.П. [7] и Михайлова М.И. [3, 6].

Цель исследования. Идентификация и характеристика генетических вариантов вируса гепатита В, циркулирующего на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области.

Задачи исследования:

1. Определить распределение генотипов вируса гепатита В в Санкт-Петербурге и Ленинградской области в период с 2008 по 2014 год.
2. Выявить мутации в гене полимеразы вируса гепатита В, определяющие устойчивость к аналогам нуклеотидов/нуклеозидов у пациентов с хроническим гепатитом.
3. Разработать метод определения мутаций устойчивости в YMDD-мотиве полимеразы вируса гепатита В, основанный на ПЦР в реальном времени.
4. Применить полногеномное секвенирование нового поколения (NGS) для анализа структуры генома популяции ВГВ у пациентов, включая минорные варианты.
5. Провести анализ нуклеотидных замен в preCore/Core и preS/S областях генома вируса гепатита В, определяющих снижение синтеза вирусных белков (HBeAg и HBsAg).

Научная новизна исследования. Впервые разработан метод выявления мутации устойчивости к противовирусной терапии (rtM204I/V), основанный на ПЦР в реальном времени. Впервые для изучения популяции ВГВ в отдельном организме хозяина применено полногеномное секвенирование нового поколения (NGS).

Теоретическая и практическая значимость. Исследование географического распределения генотипов вируса гепатита В, а также выявление аминокислотных замен, приводящих к снижению концентрации серологических маркеров и появлению мутаций устойчивости к противовирусным препаратам, имеет важное практическое значение для прогнозирования тяжести течения заболевания и эффективности противовирусной терапии. Применение быстрых и точных методик для диагностики и мониторинга мутаций устойчивости вируса может помочь врачу-инфекционисту при выборе противовирусного терапевтического средства для лечения хронического гепатита В у пациентов. Разработанный метод определения мутаций устойчивости в YMDD-мотиве полимеразы может быть использован для создания диагностической тест-

системы. Применение технологии NGS для диагностики и мониторинга мутаций устойчивости вируса может помочь в решении практических и фундаментальных задач вирусологии и эпидемиологии.

Методология и методы исследования. В ходе проведения научной работы применялись стандартные биохимические, вирусологические, микробиологические, молекулярно-биологические и иммунологические методы. Для определения замены *rtM204I/V*, приводящей к устойчивости к АН, разработана оригинальная методика, основанная на ПЦР в реальном времени. Более подробно этапы проведения экспериментов отражены в разделе «Материалы и методы».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При длительном использовании нуклеозидных аналогов для лечения пациентов с хроническим гепатитом (ХГВ) формируются мутантные варианты ВГВ, обусловленные возникновением замен в области обратной транскриптазы гена полимеразы. У пациентов с ХГВ, длительно получавших противовирусные препараты на основе аналогов нуклеозидов (ламивудин, телбивудин, энтекавир) формируются missense мутации, которые приводят к образованию замен в YMDD-мотиве полимеразы (*rtM204I/V*), что клинически сопровождается возникновением резистентности и кросс-резистентности к данным препаратам.

2. У пациентов, не ответивших на противовирусную терапию аналогами нуклеозидов, для первичного скрининга замен *rtM204I/V* целесообразно использовать разработанный оригинальный метод на основе метода ПЦР в режиме реального времени.

3. Для повышения эффективности лечения у пациентов с обнаруженными мутациями устойчивости, а также мутациями в *preCore/Core* и *preS/S* областях генома, которые способны приводить к изменению структуры белков (HBeAg и HBsAg) и антигенных свойств вируса, необходимо проводить секвенирование нового поколения (NGS) с целью выявления квазивидов в популяции ВГВ.

Личный вклад автора в проведенное исследование состоит в самостоятельном планировании и проведении всех лабораторных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов. Методическая помощь была оказана сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России: Романовской-Романько Е.А. и Юхневой М.А. - при клонировании последовательностей ВГВ в вектор; Комиссаровым А.Б. и Фадеевым А.В. - при секвенировании методом Сенжера; Клотченко С.А. и Плотниковой М.А. - при NGS секвенировании геномов; Никитиной О.Е. – при подборе пациентов и характеристике клинического течения ХГВ; а также сотрудником лаборатории эволюционной геномики НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ Касьяновым А. С. – при обработке данных NGS секвенирования.

Степень достоверности и апробация материалов диссертации. Достоверность результатов исследований, проведенных автором, подтверждена статистическим анализом данных, полученных в процессе проведения исследования. Материалы диссертации были представлены на 2-ой Российско-Итальянской конференции "Социально опасные вирусные инфекции". (Великий Новгород, 2005); на 3-ей Российско-Итальянская конференция "Социально опасные вирусные инфекции" (Архангельск, 2006); на международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней» (Новосибирск, 2009); на 7-ой и 10-ой Российско-Итальянской научно-практической конференции «Актуальные вопросы социально-значимых вирусных инфекции» (Великий Новгород, 2009, 2011); на 3-ей и 4-ой Международной конференции по инфекционным болезням (Пекин, Китай, 2009, 2010); на II-м Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2010); на VII-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2010» (Москва, 2010); на научно-практической конференции-биеннале «Грипп: вирусология, эпидемиология, профилактика и лечение» (Санкт-Петербург, 2014); на конференции «Классический университет в

пространстве трансграничности на севере Европы: стратегия инновационного развития» (Петрозаводск, 2014); на XXI Объединенной Российской Гастроэнтерологической неделе (Москва, 2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и 9 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, двух глав результатов исследования и их обсуждения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка цитируемой литературы и списка иллюстраций. Работа иллюстрирована 16 рисунками и 14 таблицами. Список цитируемой литературы содержит 206 источников, в том числе 12 на русском и 191 на английском языках. Диссертация изложена в соответствии с общими требованиями к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утвержденными в ГОСТ Р 7.0.11.2011.

Работа поддержана грантами для молодых ученых и молодых кандидатов наук вузов и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга. Работа также выполнялась в рамках Государственных тем НИР и Государственного задания, выполняемых в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Молекулярная биология вируса гепатита В

ВГВ был открыт во второй половине XX века в результате обнаружения поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) у аборигенов в Австралии (так называемый «австралийский антиген») [22]. За это открытие Блумберг был награжден Нобелевской премией по медицине в 1976 году. Электронно-микроскопические исследования ткани печени больного желтухой показали, что HBsAg несут сферические частицы (частицы Дейна) [42], обладающие инфекционностью и антигенностью. Сейчас известно, что эти частицы – это полный вирион ВГВ.

Вирус гепатита В (ВГВ) принадлежит к семейству *Hepadnaviridae*. Это семейство содержит два рода: *Orthohepadnaviruses*, представители которого инфицируют млекопитающих, в том числе человека, и *Avihepadnaviruses*, инфицирующие птиц [97].

Гепаднавирусы преимущественно инфицируют клетки печени, однако существует все больше данных о том, что иммунная (лимфоидная) система также является важным местом для поддержания персистенции вируса [56]. Например, инфекция гепатита В у сурков может быть полностью ограничена лимфоидными клетками. У людей ВГВ геномы были обнаружены в периферических мононуклеарных клетках крови (ПМК). Вирус в ПМК был найден у пациентов с хроническим гепатитом после длительного подавления репликации ВГВ при помощи терапии АН, у пациентов после разрешения ОГВ, а также у новорожденных, которые были инфицированы от матерей с гепатитом В [56, 151]. Небольшое количество ДНК вирусов также может быть найдено в почках, и поджелудочной железе. Тем не менее, инфекция в этих местах не связана с внепеченочными заболеваниями [54].

1.1.1 Организация генома

Вирионы состоят из внутреннего нуклеокапсида диаметром 30-34 нм и липидной оболочки, в которой находятся три поверхностных гликопротеина: большой (LHBsAg, L или preS1), средний (MHBsAg, M или preS2) и малый (SHBsAg, HBsAg или S). Соотношение L, M и S белков в вирусной оболочке примерно 1:1:4 [21]. Нуклеокапсид содержит ядерный антиген или коровый белок (HBcAg), а также вирусный геном и белок P (ДНК-полимераза) (рис. 1.1).

Геном ВГВ состоит из кольцевой частично двухцепочечной ДНК размером около 3200 п.н. На 5'-конце минус-цепь ДНК ковалентно связана с белком P, который отвечает за синтез вирусной ДНК в инфицированных клетках [121]. Плюс-цепь более короткая, по сравнению с минус-цепью, и ее 5'-конец фиксирован в постоянной позиции (в 200 нуклеотидах от 5'-конца минус-цепи), в то время как положение 3'-конца может варьироваться (рис. 1.1).

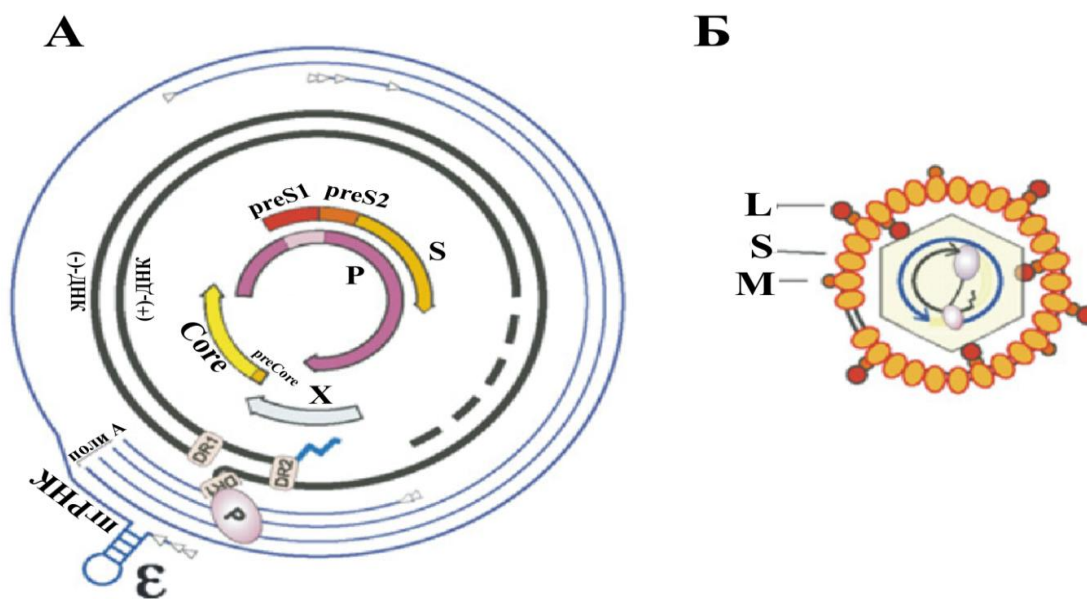


Рисунок 1.1 Схема строения вириона и организации генома ВГВ. (А) Организация генома. Геномная ДНК и четыре ОРС показаны в центре рисунка. Внешние линии - геномная и субгеномные РНК. Стрелками обозначены сайты начала транскрипции. ϵ – энкапсидационный сигнал. DR1 и DR2 – короткие повторы, размером 11 п.н., которые выступают в качестве сайтов инициации синтеза полноразмерной минус-цепи и короткой плюс-цепи, соответственно. PRE α и PRE β – посттранскрипционный регуляторный сигнал. (Б) Строение вириона. Нужно отметить, что preS-домен белка L может быть обращен как наружу, так и внутрь оболочки [121].

Геном ВГВ имеет четыре перекрывающиеся открытые рамки считывания (ОРС). 80% генома занимает ОРС для транскрипции прегеномной РНК, с которой транслируется полимеразы и НВсАg (рис. 1.2). Предшественник НВсАg – прекоровый белок, экспрессируется с другой мРНК, точка инициации которой расположена в 29-35 п.н. против хода транскрипции от точки инициации прегеномной РНК. Транскрипцию обеих этих РНК регулирует коровый промотор, который располагается вверх от Core гена. Белки оболочки транслируются с двух мРНК: большой транслируется с preS1 (L) мРНК размером 2.4 т.п.н., а средний и малый – с preS2/S (M, S) мРНК размером 2.1 т.п.н. Транскрипцию этих мРНК регулирует соответственно preS1- и preS2/S-промоторы. Синтез белка X происходит с мРНК размером 0.9 т.п.н. [55]. Все промоторы, за исключением промотора для preS1, не имеют ТАТА-боксы и, следовательно, синтезируют транскрипты с гетерогенного 5'-конца, что в случае S и preCore/Core промоторов кодируют различные белки: M и S, и preCore и Core/P, соответственно. Возможно, preCore/Core промотор на самом деле состоит из двух различных элементов промотора, что может объяснить результаты нескольких генетических экспериментов и существование природных мутантов, которые не экспрессируют НВсАg [93, 129].

Помимо четырех промоторов экспрессию генов регулирует 2 энхансера: ENI и ENII. ENI располагается выше X области и регулирует транскрипцию прегеномной РНК, гена S и гена X [59, 197, 198]. ENII, перекрывающийся с preCore/Core промотором, регулирует транскрипцию прегеномной РНК и preCore РНК [134, 194].

Транскрипция всех генов происходит в одном направлении и только с минус-цепи ДНК ВГВ и терминируется в общем для всех РНК поли(А)-сайте, который находится в Core гена. Интересно отметить, что поскольку Core промотор находится менее чем в 200 п.н. от этого поли(А)-сайта, сигнал полиаденилирования узнается, когда РНК полимеразы пройдет круг и подойдет к сайту терминации во второй раз [66].

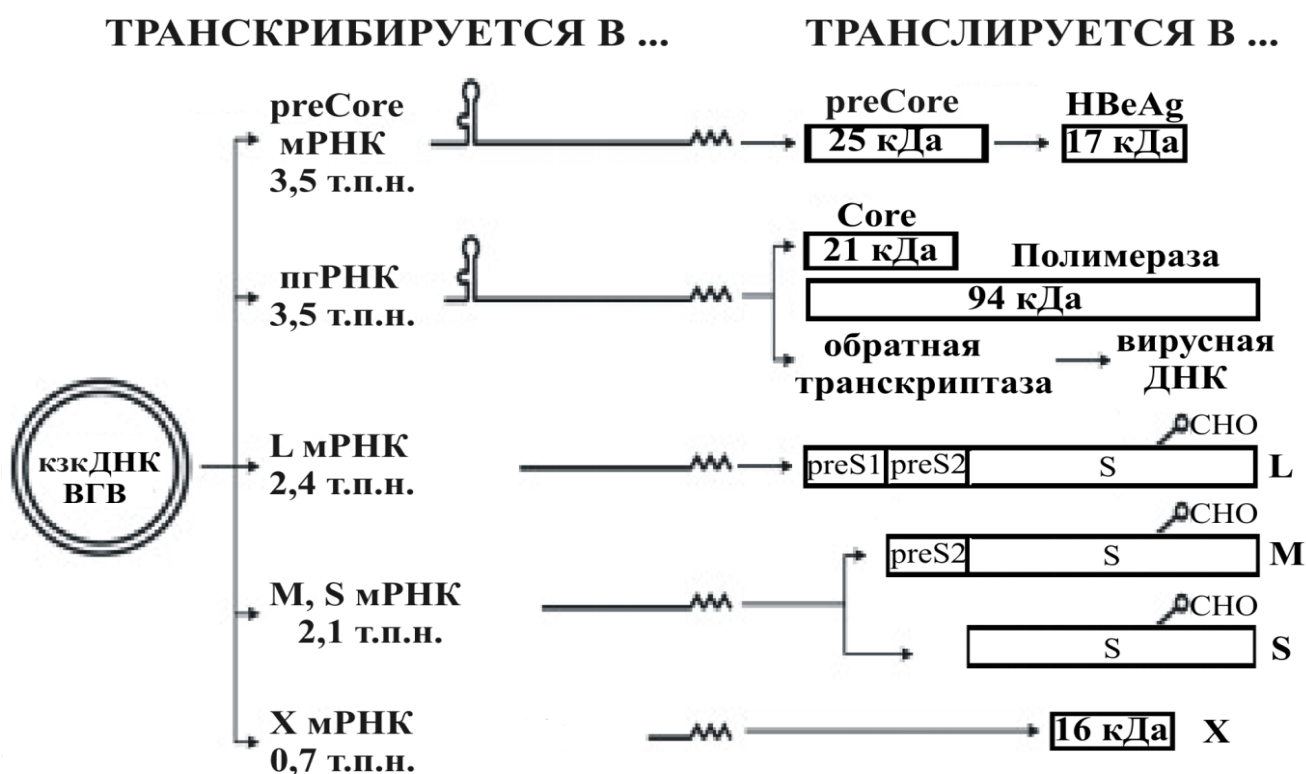


Рисунок 1.2 Схема транскрипции и трансляции генома ВГВ. Один транскрипт размером 3,5 т.п.н. выступает и в качестве прегенама и как мРНК для синтеза корового белка.

1.1.2 Вирусные белки

1.1.2.1 Белки оболочки

Как упоминалось выше, оболочка вириона состоит из трех поверхностных белков (LHBsAg или preS1; MHBsAg или preS2; SHBsAg или S), которые кодируются одной ОРС с общим стоп-кодоном (ТТА) и тремя отдельными сайтами начала трансляции (АТГ). Три белка оболочки выполняют две основные функции: обеспечивают белковым компонентом вирусную оболочку и собираются в агрегаты, которые секретируются, как субвирусные частицы. Из-за наличия S области во всех трех белках они имеют ряд общих свойств. Во-первых, существование топогенетических сигнала I и II, которые определяют ориентацию этих белков в липидном бислое. Во-вторых, наличие гидрофобного С-конца, который встроен в ЭР за счет сигнальной последовательности в S-домене.

При этом S пересекает мембрану эндоплазматического ретикулума (ЭР), по крайней мере, дважды (рис. 1.3). Таким образом, N- и С-конец, а также область, расположенная между I и III трансмембранными доменами, экспонированы в люмен (соответственно, наружу в зрелом вирионе), тогда как другие области S экспонированы в цитозоль [100].

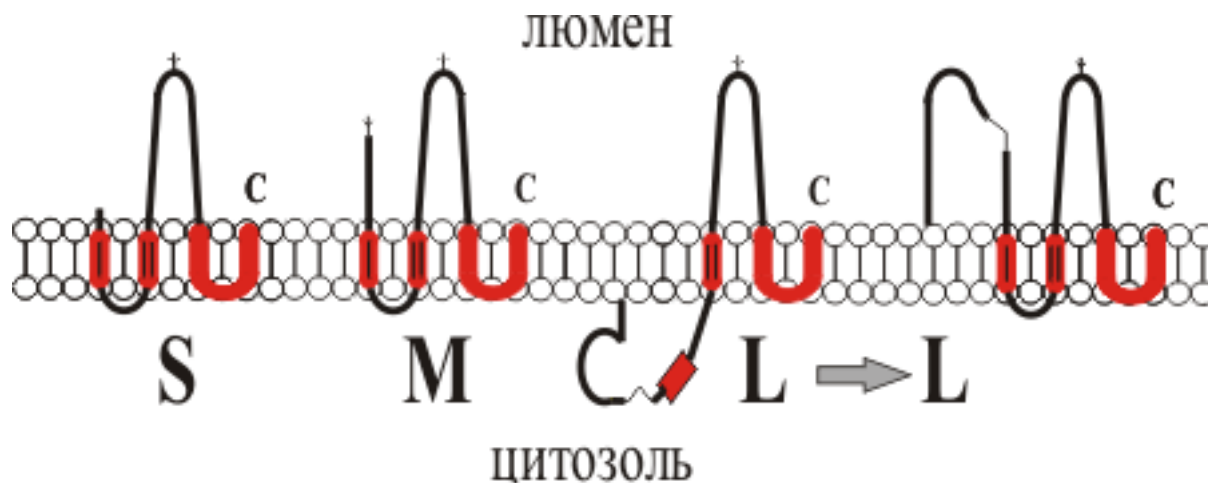


Рисунок 1.3 Трансмембранная топология белков оболочки. Y-образный символ обозначает сайты гликозилирования.

Интересно, что приблизительно у половины молекул L preS области остаются экспонированными в цитозоль, тогда как у другой половины молекул L preS область расположена в люмене. Такая двойственная топология белка L связана с его мультифункциональной ролью в жизненном цикле вируса [26].

Все три белка подвергаются посттрансляционному гликозилированию Asn-146. При этом белок M содержит второй сайт гликозилирования Asn-4. L и M белки содержат модифицированный N-конец (L несет мириститат-группу, а M – ацетилирован).

HBsAg один из самых наиболее часто применяемых маркеров ВГВ, поскольку его выявление в сыворотке крови пациентов не только опережает появление клинических симптомов, но и является индикатором стадии ВГВ-инфекции (подробно в п. 1.1.5). Кроме того, HBsAg имеет важнейшее значение, так как содержит основные нейтрализующие эпитопы и поэтому используется в коммерческих вакцинах против гепатита В.

Роль М в репликации ВГВ еще не известна, потому что этот белок не требуется для сборки вириона. И это несмотря на то, что включают большое количество Т- и В-клеточных эпитопов. Белок L, благодаря двойкой направленности preS-домена, играет ключевую роль в связывании вируса с рецепторами клетки-хозяина, в сборке вириона и его освобождении из клетки [36, 75]. L и M белки способны активировать транскрипцию из выбранных промоторов в трансфицированных клетках. Первоначально было показано, что наличие укороченных форм этих белков в тканях пациентов с ХГВ способствуют развитию ГЦК. Позднее было определено, что и полная форма L белка также может трансаktivировать выбранные промоторы. Возможно, это связано с тем, что накопление L в ЭР может привести к ЭР стрессу и повышать экспрессию M и S. Трансактивационный потенциал поверхностных белков ВГВ может отражать адаптацию для облегчения выживания инфицированных гепатоцитов, что в долгосрочной перспективе может привести к трансформации небольшого числа инфицированных гепатоцитов.

1.1.2.2 HBc и HBe белки

PreCore/Core область кодирует два белка: HBcAg и HBeAg. Эти белки являются продуктом альтернативной инициации трансляции с двух AUG кодонов. С внутреннего AUG кодона строится Core белок размером 21кДа, который является структурным полипептидом вирусного капсида. В то время как, с AUG кодона, который расположен выше по цепи, производится белок preCore размером 24 кДа. PreCore область кодирует сигнальную последовательность, которая направляет цепь по секреторному пути. Предшественник HBeAg переносится в аппарат Гольджи, расщепляется клеточными протеазами, производя HBeAg, который секретируется в кровь. HBeAg не участвует в сборке вириона, и пока его функция не известна. Предполагают, что он играет роль в механизмах ускользания вируса от иммунного ответа организма [113, 143]. HBeAg является важным маркером ХГВ (подробно в п. 1.1.5).

1.1.2.3 Полимераза

Р область кодирует мультифункциональный белок - вирусную полимеразу, которая участвует в синтезе ДНК и РНК энкапсидации. Полимераза ВГВ состоит из четырех доменов: N-концевой домен, который выполняет функцию праймера при инициации синтеза минус-цепи ДНК; спейсерный домен – имеет высококонсервативную последовательность, функция его неизвестна; RT (обратная транскриптаза) – занимает основную часть полимеразы, содержит YMDD мотив, который играет существенную роль в формировании устойчивости вируса к лекарственным препаратам (подробно в п. 1.2.5); С-концевой домен – обладает активностью РНКазы Н [86, 96, 97, 141, 161].

1.1.2.4 Белок X

X ORF кодирует белок X (НВх), состоящий из 154 а.к., который моделирует передачу сигнала от клетки и может прямо или косвенно влиять на хозяина и экспрессию вирусных генов [54, 55]. Активность белка X необходима для репликации *in vivo* и распространения вируса [97, 203]. Белок X благодаря своему участию в активации большого количества сигнальных путей и клеточных генов может играть решающую роль в гепатоканцерогенезе [166]. Известно, что белок X стимулирует клеточные промоторы и энхансеры содержащие сайты связывания для транскрипционных факторов NFκB, AP1, AP2, клеточных промоторов генов, которые связаны с клеточной пролиферацией (например, интерлейкин-8, фактор некроза опухоли). Также показана связь белка X с клеточным опухолевым антигеном p53 [166, 187].

1.1.3 Жизненный цикл ВГВ

На рисунке 1.4 показаны основные стадии гепаднавирусного жизненного цикла, главной особенностью которого является репликация ДНК посредством обратной транскрипции РНК. Механизмы внедрения ВГВ в гепатоциты до конца неизвестны. Попытки определить клеточный рецептор для ВГВ привели к обнаружению нескольких кандидатов на эту роль, включая рецептор иммуноглобулина А [139], рецептор для интерлейкина-6 [122], асиалогликопротеиновый рецептор [176], трансферриновый рецептор [50],

гликопротеин gp180 (карбоксипептидаза D) [25], кавеолин-1 [103], полипептид NTCP, отвечающий за транспорт натрий таурохолата [189]. Однако, несмотря на большое число сообщений о потенциальных клеточных рецепторах ВГВ, ни один из них сам по себе не является достаточным для осуществления продуктивной инфекции. Вполне вероятно, что для проникновения ВГВ в клетку требуется участие нескольких клеточных белков.

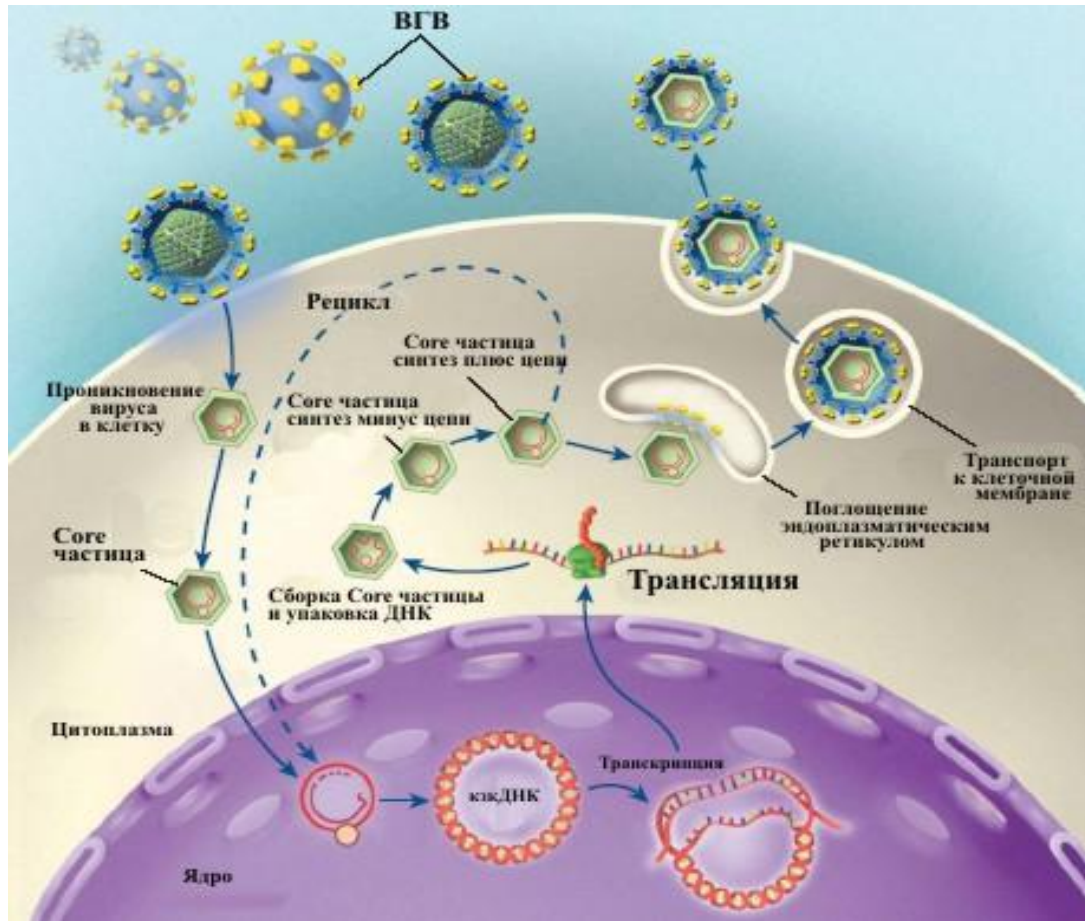


Рисунок 1.4 Репликативный цикл гепаднавирусов [54].

Вирион ВГВ прикрепляется к клеточным рецепторам и методом эндоцитоза проникает в клетку. После удаления вирусной оболочки, соге частица доставляется к ядерным порам и через них ДНК вируса попадает в нуклеоплазму [140]. Этот транспорт опосредован сигналом ядерной локализации на белках капсида и энкапсидированный вирусный геном транспортируется в ядро используя рецепторы $\text{Imr-}\beta/\text{Imr-}\alpha$. Затем геномы ДНК при помощи клеточных факторов преобразуются в ковалентно-замкнутую круговую форму (кзкДНК), которая остается в качестве эписомальной минихромосомы [23, 123]. кзкДНК

связывается со специфическими гепатоцитарными транскрипционными факторами и служит в качестве матрицы для клеточной РНК-полимеразы II. В результате этого создаются прегеномная и субгеномные мРНК. В эукариотических клетках перед экспортом мРНК в цитоплазму происходит сплайсинг (удаление интронов из генов). ВГВ меняет этот механизм при помощи специфического регуляторного элемента (PRE) и транспортирует в цитоплазму несплайсированную мРНК [39, 73, 158, 196].

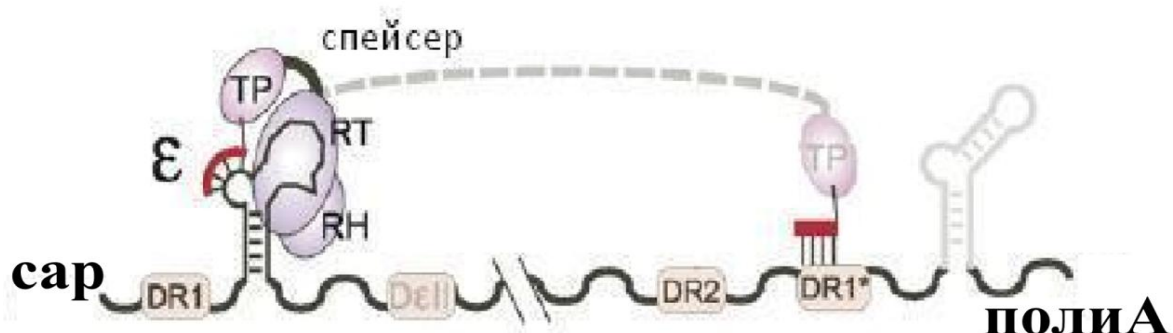
Все вирусные РНК транспортируются в цитоплазму, где синтезируются вирусные белки оболочки, полимеразы, НВсАg и белок X, а также прекордовый полипептид. Далее в цитоплазме происходит сборка нуклеокапсида, в ходе этого процесса одна молекула геномной РНК включена в сборку вирусного ядра. После энкапсидации РНК начинается транскрипция. Синтез двух нитей ДНК является последовательным. Первая нить ДНК производится из энкапсидированной РНК-матрицы. Во время или после синтеза этой цепи РНК-матрица деградирует и начинается синтез второй нити ДНК с использованием новой первой цепи ДНК в качестве матрицы. Некоторые Core-частицы зрелого генома транспортируются обратно в ядро, где новые ДНК-геномы могут быть конвертированы в ковалентно замкнутую кольцевую ДНК (кзкДНК). Это необходимо для поддержания стабильного внутриядерного хранилища матрицы для транскрипции [162, 188]. Однако, большинство Core-частиц направляется к внутренней стороне клеточной мембраны для создания оболочки вируса. После приобретения липопротеиновой оболочки содержащей в себе L, M и S антигены вирус выходит из клетки.

1.1.4 Репликация ВГВ

Репликация ВГВ протекает через стадию обратной транскрипции прегеномной РНК (пгРНК). Основной стадией этого процесса является связывание белка Р со шпилькой на 5'-конце пгРНК (рис. 1.5), которая функционально является сигналом энкапсидации (ϵ) [76, 136, 137]. Затем комплекс полимеразы-РНК упаковывается в капсидную оболочку. В этом процессе немаловажную роль играет клеточный шаперон Hsp90, который

поддерживает идеальную для образования комплекса с ϵ конформацию полимеразы [61, 71].

А Инициация обратной транскрипции



Б Праймирование *in vitro*

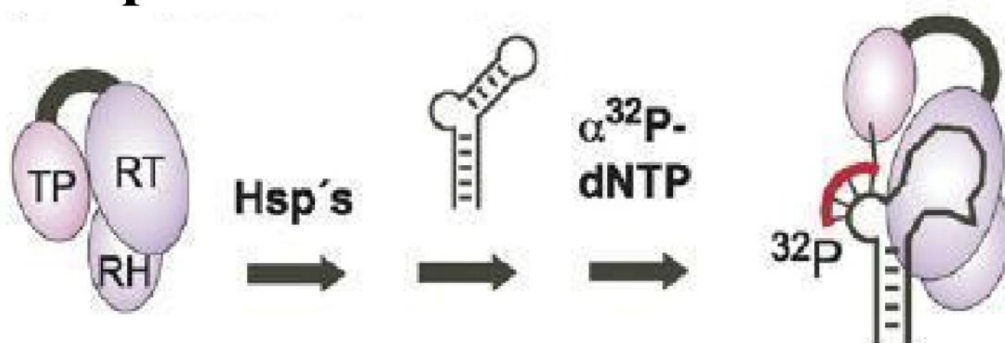


Рисунок 1.5 Инициация обратной транскрипции и образование комплекса полимеразы с ϵ [121].

Последовательность, содержащая ϵ , на пгРНК находится и на 5'- и на 3'-конце. Хотя для репликации необходима одна копия ϵ , функции второй неизвестны [21, 121, 144]. Кроме энкапсидации пгРНК, ϵ активно участвует в инициации синтеза вирусной ДНК [21, 121]. Интересной особенностью этого процесса является то, что полимеразы выступают как затравка (остаток тирозина на N-конце полимеразы, является субстратом для образования фосфодиэфирной связи с 5'-концевым нуклеотидом минус-цепи ДНК). Сначала производится короткий (3-4 нуклеотида) праймер, матрицей для синтеза которого является выпуклая область между стеблями шпильки [181]. Затем комплекс полимеразы с праймером переносится к комплементарной области 3'-DR1 [167, 182]. После этого праймер достраивается до полноразмерной минус-цепи ДНК и, благодаря РНКазной активности все того же белка Р, РНК-матрица деградирует (рис. 1.5).

Остается лишь короткая последовательность на 5'-конце пРНК, размером 15-18 нуклеотидов (DR1), которая переносится к комплементарному участку DR2 для синтеза плюс-цепи ДНК [92, 99]. Рост плюс-цепи ДНК прекращается при достижении 5'-конца минус-цепи и синтез ведется с 3'-конца минус-цепи [98]. Таким образом, образуется кольцевая частично двухцепочечная ДНК.

кзкДНК собирается из линейной двухцепочечной ДНК, которая в свою очередь образуется при синтезе плюс-цепи ДНК от изначального местоположения праймера в 3'-конце минус-цепи (без переноса от DR1 к DR2). Этот процесс был назван иллегитимной репликацией [160, 190, 191].

Линейная форма ДНК ВГВ также участвует в негомологичной рекомбинации с клеточной ДНК, в результате существуют различные формы интегрированной гепаднавирусной ДНК [64, 190].

1.1.5 Серологические маркеры ВГВ-инфекции

Характер протекания ВГВ-инфекции, как правило, состоит из четырех основных стадий (рис. 1.6): иммунная толерантность, иммунная очистка (наличие HBeAg), неактивное носительство и реактивация (отсутствие HBeAg). Стоит отметить, что не все пациенты с ХГВ проходят через каждую фазу [193]. Наличие или отсутствие HBeAg не является индикатором активной вирусной репликации, но показывает на каком уровне находится репликация ВГВ.

Первая стадия характеризуется наличием HBeAg, высоким уровнем ДНК ВГВ в сыворотке крови, нормальным уровнем аланинаминотрансферазы (АЛТ) и минимальной степенью фиброза. Эта фаза характерна для пациентов с перинатально приобретенной ВГВ инфекцией. Для второй фазы свойственно наличие HBeAg, HBsAg, высокий или колеблющийся уровень ДНК ВГВ, персистирующий или скачкообразно повышающийся уровень аминотрансфераз и активное воспаление при биопсии печени. Повышение уровня АЛТ обусловлено лизисом инфицированных гепатоцитов из-за увеличения количества Т-клеток, как иммунный ответ на наличие HBeAg и HBsAg. Во время этой фазы частота и жесткость обострений коррелирует с риском развития ЦП и ГЦК. Также отмечено, что резкое увеличение титра АЛТ и колеблющийся уровень ДНК ВГВ в

сыворотке крови (пунктирная линия на рис. 1.6) может происходить даже после HBeAg-сероконверсии. Высокий уровень АЛТ, генотип ВГВ, резкие обострения болезни и даже возраст и этническая принадлежность пациента могут влиять на скорость HBeAg-сероконверсии [41, 77, 85, 93].

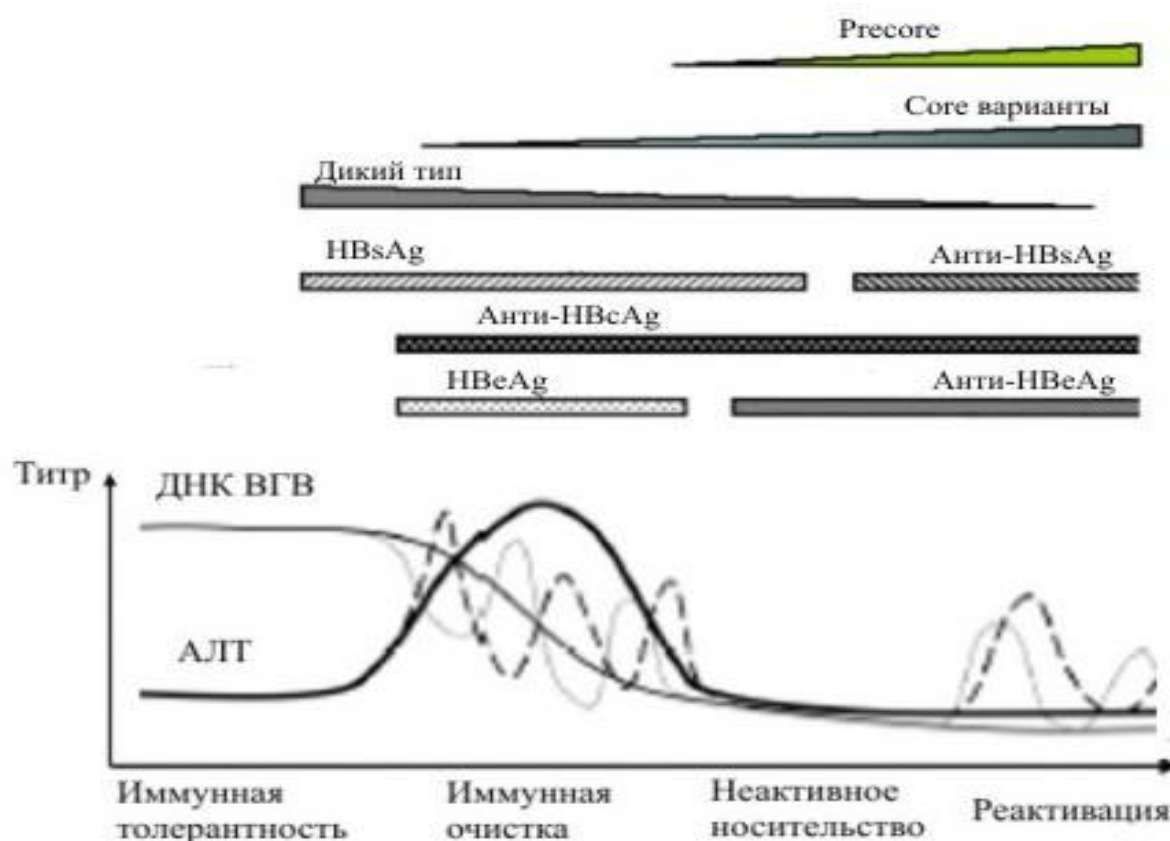


Рисунок 1.6 Профиль появления и исчезновения пяти серологических маркеров инфекции ВГВ.

Третья фаза (стадия неактивного носительства) характеризуется отсутствием HBeAg, наличием антител к HBeAg и HBsAg (AbHBe и AbHBs), постоянным нормальным уровнем трансаминаз и низким или недетектируемым уровнем ДНК ВГВ (менее 10^5 МЕ/мл). Биопсия печени обычно показывает минимальный фиброз, но неактивный цирроз может наблюдаться у пациентов, которые имели тяжелые повреждения печени во время предыдущей фазы. Состояние неактивного носительства может продолжаться десятилетия. В этом случае прогноз течения болезни обычно благоприятен, особенно, если эта стадия

достигается рано. По этим причинам, HBeAg-сероконверсия традиционно используется в качестве важной терапевтической конечной точки в управлении HBeAg-положительного ХГВ.

Стадии реактивации присущи отсутствие HBeAg, наличие AbHBe и AbHBs, детектируемый уровень ДНК ВГВ, увеличение уровня АЛТ и некротическое воспаление печени. Эти печеночные вспышки связаны с возрождением иммунитета организма хозяина против инфицированных гепатоцитов и могут осложниться печеночной недостаточностью у 2-3% пациентов. Эти побочные эффекты обычно приводят к развитию фиброза, и со временем к циррозу [41, 85].

В Западных странах ВГВ обычно передается во взрослом возрасте при контакте с инфицированной кровью, в том числе через сексуальные контакты или при введении наркотических средств, и сразу же попадает в иммунноактивную фазу. Недавние исследования из США, Европы, Азии и России показали увеличение случаев HBeAg-негативного хронического гепатита и уменьшение HBeAg-положительного. Это может быть связано с уменьшением новых случаев ВГВ и со старением существующих носителей. Этот сдвиг вносит изменения в стратегию лечения [11, 41, 85, 93, 193].

1.2 Молекулярные варианты ВГВ

Генетическая эволюция ВГВ определяется двумя важными особенностями жизненного цикла вируса. Во-первых, высокая генетическая стабильность ВГВ достигается за счет чрезвычайно эффективного использования короткого генома. Наличие перекрывающихся рамок считывания, многочисленных регуляторных, репликативных и морфогенетических элементов, а также отсутствие некодирующихся областей ограничивает формирование жизнеспособных мутаций ВГВ. С другой стороны, использование обратной транскриптазы без 3'→5'-корректирующей функции при репликации ВГВ определяет высокую частоту мутаций (более $2 \cdot 10^{-5}$ замен оснований/сайт в год) [28, 93]. Контроль достигается за счет того, что только успешно транскрибируемые и обработанные

геномы, т.е. частично двунитевые ДНК упаковываются в секретируемый вирусный капсид.

1.2.1 Генотипы и серотипы ВГВ

Филогенетический анализ полных нуклеотидных последовательностей, полученных из различных частей мира, позволил разделить ВГВ на десять генетических групп, обозначенных как А-*J* генотипы, с дивергенцией более 8% между генотипами и менее 4% между субгенотипами [15, 77, 93, 127, 130].

Ввиду неоднородности распределения генотипов в различных регионах мира, можно проследить происхождение вируса, а также пути его распространения в связи с миграцией населения. Генотип А широко распространен по всему миру, однако наиболее часто встречается к югу от Сахары в Африке (генотип А1), в Северо-Восточной Европе (генотип А2), в Западной Африке (генотип А3); генотипы В и С преобладают в Азиатско-Тихоокеанском регионе, однако частота распространения этих генотипов могут меняться среди различных стран. Например, ВГВ генотипа С (ВГВ-С) превалирует над ВГВ генотипа В (ВГВ-В) в Корее, Китае, Японии. В то время как ВГВ-В чаще встречается в Тайване и Вьетнаме. Генотип В имеет шесть субгенотипов В1-В6. Генотип В1 найден в Японии, В2-В5 и В7 в Восточной Азии, В6 – у коренных народов Арктического региона, включая Аляску, Северную Канаду и Гренландию [56, 85, 93, 104, 127, 153].

Генотип D имеет 5 субгенотипов (D1- D5) и доминирует в Средиземноморской области, Европе, Африке и Индии; генотип E характерен для Западной Африки; генотип F имеет 4 субгенотипа и распространен среди аборигенов Америки и в Полинезии; генотип G найден во Франции, Германии и США; генотип H – в Центральной Америке и Мехико; генотип I – в Лаосе и Вьетнаме. И недавно был выделен еще генотип J из Японии [93, 153].

Наряду с определением генотипов ВГВ подразделяется на серотипы (или субтипы), которые характеризуют их антигенные свойства. Было определено существование общей *a* детерминанты HBsAg и, по крайней мере, двух взаимно исключающих субдетерминант – *d/y* и *w/r* [24]. Это позволило установить четыре

основных серотипа ВГВ: *adw*, *ayw*, *adr* и *ayr*. С учетом данных о ряде аминокислотных замен, приводящих к образованию дополнительных субдетерминант, HBsAg классифицируется девяти серотипов: *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4q-*, *adrq+* и *adrq-*. *d/y* субтип определяется единственной нуклеотидной заменой в позиции 365 в гене S: замена А на G приводит к замене лизина на аргинин в кодоне 122 и, соответственно, к смене детерминанты с *d* на *y*. Нуклеотид в позиции 476 определяет детерминанту *w/r*: в результате замены А на G лизин меняется на аргинин в кодоне 160 и, следовательно, *w* меняется на *r*. При помощи секвенирования S гена ВГВ было выявлено, что в 127 положении аминокислоты *w1/w2*, *w3*, *w4* кодировали пролин, треонин и лейцин, соответственно. Детерминанта *q* экспрессируется штаммами ВГВ, имеющими *ad4* и *adr* [104]. Все серотипы имеют разное географическое распределение и широко используются в качестве эпидемиологических маркеров [104, 128, 164].

a детерминанта – часть большого гидрофильного региона (major hydrophilic region – MHR) HBsAg и ее третичная структура определяет его антигенные свойства [117]. *a* детерминанта имеет особое значение, так как это доминантный эпитопный кластер ВГВ, с которым происходит связывание большинства AbHBs, присутствующих в гипериммунной сыворотке. Кроме того, это консервативный регион для всех серотипов ВГВ, по этим причинам HBsAg является ведущим компонентом современных вакцин [104]. Не смотря на то, что генетический анализ не выявил четкого соответствия между генотипами и субтипами, некоторые субтипы свойственны определенным генотипам. ВГВ субтипа *adw2* свойственны в основном А, В, G генотипам, но могут принадлежать С и D генотипам. Генотипы А и В содержат также *ayw1* серотип. Все штаммы ВГВ *adr* и *ayr* соответствуют генотипу С. ВГВ субтипа *adw4q-* свойственны генотипам F и H. Серотипы *ayw2* и *ayw3* найдены только у генотипа D, а *ayw4* у генотипа E [15, 104, 127, 128, 164].

Во многих исследованиях можно проследить зависимость между частотой ВГВ-носительства, частотой хронизации ВГВ, путями передачи вируса и географическим распространением генотипов [127].

Так в Юго-Восточной Азии, где доминируют генотипы В и С, велико значение вертикального пути передачи. 30-50% случаев ХГВ у детей развивается в результате перинатального инфицирования от HBeAg-положительных матерей, в то время как передача ВГВ от HBeAg-негативной матери к ребенку является редкостью [85]. В противоположность этому, в Средиземноморье, Африке и Среднем Востоке, где доминирующими являются генотипы А и D, ранний горизонтальный перенос является более важным фактором, поскольку только у 10-20% детей ХГВ развивается в результате перинатального инфицирования [105]. По-видимому, эти различия связаны с тем, что в Юго-Восточной Азии HBeAg-положительные женщины в репродуктивном возрасте чаще оказываются HBeAg-положительными из-за более поздней HBeAg-сероконверсии по сравнению с другими регионами. Поскольку вертикальный путь передачи инфекции связан с высокой частотой хронизации (70-90%), он служит важным механизмом для поддержания высокого уровня инфицированности в тех регионах, где ВГВ является эндемичным [77, 85, 93].

Еще в двух ранних исследованиях, проведенных среди более 3000 носителей HBeAg в Японии, были выявлены субтип-зависимые клинические различия течения гепатита В: носители с субтипом *adr* и генотипом С имели более выраженные поражения печени и были чаще HBeAg-положительными по сравнению с субтипом *adw* (в Японии обычно представлен генотипом В) [102]. Эти данные были в дальнейшем подтверждены несколькими группами исследователей, изучавшими клинические различия между генотипами среди хронических носителей ВГВ в Юго-Восточной Азии [126, 156]. Оказалось, что генотип В связан с более быстрым протеканием иммуноактивной стадии и более быстрой HBeAg-сероконверсией по сравнению с генотипом С, тогда как последний характеризуется более выраженным поражением печени, низкой частотой образования мутаций G1896A в preCore области и более высокой частотой замен A1762T и G1764A [31, 45, 81, 94, 131, 132].

В работах Као и Орито было показано, что ВГВ генотипа С преобладал у пациентов с ЦП и ГЦК [93, 131, 132]. Кроме того, ГЦК при ВГВ-С быстро

прогрессирует и ведет к смерти в результате печеночной недостаточности, несмотря на терапию [177].

В ряде работ было отмечено, что ВГВ генотипа А (ВГВ-А) преобладал у пациентов с ХГВ и у пациентов с ГЦК моложе 40 лет, а ВГВ генотипа D (ВГВ-D) чаще встречался у пациентов с ОГВ, а у пациентов с ХГВ характеризовался более тяжелым течением болезни, чем генотип А [110, 169]. Кроме того, было обнаружено, что пациенты с ВГВ-А имели меньший риск рецидива болезни после пересадки печени и более низкую смертность [44].

ВГВ-С также связан с преобладанием HBeAg-положительных носителей, более высоким уровнем вирусной ДНК в крови и, соответственно, с более сильным поражением печени, чем ВГВ-А, ВГВ-В и ВГВ-D [93, 95]. Однако, среди HBeAg-положительных пациентов уровень ДНК был выше при ВГВ-D, в сравнении с ВГВ-А, ВГВ-В или ВГВ-С, что, возможно, связано с более высокой скоростью репликации и инфекционности у ВГВ-D [85, 93, 153]. Было показано, что генотипы ВГВ имеют различную мощность репликации ВГВ как *in vitro*, так и *in vivo* [93]. Внутриклеточная экспрессия ДНК ВГВ выше для ВГВ-В и ВГВ-С, чем для ВГВ-А и ВГВ-D. Внутриклеточное накопление ДНК ВГВ может вызвать повреждение печени. Большая емкость репликации ВГВ генотипа С объясняет, почему ВГВ-С связан с более тяжелыми заболеваниями печени, чем другие [28, 93].

Недавние исследования показали, что генотип ВГВ влияет на терапевтический ответ [85, 153]. Ретроспективный анализ, проведенный Као с соавторами, показал, что пациенты инфицированные ВГВ-А лучше отвечают на лечение интерфероном-альфа (ИФН- α), чем пациенты, инфицированные ВГВ-D, независимо от их HBeAg-статуса, а также, что HBeAg-позитивные пациенты с ВГВ-В лучше реагируют на лечение ИФН- α , чем пациенты с ВГВ-С [77]. В большинстве клинических исследований терапевтический ответ на ламивудин, адефовир, энтекавир и телбивудин были сходны среди различных генотипов ВГВ [77, 93]. Однако, было найдено, что развитие устойчивости к ламивудину после 12

месяцев лечения было значительно больше связано с генотипом В, чем с генотипом С [70].

Также была отмечена корреляция между серотипом и ответом на противовирусную терапию: ВГВ субтипа *ayw* лучше поддавался лечению ламивудином, чем ВГВ субтипа *adw*, что, возможно, связано с более низкой вероятностью возникновения ламивудин-устойчивых штаммов у пациентов инфицированных ВГВ субтипа *ayw* [202].

Современные данные о влиянии генотипов ВГВ на исходы хронической инфекции представлены в таблице 1.1. Из-за различного географического распределения генотипов ВГВ в странах Азии, Европы и Америки, обоснованное значимое сравнение можно провести только между генотипами В и С или между генотипами А и D. Кроме того, существуют ограничения на сравнение данных, полученных в регионах с разным этническим составом из-за генетических различий между человеческими популяциями.

Таблица 1.1 - Влияние генотипов ВГВ на исходы хронической инфекции

Сравнение генотипов	В против С		А против D	
	В	С	А	D
НВеAg-сероконверсия	раньше	позднее	раньше	позднее
Уменьшение НВsAg-сероочистки	высокое	низкое	высокое	низкое
Тяжесть печеночной гистологии	низкое	высокое	низкое	высокое
Прогрессирование в цирроз и ГЦК	низкое	высокое	низкое	высокое

1.2.2 Мутанты S гена

Основные мутации ВГВ в S гене это замена глицина на аргинин в 145 позиции в *a* детерминанте поверхностного антигена (sG145R) и другие мутации в области 120-147 аминокислот. Замены в *a* детерминанте НВsAg могут потенциально привести к ускользанию вируса от нейтрализующих антител и к инфицированию вакцинированных людей [97, 168]. Стоит отметить также важный вариант ускользания от иммунного ответа это замена снаружи *a* детерминанты sP120S/T [56]. Мутации S гена внутри *a* детерминанты (но не

sG145R) частично ответственны за скрытый гепатит, который характеризуется наличием ДНК ВГВ в сыворотке крови и отсутствием детектируемого HBsAg, что снижает безопасность крови. Мутации в preS регионе также связаны со скрытой ВГВ-инфекцией, возможно благодаря инактивации preS2/S промотера, которая возникает из-за нарушенной секреции HBsAg [30, 75, 138, 192].

Были выявлены ВГВ варианты, имеющие делеции в preS1 области. При этих мутациях менялся сайт связывания с факторами транскрипции и HBsAg не синтезировался. Однако делеции не влияли на полимеразную функцию, и мутантный вирус реплицировался. Были описаны вирусы с делецией 31 нуклеотида, приводящей к сдвигу ОРС и появлению стоп-кодона. В результате белок терял нейтрализующие эпитопы, и у вируса появлялась возможность размножаться при наличии AbHBs. В этом случае полимеразы была повреждена и для того, чтобы обеспечить непрерывное образование вирусных частиц, требовалась транс-активация меньшинством интактных геномов [111].

Были обнаружены мутации и в preS области, включая делеции, доходящие до половины целого preS1 региона [111], делецию preS2 трансляционного стоп-кодона, делецию других кодонов, полностью прекращающих экспрессию preS2 белка [49], делецию 183 нуклеотида [62], многочисленные точечные мутации и серии небольших делеций и вставок [60]. Некоторые делеции не только уничтожают регион preS2 промотера, но и сайты, которые распознаются В- и Т-клетками. Напротив, сайты связывания с гепатоцитами, расположенные в preS1 области, остаются неизменными. Делеции такого типа потенциально приводят к нарушению клиренса вируса при сохранении его способности прикрепляться к гепатоцитам с последующим проникновением внутрь клетки и, таким образом, могут способствовать развитию ХГВ. Кроме того, некоторые из этих мутантов могут получать селективное преимущество в условиях, когда иммунологические реакции направлены на уничтожение дикого типа HBsAg. Однако было высказано предположение, что если включить в будущие вакцины preS детерминанты, это приведет к появлению preS делеции и «мутантов бегства» у вакцинируемых людей [36].

Делеции *preS* часто связаны с увеличением риска развития ГЦК, особенно у пациентов, инфицированных ВГВ генотипа С [29].

1.2.3 Мутанты preCore и Core гена

Одна из наиболее известных и клинически значимых мутаций в *preCore* области генома ВГВ это замена G1896A. Данная мутация приводит к образованию стоп кодона в 28 положении последовательности HBeAg, в результате чего нарушается транспорт *preCore* к ЭР и синтез HBeAg [36, 56, 138].

Хотя наличие или отсутствие HBeAg не влияет на биологию вируса, HBeAg-сероконверсия играет важнейшую роль во взаимодействии вируса и иммунной системы хозяина. На ранних стадиях хронической ВГВ инфекции, наиболее распространен дикий тип вируса и HBeAg детектируется в сыворотке крови. Позднее, иммунная система хозяина уменьшает количество дикого типа вируса и возникает мутация, приводящая к HBeAg-сероконверсии. Потеря HBeAg и появление AbHBe способствует ускользанию вируса от иммунных киллеров и продолжению вирусной репликации [28, 36].

Замена G1896A редко наблюдается у пациентов с ВГВ генотипа А. Это связано с тем, что в проксимальном стволе РНК ε остаток гуанина (G) в положении 1896 в норме образует пару с урацилом (U) в положении 1858 у ВГВ не-А- генотипа, и с цитозином (C) у ВГВ генотипа А [83]. Переключение гуанина на аденин (A) в позиции 1896 дестабилизирует структуры ствол-петля ε и таким образом снижает эффективность репликации ВГВ. Напротив, в ВГВ не-А генотипа эта мутация способствует образованию Уотсон-Криковской пары оснований T(U)-A, стабилизирующей вторичную структуру ε и усиливающей вирусную репликацию. Мутация 1899, также стабилизирует ε, и приводит к прекращению секреции HBeAg [83]. Существуют также ряд мутаций, приводящих к HBeAg-сероконверсии: двойные замены в иницирующем кодоне (мутации в 1814 или 1815 положении *Core* гена), мутации в 1874 и 1862 позиции, а также сдвиги ORC [28].

Мутация в положении 1862 характерна для пациентов с ХГВ, ЦП и ГЦК. Эта замена приводит не только к снижению синтеза HBeAg, но и может снижать

эффективность обратной транскрипции. Энкапсидация и репликация ВГВ также может нарушаться под действием мутаций в верхней части ствола и петле ε [83].

Было обнаружено, что делеции в preCore часто связаны с более тяжелыми заболеваниями печени, но также были найдены и у неактивных носителей ВГВ. Существуют данные, что заболеваемость циррозом у пациентов с HBeAg-положительной ВГВ инфекцией составляла 2-6% в год, а у пациентов с HBeAg-негативным ХГВ – 8-10% [93]. Кроме того, мутации в preCore и основном Core промоторе (BCP) связаны с ответом на ИФН-терапию. Например, наличие G1896A мутации коррелирует с плохим ответом на лечение ИФН и не зависит от HBeAg-статуса, а отсутствие мутаций в BCP области – с хорошим ответом на противовирусную терапию (ПВТ) [93, 174].

BCP регион находится выше по последовательности от preCore области. Из-за наличия перекрытия в открытых рамках считывания Core промотора и X гена мутации в BCP потенциально могут изменять структуру и функции белка X [56, 115, 166]. Мутации в BCP также подавляют транскрипцию мРНК preCore и ингибируют синтез HBeAg [138]. Мутации A1762T и G1764A в BCP регионе не только снижают уровень HBeAg приблизительно на 50 % [56], но также повышают сродство к сайту фактора транскрипции HNF1. Подобно preCore мутациям, замены в BCP также имеют генотипическую распространенность и чаще наблюдаются при инфицировании ВГВ генотипов С и D. Замена G1757A и связанные с ней G1764T+C1766G характерны для ВГВ генотипа D и создают новый сайт связывания с фактором транскрипции HNF3 [115]. Удаление нуклеотидов в положениях 1763-1770 и мутации C1766T+T1768A образуют низкое сродство с сайтом связывания HNF1 и найдены у пациентов с бессимптомным и HBeAg-негативным гепатитом [115, 174].

Мутация G1896A, приводящая к образованию стоп-кодона в preCore, и мутации в BCP регионе часто появляются вместе. Недавние исследования показали, что комбинация мутаций в BCP и preCore областях с делециями в preS1 и preS2 регионах может привести к тяжелым заболеваниям печени, включая молниеносный гепатит и ГЦК [56, 93, 174]. Тройные мутации A1762T+ G1764A+

G1896A чаще наблюдаются у пациентов с ГЦК. Другие мутации в preCore и ВСР (G1899A, T1753V и C1653T) были также связаны с повышенным риском развития ГЦК [115].

1.2.4 Мутанты X гена

Замены в X гене играют решающую роль в гепатоканцерогенезе. Несколько мутаций и делеций в X гене были определены у пациентов с ГЦК. Наличие двойной замены в 130 и 131 положениях белка X или тройной – в 5, 130 и 131 положениях определяет повышенный риск развития ГЦК [36, 153, 166]. Как было показано, для ВГВ с заменами в X белке характерно увеличение активности NFκB, что в свою очередь может предотвратить апоптоз и способствовать выживанию инфицированных и мутировавших клеток [187].

Двойные замены в 130 и 131 кодонах белка X (K130M, V131I) могут быть следствием A1762T+G1764A мутаций в ВСР области из-за перекрытия в ОРС [56, 115, 174]. Замена в 127 позиции белка X, как следствие мутации T1753V в ВСР области, была найдена у пациентов с молниеносным гепатитом и ГЦК [56, 93, 115].

1.2.5 Мутации устойчивости к аналогам нуклеозидов/нуклеотидов

Мутации устойчивости к АН напрямую связаны с заменами в гене полимеразы. Известно, что А, С и D домены полимеразы ВГВ формируют dNTP-связывающий домен и каталитический центр, В домен участвует в связывании с матрицей, а Е домен связывается с праймером [36, 56, 97]. В настоящее время в мире зарегистрировано пять препаратов на основе АН для лечения вирусного гепатита: ламивудин (ЛАМ), телбивудин (ТБВ), адефовир (АДФ), энтекавир (ЭНТ) и тенофовир (ТФВ) (рис. 1.7).

Ламивудин – дидезоксицитидин (ddC), ингибирует РНК-зависимую ДНК полимеразу ВГВ, блокирует обратную транскрипцию и таким образом подавляет репликацию вируса. Однако длительное применение ламивудина в качестве монотерапии часто приводит к устойчивости в результате появления замен (rtM204I/V), которые разрушают YMDD (тирозин, метионин, аспарат, аспарат)

локус в каталитическом центре С домена гена полимеразы и оказывают стерические препятствия для связывания с ламивудином (рис.1.8) [40, 101, 161].

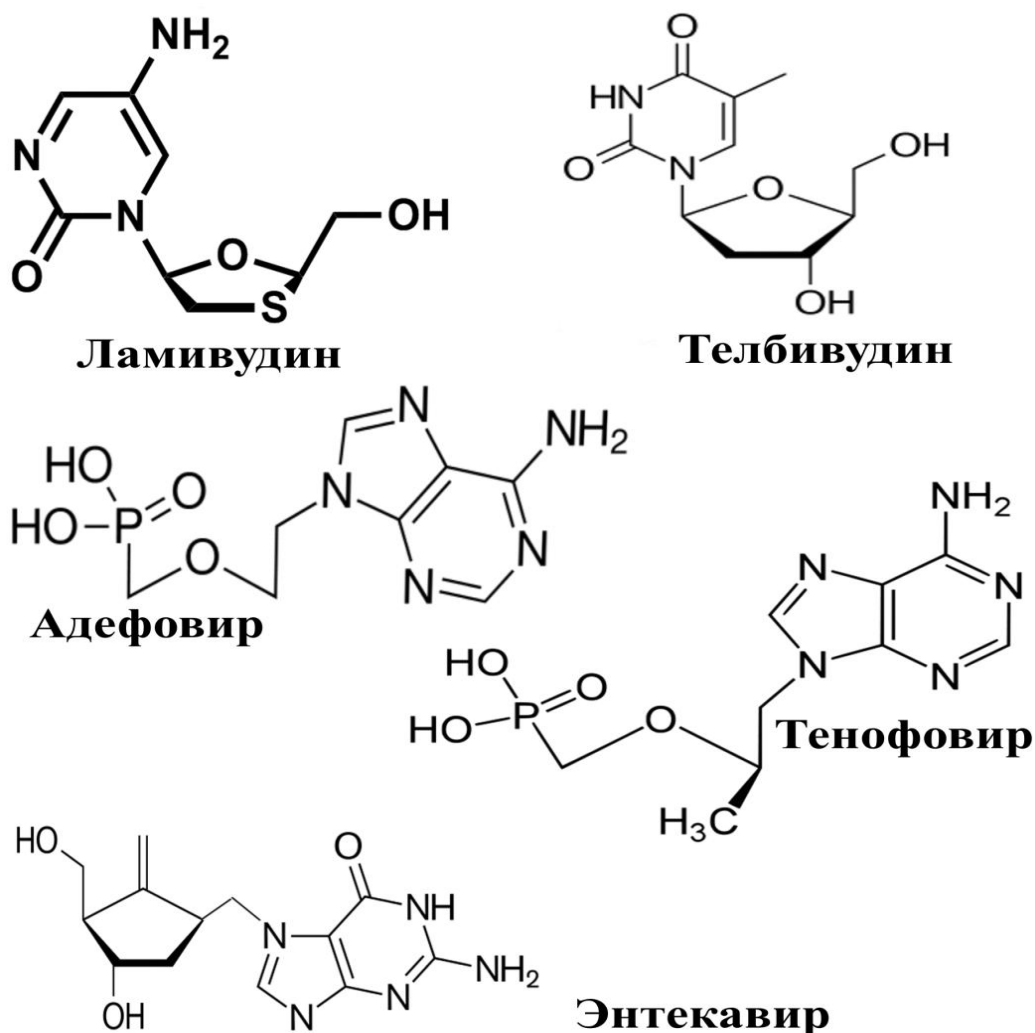


Рисунок 1.7 Химические формулы аналогов нуклеозидов/нуклеотидов.

Еще одна замена лейцина на метионин в В домене полимеразы (rtL180M) часто сопровождается rtM204I/V заменой [41, 96]. Наличие rtL180M замены повышает репликативную эффективность YMDD-мутанта, возможно, путем связывания с природным dNTP [97]. Были найдены замены перед В доменом (rtT128N, rtV173L, rtL80I/V и rtW153S), усиливающих репликативную активность и селекцию мутантных видов вируса [40, 173, 202].

Телбивудин - нуклеозидный аналог тимидина, связываясь с обратной транскриптазой ДНК-полимеразы ВГВ, нарушает взаимодействие фермента с его эндогенным субстратом – тимидин-5'-трифосфатом и тем самым вызывает обрыв

цепи ДНК и подавляет репликацию вируса [38, 150, 185]. Устойчивость к телбивудину также связана с мутациями rtM204I/V, rtL180M, rtL80I/V, поэтому между двумя препаратами существует перекрестная резистентность [96]. Если при монотерапии ламивудином устойчивость наблюдается у 50% пациентов на третий год лечения, и у 80 % - на пятый год, то при терапии телбивудином резистентность регистрируется лишь у 3% HBeAg-негативных пациентов в первый год терапии и у 9% - во второй год [85].

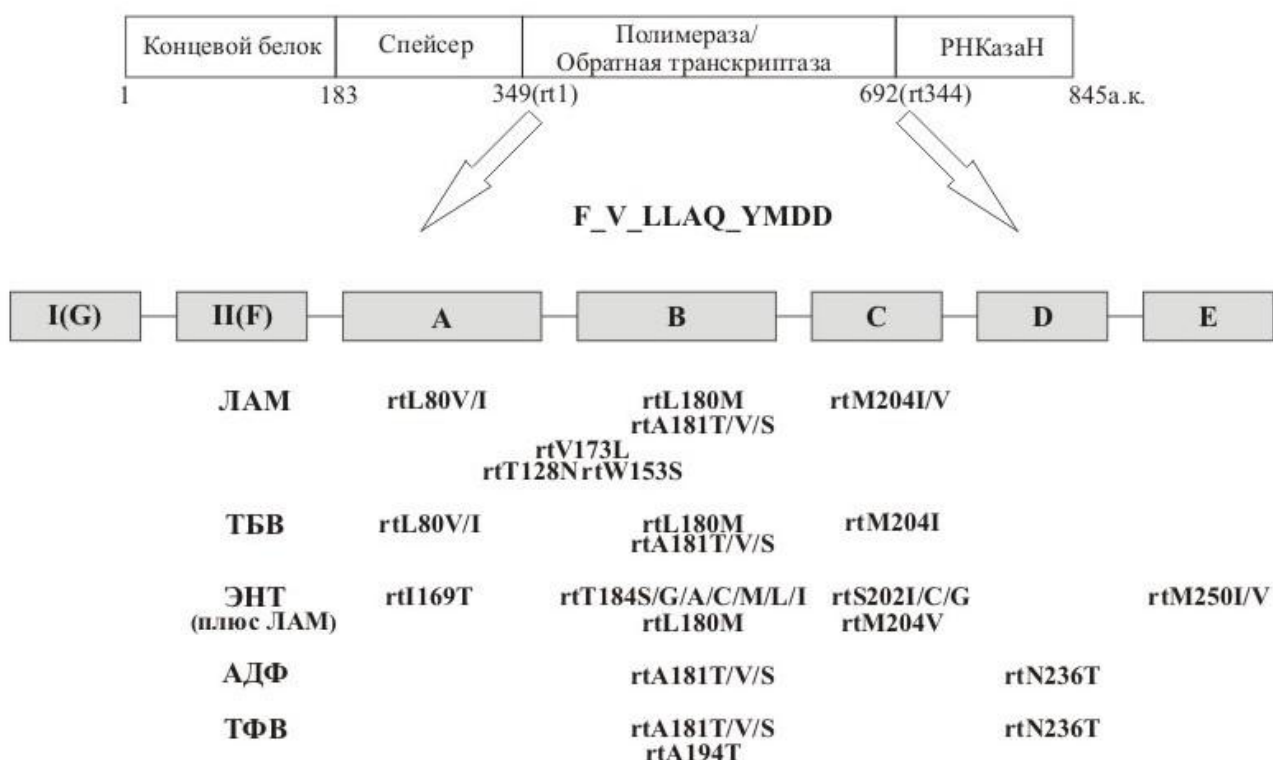


Рисунок 1.8 Локализация основных мутаций устойчивости к аналогам нуклеозидов/нуклеотидов на полимеразе ВГВ [96, 97]. Нумерация согласно [161].

Энтекавир является аналогом нуклеозида гуанозина с мощной и селективной активностью в отношении ВГВ полимеразы и, по сравнению с ламивудином и телбивудином, имеет более высокий барьер для возникновения устойчивости, которая определяется специфичными заменами T184S/I/A/L/G, S202I/G/C и M250I/V, а также замен, характерных для лечения ламивудином M204I/V, L180M [10, 74, 84, 119, 173]. Частота развития устойчивости у пациентов, не получавших до этого лечение АН, не превышает 1,2% после 6 лет

терапии. В основном мутации устойчивости к энтекавиру регистрируется у ламивудин-устойчивых пациентов [2, 56, 96]. Пациенты, принимающие энтекавир после возникновения мутаций устойчивости к ламивудину, имели комбинацию замен rtI169T и rtM250V, или rtT184G и rtS202I. Эти дополнительные мутации увеличивают уровень устойчивости к энтекавиру в сравнении с начальной ламивудиновой устойчивостью [56, 97, 168]. Частота возникновения мутаций к энтекавиру у пациентов с ламивудиновой устойчивостью возрастает с 6% после года терапии до 57% после 6 лет лечения [2, 56].

Тенофовир и адефовир – аденозиновые аналоги нуклеотидов, сильные ингибиторы обратной транскриптазы, которые значительно реже приводят к образованию мутаций устойчивости, по сравнению с ламивудином и телбивудином [33, 74, 114, 150]. Резистентность к адефовиру редко встречается в первый год лечения, но увеличивается в последующие годы (от 20 до 29% в течение 5 лет у HBeAg-негативных пациентов) [2, 56]. Аминокислотные замены в D и В домене полимеразы (rtN236T и rtA181V, соответственно) – наиболее часто встречающиеся мутации устойчивости к адефовиру [41, 97, 101]. Однако, применение АДФ у пациентов с заменой в кодоне 181 (A/STV) может вызвать перекрестную устойчивость с ламивудином [96]. Применение ТФВ у пациентов с устойчивостью к ламивудину, телбивудину и энтекавиру показало высокую эффективность и не приводило к перекрестной резистентности [63, 180].

Из-за наличия в структуре генома ВГВ перекрывающихся рамок считывания мутации в полимеразном гене могут изменять и свойства поверхностных белков (рис. 1.9) [97, 168]. PreS/S-мутации, возникающие самостоятельно или из-за наличия миссенс-мутаций полимеразы, приводят к изменению структуры HBsAg, снижению его секреции из гепатоцита, что, с одной стороны, затрудняет этиологическую верификацию хронического гепатита, а с другой, способствует развитию окислительного стресса, воспалению, ядерному увеличению числа циркулярно замкнутых вирусных ДНК в ядре клетки, развитию мутаций и раковой трансформации гепатоцитов на поздних стадиях ХГВ [56, 138].

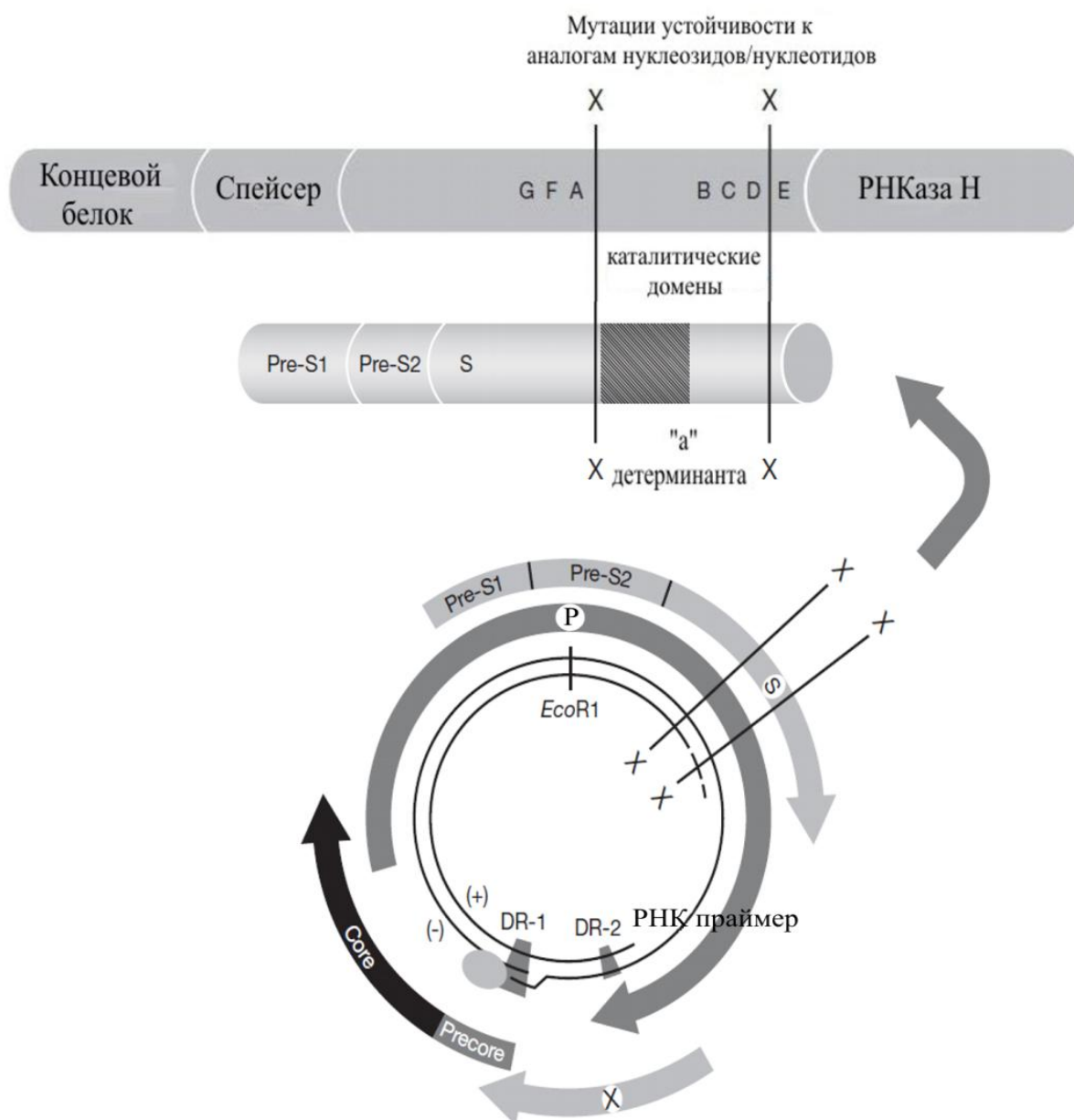


Рисунок 1.9 Схема организации генома ВГВ и влияние замен в полимеразе на поверхностный белок [97].

Существуют интересные данные, что ВГВ с *rtA181V/T*-мутацией в В домене полимеразы преобладал при возникновении устойчивости к ламивудину, не смотря на тот факт, что мутация может привести к стоп-кодону в S гене (*rtA181T/sW172**) [96, 192]. Мутации в S гене, особенно в *a* детерминанте, кодирующей область выше В домена полимеразы, могут привести к возникновению вакцин-ускользающих вариантов, которые могут проявляться у вакцинированных людей [30, 75].

1.3 Диагностика ВГВ

Диагностику вируса гепатита В можно условно разделить на 2 группы: это прямое обнаружение возбудителя (выявление ДНК ВГВ) и косвенное (определение антител и антигенов).

В настоящее время существует большое количество коммерческих наборов реагентов, как российского, так и зарубежного производства, для выявления серологических маркеров (HBsAg, HBeAg, HBcAg, AbHBs, AbHBe, AbHBcorIgM, AbHBcorIgG), качественного и количественного определения ДНК ВГВ методом ПЦР и ПЦР в реальном времени [37]. Выявление того или иного маркера, в сравнении с уровнем ДНК возбудителя и биохимическими показателями (АЛТ, АСТ, билирубин) может указывать на стадию течения гепатита (см. п. 1.1.5). Ранее выявление инфекции, а также знание стадии заболевания, может значительно повлиять на течение и исход болезни. Определение уровня вирусной нагрузки (ДНК ВГВ) имеет большое значение для мониторинга пациентов, перенесших противовирусную терапию [11]. Оценка эффективности противовирусной терапии основана на снижении ДНК ВГВ (в идеале до недетектируемого уровня, т.е. менее 10-15 МЕ/мл) [47]. Таким образом, целью противовирусной терапии является подавление репликации вируса, которая приведет к биохимической ремиссии, улучшению гистологической картины и минимальному прогрессированию болезни [41].

В последнее время разработаны и описаны ряд методик для определения генотипа и серотипа ВГВ, а также для количественного определения HBsAg и HBeAg [18, 27, 32, 72, 88, 106, 108, 109, 142, 199, 201]. Генотип ВГВ признается в качестве важного фактора в прогрессировании болезни. Установлено, что ВГВ-D и ВГВ-C чаще приводят к циррозу и ГЦК, в сравнении с ВГВ-A и ВГВ-B. Кроме того, HBeAg сероконверсия, как ответ на лечение ИФН, чаще достигается при ВГВ-A или -B, против ВГВ -D или -C (см. п. 1.2.1).

Количественный уровень HBsAg выражается в МЕ/мл (0,1 МЕ/мл эквивалентен 0,1 нг/мл HBsAg, который в свою очередь эквивалентен $2 \cdot 10^7$

вирусных частиц или $5 \cdot 10^6$ вирионов). Измерение HBeAg происходит со ссылкой на внешний стандарт и выражается в РЕ (Пауль Эрлих) МЕ/мл [201]. Наличие большого количества HBsAg и HBeAg в сыворотке крови может повлиять на возможность обнаружения циркулирующих антител и может маскировать начало HBsAg и HBeAg сероконверсии. Доступные коммерческие наборы реагентов обычно обнаруживают AbHBs и AbHBe только после очистки сыворотки от соответствующих антигенов. Роль количественного выражения HBsAg в прогнозировании ответа на лечение пегилированным интерфероном (ПЭГ-ИНФ) подробно исследована в ряде работ [34, 133, 159, 163, 172, 186]. Было показано, что при достижении на 12 неделе лечения ПЭГ-ИНФ уровня HBsAg менее 1500 МЕ/мл у 50% больных в течение следующих 6 месяцев наблюдалась HBsAg-сероконверсия. Корреляция между начальным уровнем HBeAg и последующей HBeAg-сероконверсией на фоне лечения ПЭГ-ИНФ была показана Фрид и коллегами [53].

Воздействие противовирусной терапии на уровень ДНК ВГВ в сыворотке крови широко описаны как в отечественной, так и в зарубежной литературе, в то время как информации о влиянии лечения на внутрипеченочные вирусологические показатели пока недостаточно. В связи с этим и благодаря развитию ПЦР в реальном времени были разработаны методы для определения уровня внутрипеченочной ДНК ВГВ, в том числе количественное выявление кзкДНК [67, 118, 200]. Сохранение кзкДНК минихромосомы остается ключевым фактором, ответственным за невозможность полного очищения от вируса и за рецидивы вирусной репликации после прекращения противовирусной терапии [41].

Наряду с увеличением применения аналогов нуклеозидов для лечения ХГВ, разрабатываются методики для выявления мутаций устойчивости к противовирусным препаратам [107, 152]. Диагностирование мутаций устойчивости к аналогам нуклеозидов значимо не только с точки зрения управления ХГВ у конкретного индивида, но и из-за возникновения на фоне

лечения вакцин-ускользающих вариантов, что в свою очередь вносит коррективы в глобальную программу вакцинации против гепатита В.

1.4 Профилактика гепатита В

ВГВ до сих пор остается серьезной проблемой для общественного здравоохранения. Главные опасения связаны с высоко эндемичными странами, где основной путь передачи инфекции является вертикальный (от матери к ребенку) и горизонтальный между детьми. Скрининг всех беременных женщин и пассивная иммунизация иммуноглобулином человека против гепатита В не доступна для многих развивающихся стран. Уровень инфекции может быть уменьшен путем изменения поведения, повышения индивидуального знания, тестирование донорской крови, обеспечение асептики в клинической практике, скрининг беременных женщин и вакцинопрофилактика новорожденных. В 1991 году Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) рекомендовала всем странам ввести политику всеобщей вакцинации против гепатита В и на сегодняшний день глобальная вакцинация составляет 69% [204]. Во многих странах после внедрения массовой кампании иммунизации отмечено снижение уровня носителей HBsAg и заболеваемости ГЦК [145, 195].

Первые вакцины против ВГВ были разработаны в начале 80-х годов прошлого века и состояли из очищенного HBsAg, выделенного из плазмы крови хронических носителей. Эти иммуногенные вакцины с успехом использовались у нескольких сотен миллионов человек и до сих пор производятся в Азии и используются в ряде стран. В середине 1980-х годов появились рекомбинантные ДНК вакцины, содержащие HBsAg экспрессируемый трансфектируемыми дрожжами (например, *Saccharomyces cerevisiae*) [13, 170]. Эти вакцины показали высокую эффективность и безопасность и стали наиболее используемыми в мире. Показано, что после полного курса вакцинации (у новорожденных 3 дозы вакцины вводятся в 0, 1 и 6 месяцев) AbHBs образовывались у 100% детей и у 95% подростков [51]. Практика показала, что успешно инфицированные лица,

которые потеряли свои антитела с течением времени, обычно показывают быстрый вторичный иммунный ответ при увеличении дозы вакцины или при контакте с ВГВ. Антитела к поверхностному антигену гепатита В в основном ориентированы на связь с гидрофильным регионом (*a* детерминанта HBsAg). Это обеспечивает защиту от инфекции со всеми генотипами ВГВ [52].

Помимо моно вакцины против гепатита В, существуют и комбинации с другими вакцинами, включая коклюшно-дифтерийно-столбнячную вакцину (АКДС), вакцину против гемофильной инфекции, против полиомиелита и гепатита А [16, 19]. Кроме активной иммунизации в ряде случаев используется введение иммуноглобулина гепатита В. Совместное применение вакцины и иммуноглобулина рекомендовано ВОЗ в качестве дополнительной профилактики для новорожденных малышей, чьи матери HBsAg-позитивны, для лиц, имевших контакт с кровью или биологическими жидкостями HBsAg-позитивного носителя, а также для пациентов при защите от повторного заражения ВГВ после пересадки печени [90, 154].

Отдельным вопросом в теме профилактики против гепатита В стоит появление мутантов S гена (см. п. 1.2.2 и п. 1.2.5), которые могут внести серьезные корректировки на адекватность применения современных вакцин. Однако, на сегодняшний день распространенность таких вариантов ВГВ невелика и пока не предоставляет опасности для здоровья населения [52].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Пациенты

В работе использована плазма крови и биоптаты печени больных с верифицированным хроническим вирусным гепатитом В из г. Санкт-Петербурга - Специализированной клиники вирусных инфекций НИИ гриппа, Центра СПИД Санкт-Петербурга, Центра СПИД Ленинградской области, Отдела вирусных гепатитов и заболеваний печени НИИ «Детских инфекций», из республики Карелия - отделения ОКБ, поликлиник г. Петрозаводска и из г. Ханоя (Вьетнам) – Военный институт гигиены и эпидемиологии.

Секвенирование методом Сенжера фрагмента гена полимеразы было выполнено у 122 пациентов с ХГВ (83 пациента из Санкт-Петербурга и Ленинградской области, 19 – из г. Петрозаводска и 20 человек из Вьетнама) для выявления мутаций устойчивости к АН.

2.2 Серологические маркеры и клинические показатели

Вирусные антигены HBsAg и HBeAg и антитела к вирусу гепатита В AbHBs, AbHBe, AbHBcorIgM, AbHBcorIgG исследовались методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест». Индекс гистологической активности (ИГА) оценивался по Knodell с оценкой паренхиматозного повреждения (ПП) (1-4 балла), степень фиброза (Ф) по Metavir (0-4).

2.3 Выделение ДНК ВГВ и ПЦР

Выявление ДНК ВГВ, определение вирусной нагрузки и генотипа ВГВ из образцов плазмы крови проводили методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени на приборах Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и Rotor-Gene

6000 (Corbett Research, Австралия) с использованием тест-систем «АмплиСенс HBV-FL», «АмплиСенс HBV-Монитор-FL» и «АмплиСенс HBV-генотип-FL» («ИнтерЛабСервис», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

Вирусные геномы определялись у всех больных в сыворотке крови и у 25 человек – в ткани печени. При этом ДНК ВГВ из плазмы крови выделяли с помощью комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот «АмплиСенс РИБО-сорб» и «АмплиПрайм РИБО-преп», а из биоптатов печени – «АмплиСенс РИБО-золь-А» («ИнтерЛабСервис», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

2.4 Секвенирование фрагмента гена полимеразы для определения мутаций устойчивости к АН

2.4.1 Амплификация участков генома ВГВ

Амплификацию фрагмента гена полимеразы проводили методом ПЦР с использованием реагентов: 5x реакционный буфер GoTaq Green (Promega, США), GoTaq полимеразы, 5 ед/мкл (Promega, США), DEPC-H₂O (Fermentas, Литва), dNTP, 10 мМ [2,5 мМ dTTP; 2,5 мМ dATP; 2,5 мМ dCTP; 2,5 мМ dGTP (Fermentas, Литва)] и оригинальных праймеров YMDD-F: 5'-CTCCAATCACTCACCААС-3' и YMDD-R: 5'-GGGTTTAAATGTATACCCA-3' [концентрация 10 пмоль/мкл] в термоциклере MJ Mini (BioRad, США) [4]. Термальный профиль реакции: 1. 95⁰С – 4 мин.; 2. 95⁰С – 30 сек., 60⁰С – 30 сек., 72⁰С – 30 сек. – 30 циклов (с понижением температуры отжига на 0,5⁰С за цикл); 3. 95⁰С – 30 сек., 45⁰С – 30 сек., 72⁰С – 30 сек. – 30 циклов; 4. 72⁰С – 7 мин.

2.4.2 Анализ и очистка продуктов ПЦР

Анализ и очистку продуктов ПЦР для секвенирования проводили гель-электрофорезом в 2%-ной агарозе (ЦНИИ эпидемиологии, РФ). Рабочий буфер TBE (890mM Трис, 890mM борная кислота, 20mM ЭДТА; pH 8) с добавлением бромида этидия. В качестве маркера молекулярной массы использовался Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Детекция проводилась визуально в УФ свете ($\lambda=250$ нм). Фотосъемка осуществлялась системой для документации

Kodak ImageStation 2000 (Kodak, США). ДНК из агарозного геля выделяли коммерческим набором QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия) по методу Фогельштайна-Гиллеспи [179]. Концентрацию ДНК после выделения из агарозного геля определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo, США).

2.4.3 Секвенирующая ПЦР

Секвенирование проводили методом Сэнжера с использованием коммерчески доступного набора реагентов ABI prism BigDye Terminator v3.1 Kit [146]. Удлинение цепи осуществлялось Taq-полимеразой AmpliTaq FS, терминировалось флуоресцентно-мечеными дидезоксинуклеотидами (BigDye терминаторами).

Секвенирование каждой последовательности проводили с прямого и обратного праймеров. Для секвенирования фрагментов генома ВГВ использовали те же праймеры, что и для амплификации. Состав реакционной смеси: ABI prism BigDye Terminator v3.1 Kit 4 мкл, ДНК 8 мкл, праймер (прямой или обратный) 3 мкл, H₂O (деионизованная) 5 мкл, конечный объем смеси 20 мкл. Реакцию секвенирования проводили в термоциклере CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Термальный профиль реакции: 96 °C – 10с, 50 °C – 5 с, 60 °C – 240 с (25 циклов).

2.4.4 Очистка продуктов секвенирующей ПЦР

Для удаления остаточных терминаторов элонгации цепи ДНК осаждали смесью 3М ацетата натрия (рН 5,0), 10 мМ натриевой соли ЭДТА и декстрана в соотношении по объему 1:1:1. Смесь добавляли из расчета 6 мкл на 20 мкл объема реакционной смеси для секвенирования. Затем добавляли 60 мкл охлажденного 96% этанола и инкубировали в течение 10 мин при -20°C. Далее центрифугировали при 13 200 об/мин 15 мин. Надосадочную жидкость отбирали вакуумным отсосом. Осадок отмывали 70% этанолом. Затем высушивали осадок в вакуумной сушилке и растворяли в формамиде. Полученный раствор прогревали до 95°C в течение 1-2 мин., а затем охлаждали на льду и наносили в лунки 96-луночного оптического планшета.

2.4.5 Анализ продуктов реакции секвенирования

Анализ продуктов реакции секвенирования и определение нуклеотидных последовательностей производились 4-канальной автоматизированной системой капиллярного электрофореза и флуоресцентной детекции ДНК-фрагментов ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Капиллярный электрофорез проводился в ABI PRISM[®]3100 POP-6[™] полимере (полидиметилакриламидный матрикс низкой вязкости) для стандартного секвенирования при температуре 50°C и напряжении 12,2 кВ в течение 6500 с. Для детекции фрагментов с флуоресцентно-мечеными терминаторами (ddA-PA-6CFB-DR6G-2, ddG-EO-5CFB-DR110-2, ddT-EO-6CFB-DTMR-2, ddC-EO-6CFB-DROX-2) использовался Ar-лазер ($\lambda = 488$ нм). Терминаторы состояли из дидезоксирибонуклеотида, связанного через пропаргилэтоксиамино- (EO-) или пропаргиламино- (PA-) линкер с донором флуоресценции (FAM, $\lambda_{\text{погл}} = 492$ нм, $\lambda_{\text{флуор}} = 520$ нм) и далее со специфическими акцепторами флуоресценции (DR6G для ddATP, DR110 для ddGTP, DTMR для ddTTP, DROX для ddCTP). Испускаемое Ar-лазером излучение вызывало флуоресценцию FAM, излучение FAM поглощалось акцепторами флуоресценции, порождая вторичную флуоресценцию с длиной волны, специфической для каждого типа дидезоксинуклеотида. Флуоресцентный сигнал пропускался через спектральный фильтр и регистрировался прибором с зарядовой связью (ПЗС, CCD, charge-coupled device). Обработка данных, поступающих с ПЗС, преобразование данных в информацию о последовательности нуклеотидов (basecalling) осуществлялись программой ABI PRISM 3100-Avant Data Collection.

2.4.6 Обработка секвенированных последовательностей

Сборка секвенированных последовательностей (assemble), их обработка и хранение осуществлялись в программном пакете Vector NTI 10 Advance (Invitrogen, США). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы Vector NTI 10 Advance с использованием алгоритма CLUSTAL W [171].

2.5 Определение мутаций устойчивости к аналогам нуклеозидов методом ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green

2.5.1 Постановка ПЦР и расчет эффективности ПЦР

Для определения мутаций устойчивости к АН был разработан метод, основанный на ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ). При дизайне оригинальных праймеров был модифицирован метод выявления YMDD-мутантов, использующий универсальную матрицу для ПЦР-РВ [152, 183].

Мутации устойчивости к АН определяли при помощи набора реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green (НПК «СИНТОЛ», Россия). ПЦР смесь (смесь-1) содержит реакционный буфер с SYBR Green, 200 мкМ каждого dNTP, 3 мМ MgCl₂, 2 ед. Taq-полимеразы, 100 пкМ праймера PrF (5'-АТАСААСАССТГТАТТСССАТСССАТ). Образец ДНК вносят параллельно в три пробирки, содержащие смесь-1 и праймеры Pr1 (5'-СССССААТАССАТСАТСНАС), Pr2 (5'-СССССААТАССАТСАТСС) и PrC (5'-СССССААТАССАТСАТС), соответственно. Праймеры Pr1 и Pr2 подобраны таким образом, чтобы выявить замену в YMDD-мотиве гена полимеразы (табл. 2.1). Праймер PrC является положительным контролем на наличие ДНК ВГВ и не зависит от наличия или отсутствия мутации.

Таблица 2.1 - Алгоритм определения мутаций устойчивости к аналогам нуклеозидов в YMDD-мотиве гена полимеразы ВГВ

Праймер	Метионин (М, Met)		Изолейцин (I, Ile)		Валин (V, Val)	
	Pr1	ПЦР(-)	ATN	ПЦР(-)	ATN	ПЦР(+)
Pr2	ПЦР(+)	ATG	ПЦР(-)	ATH	ПЦР(+)	GTG
					ПЦР(-)	GTH
PrC	ПЦР(+)	RTN	ПЦР(+)	RTN	ПЦР(+)	RTN

Аmplификацию проводили в термоциклере Rotor-Gene (Corbett Research, Австралия). Термальный профиль реакции: 1. начальная денатурация 95°C – 5 мин; 2. 95°C – 15 сек, 62°C – 20 сек, 62°C – 20 сек (измерение флуоресценции на

каждом цикле), уменьшение температуры отжига праймеров (Touch Down) с шагом 1°C, 7 циклов; 3. 95°C – 15 сек, 55°C – 20 сек, 62°C – 20 сек (измерение флуоресценции на каждом цикле), 30 циклов. По окончании реакции была построена кривая плавления в диапазоне от температуры отжига праймеров до температуры полной денатурации – примерно 95°C.

Расчет эффективности ПЦР проводили по формуле (2.1):

$$E=10^{(-1/K)}, \quad (2.1)$$

где E – показатель эффективности ПЦР, K – угол наклона прямой зависимости разведения ДНК от значения Ct.

2.5.2 Клонирование ПЦР-продуктов в вектор pUC18

Клонирование ПЦР-продуктов, содержащих M, I и V в 204 положении обратной транскриптазы, в вектор pUC18 проводили по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции EcoRI и HindIII. Для этого проводили амплификацию фрагментов генома ВГВ с помощью модифицированных праймеров prF-CL (5'-GCTGGAATTTCATACAACACCTGTATTCCCATCCCAT-3'), pr1-CL (5'-CATATAAGCTTCCCCCAATACCACATCATCNAC-3'), pr2-CL (5'-CATATAAGCTTCCCCCAATACCACATCATCC-3') и prC-CL (5'-CATATAAGCTTCCCCCAATACCACATCATC -3') на 5'-концах которых имелись последовательности для рестрикции. Для каждой пробы готовили по 50 мкл рестрикционной смеси, содержащей 5 мкл десятикратного буфера, 2 мкл эндонуклеазы рестрикции HindIII (20 единиц), 1 мкл эндонуклеазы рестрикции EcoRI (10 единиц), воду и ПЦР-продукт (или вектор pUC18) в концентрации 1 мкг/мл. Рестрикционную смесь инкубировали в течение 1,5 часов при 37°C и очищали при помощи коммерческого набора QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, США). Для каждой пробы готовили по 10 мкл лигазной смеси, содержащей 1 мкл десятикратного буфера, 1 мкл T4 ДНК-лигазы, воду, ПЦР-продукт (50 нг) и вектор pUC18 (25 нг). Смесь инкубировали в течение ночи при 21°C. Для проведения реакции рестрикции и лигирования использовали реагенты фирмы Fermentas (Литва).

2.5.3 Получение культуры компетентных бактериальных клеток E.coli

Бактериальные клетки *E.coli* штамм DH5 α выращивали на жидкой питательной среде LB (Luria-Bertani) без ампициллина до показателей оптической плотности OD=0.6 при длине волны $\lambda=600$ нм. Клеточную культуру (50мл) инкубировали на водно-ледяной бане в течение 10 минут, центрифугировали при 4000g в течение 10 минут при температуре 4°C. Затем удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали полученный остаток в 17 мл холодного ТВ-буфера (10мМ Pipes, 55мМ MnCl₂, 15мМ CaCl₂, 250мМ KCl). Повторно центрифугировали при тех же условиях. Ресуспендировали осадок клеточной культуры в 1.8 мл холодного ТВ-буфера с добавлением DMSO 7% от конечного объема, равном 2 мл. Полученную суспензию замораживали в виде аликвотных проб по 100 мкл и хранили при температуре -70°C.

2.5.4 Трансформация культуры бактериальных клеток плазмидной ДНК

К аликвоте компетентных бактериальных клеток *E.coli* штамм DH5 α (100мкл) добавляли 0.5 мкг плазмидной ДНК (pUC18-YMDD, pUC18-YVDD и pUC18-YIDD) и инкубировали на льду в течение 30 мин. Далее клетки подвергли тепловому шоку на водяной бане в течение 45 сек при 42°C для попадания плазмидной ДНК в клетки *E.coli*. Затем клетки инкубировали 2 минуты во льду, ресуспендировали в 500 мкл среды LB и инкубировали в течение 1 часа при 37°C при постоянном интенсивном перемешивании. Далее клетки (по 100 мкл) высевали на чашки, содержащие агаризованную LB-среду с ампициллином (50 мкг/мл) и инкубировали в течение 16 часов при 37°C. Для проверки эффективности трансформации с чашек Петри отбирали по 4 колонии штамма *E.coli* DH5 α , трансформированных плазмидной ДНК, и высевали ночную культуру в 1 мл жидкой LB-среды с ампициллином (500 мкг/мл). Ночную культуру растили в течение 16 при 37°C при постоянном интенсивном перемешивании.

2.5.5 Щелочное выделение плазмидной ДНК

Бактериальные клетки собирали центрифугированием при 16000g в течение 5 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл буфера I (50 мМ трис-HCl, pH

8,0, 10 мМ ЭДТА, с добавлением РНКазы А 100мкг/мл), и добавляли 200 мкл лизирующего буфера II (200 мМ NaOH, 1% SDS). Раствор инкубировали 15 мин при комнатной температуре, добавляли 200 мкл 3 М ацетата натрия, рН 5.5 и центрифугировали при 16000g в течение 5 мин, при 4°C. Супернатант отбирали автоматической пипеткой в новую пробирку и осаждали двухцепочечную ДНК добавлением 0.7 объема изопропанола комнатной температуры, центрифугировали при 16000g в течение 20 мин, при 4°C. Осадок подсушивали на воздухе и добавляли 500 мкл 70° этилового спирта комнатной температуры. Затем центрифугировали при 16000g в течение 20 мин, при 4°C и удаляли надосадочную жидкость. Осадок, содержащий ДНК, растворяли в 20 мкл TE-буфера, рН8,0 (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА).

2.5.6 Рестрикционный анализ и очистка плазмидной ДНК

Для каждой пробы готовили по 15 мкл рестрикционной смеси, содержащей 1.5 мкл десятикратного буфера, 0.6 мкл эндонуклеазы рестрикции HindIII (20 единиц), 0.3 мкл эндонуклеазы рестрикции EcoRI (10 единиц), воду и плазмидную ДНК (200нг). Смесь инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Затем добавляли краситель 6x Loading Dye (Fermentas, Литва). Для постановки электрофореза плазмидной ДНК использовали 0.8% агарозу («ИнтерЛабСервис», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) на 1x ТБЕ буфере (890mM Трис, 890mM борная кислота, 20mM ЭДТА; рН 8) с добавлением бромида этидия. В качестве маркера молекулярной массы использовался Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas, Литва).

Детекция, фотосъемка, очистка и измерение концентрации ДНК как описано в п. 2.5.2.

2.5.7 Секвенирование ДНК

Полученные плазмидные ДНК (pUC18-YMDD, pUC18-YVDD и pUC18-YIDD) были секвенированы методом Сэнжера при помощи праймеров M13F и M13R, как описано в пп. 2.5.3-2.5.6 данной главы.

2.6 Определение нуклеотидной последовательности геномов ВГВ методом NGS секвенирования.

2.6.1 Амплификация полных геномов ВГВ

Полные геномы ВГВ были амплифицированы методом ПЦР с использованием следующих праймеров:

P1 (5'-CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCTTTTTCACCTCTGCCTAATCA-3'),

P2 (5'-CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCAAAAAGTTGCATGGTGCTGG-3'),

P3 (5'-СТCGCTCGCCCAAATTTTTCACCTCTGCCTAATCA-3'),

P4 (5'-СТGGTTCGGCCCAAAGTTGCATGGTGCTGG-3') [65].

Термальный профиль реакции: 1. 94⁰С – 1 мин.; 2. 94⁰С – 40 сек., 60⁰С – 90 сек., 68⁰С – 2 мин., 72⁰С – 30 сек. – 40 циклов; 3. 72⁰С – 5 мин.; Амплификацию проводили с использованием термоциклеров Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия).

2.6.2 Анализ и очистка продуктов ПЦР

Анализ и очистку продуктов ПЦР для секвенирования проводили геле-электрофорезом в 0.8% -ной агарозе («ИнтерЛабСервис», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Рабочий буфер TBE (890mM Трис, 890mM борная кислота, 20mM ЭДТА; pH 8) с добавлением бромида этидия. В качестве маркера молекулярной массы использовался Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas, Литва). Детекция, фотосъемка, очистка и измерение концентрации ДНК как описано в п. 2.5.2.

2.6.3 Секвенирование ДНК ВГВ

Секвенирование полных геномов ВГВ проводилось на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием комплекта реагентов Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (96 Samples) (Illumina, США). Подготовка геномных библиотек выполнялась в полном соответствии с протоколом Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (96 Samples) (Illumina, США).

Вычисление концентрации приготовленной библиотеки проводилась по формуле (2.2):

$$M[\text{nmol/l}] = \frac{C[\mu\text{g/ml или } \mu\text{g}/\mu\text{l}]}{300 \cdot 646[\text{g/mol}]} = \frac{C \cdot 10^{-6} \cdot 10^3 \cdot [\text{g/l}]}{1,94 \cdot 10^5[\text{g/mol}]} = \frac{C \cdot 10}{1,94} [\text{nmol/l}] \quad (2.2)$$

где C – концентрация библиотеки двухцепочечной кДНК, полученная на флюориметре; 300 – длина фрагментов библиотек; 646 моль – средняя молярная масса пары нуклеотидтрифосфатов.

Конечные концентрации библиотек были 2 нМ, а объемом 10 мкл. Затем все библиотеки были смешаны по 10 мкл. Общая концентрация слитых кДНК-библиотек была 2 нМ. Затем 10 мкл смеси библиотек смешивали с 10 мкл 0,2 н NaOH, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и добавляли к смеси 980 мкл NT1-буфера. Концентрация кДНК-библиотек получилась 20 пМ (2 нМ разбавили в 100 раз). Для нанесения использовали концентрацию 13 пМ, т.е. разбавляем NT1-буфером до объема 1000 мкл: 650 мкл 20 пМ кДНК-библиотек + 350 мкл NT1-буфера. Из 13 пМ кДНК-библиотеки отбирали и сливали 10 мкл объема и добавляли 10 мкл 40 пМ фага PhiX (положительный контроль секвенирования) с конечной концентрацией 0,4 пМ. На картридж наносили 600 мкл полученной библиотеки. Концентрация кДНК-библиотек получилась приблизительно 12,87 пМ, а PhiX приблизительно 0,4 пМ.

2.6.4 Обработка секвенированных последовательностей

Для обработки полученных последовательностей использовалась программа CLC Genomics Workbench v7.0 (Qiagen, Германия). Сборка *de novo* осуществлялась с использованием программы Spades [17] с дефолтными параметрами. Картирование проводилось с помощью программы bowtie2 [87] на референсную последовательность AJ344117 [205]. Поиск вариантов - с помощью программы samtools [89].

2.6.5 Построение филогенетических деревьев

Для построения филогенетического дерева использовали метод присоединения ближайших соседей [148] и эволюционную двухпараметрическую модель Кимуры [79] с аппроксимацией гамма-распределения частот эволюции среди сайтов последовательности (параметр гамма-распределения равен 1). Филогенетические деревья строили с помощью программы MEGA v5.05 [165].

Преобразование форматов производили программой SeqVerter (GeneStudio, США). Визуализация и оформление филогенетических деревьев осуществлялись в программном пакете MEGA v5.05 [165]. Оценка достоверности реконструированной топологии филогенетических деревьев проводилась с помощью бутстреп-анализа (1000 репликаций).

2.7 Статистический анализ

Для статистического анализа данных использовался пакет Statistica для Windows, версия 5. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента, U-тесту Манна-Уитни-Вилкоксона, критериям Фишера или χ^2 . Для корреляционного анализа использовался коэффициент корреляции Спирмена.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Определение генотипа ВГВ и уровня вирусной нагрузки у пациентов с ХГВ в Северо-Западном регионе РФ

В период 2008-2014 гг. методом ПЦР на наличие ДНК вируса гепатита В (ВГВ) в плазме крови были обследованы 1414 пациентов, находящихся на лечении в клиниках г. Санкт-Петербурга и Ленинградской области.

Среди обследованных пациентов с подозрением на вирусный гепатит, ДНК вируса гепатита В была выявлена более чем у половины ($n=782$, 55%), в том числе были определены случаи сочетанного инфицирования ВГВ и вирусом гепатита С - у 49 пациентов (3%) и ВГВ и вирусом гепатита D - у 16 пациентов (1%). У 522 пациентов была определена вирусная нагрузка (ВН) ВГВ в плазме крови. Более чем у половины обследованных пациентов ($n=300$, 57,5%) наблюдалась низкая вирусная нагрузка (менее 10^4 копий/мл), у 149 (28,5%) – средняя ВН (10^4 - 10^6 копий/мл), и лишь у 73 (14%) - вирусная нагрузка была более 1млн копий/мл.

Генотип ВГВ был определен у 297 пациентов, у которых была определена ВН. Генотип D был зарегистрирован у 238 пациентов (80,1%), генотип А – у 49 (16,5%), генотип С – у 2 (0,7%). Случаи одновременного присутствия в плазме крови двух (А и D) генотипов вируса («микст-генотипов») были выявлены у 8 пациентов (2,7%).

Анализ зависимости между вирусной нагрузкой, определенной при выявлении ХГВ, и генотипом ВГВ у данных пациентов не показал статистически значимых различий при низкой и высокой ВН, в то время как средняя ВН достоверно чаще наблюдалась при ВГВ генотипа D (табл. 3.1).

Были также обследованы 67 человек из г. Петрозаводска (Карелия). ВГВ был обнаружен у всех 67 (100%) пациентов: у 26 - в сыворотке крови и ткани печени, с вирусной нагрузкой в плазме крови $2,9 \pm 0,8 \times 10^4$ копий/мл, и у остальных 41 – только в ткани печени. Генотип ВГВ был определен у 23

пациентов из Петрозаводска (табл. 3.2). В Карелии также преобладал ВГВ генотипа D, при этом доля генотипа А по сравнению с пациентами из Санкт-Петербурга и ЛО была ниже (8,7% и 16,5%, соответственно).

Таблица 3.1 -Зависимость между вирусной нагрузкой и генотипом ВГВ

Вирусная нагрузка	Генотип D	Генотип А
Менее 10 ⁴ копий/мл, n(%)	83 (36,2%)	31 (45,6%)
10 ⁴ -10 ⁶ копий/мл, n(%)	100 (43,7%)	20 (29,4%) *
Более 1 млн. копий/мл, n(%)	46 (20,1%)	17 (25%)
Итого, n(%)	229 (100,0)	68 (100,0)
*- Разница достоверна с I группой (P<0,05)		

Таблица 3.2 - Распределение генотипов вируса гепатита В среди больных ХГВ в г. Санкт-Петербурге и г. Петрозаводске в период с 2002-2006 гг. и 2008-2014 гг.

Исследуемый период, годы	Регион	Генотип D, n (%)	Генотип А, n (%)	Микст-генотип А+D, n (%)	Генотип ни А, ни D, n (%)	Всего, n (%)
2002-2006	Санкт-Петербург и Ленинградская область	173 (96%)	7 (4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	180 (100%)
	Республика Карелия	128 (71,6%)	36 (20,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	178 (100%)
2008-2014	Санкт-Петербург и Ленинградская область	238 (80,1%)*	49 (16,5%)*	8 (2,7%)*	2 (0,7%)	297 (100,0%)
	Республика Карелия	20 (87,0%)	2 (8,7%)	1 (4,3%)	0 (0,0%)	23 (100,0%)
* - Разница достоверна с периодом 2002-2006 гг. (P<0,05);						

По результатам более ранних исследований, в период с 2002 по 2006 гг. в Санкт-Петербурге преобладал ВГВ генотипа D (96%), однако ВГВ генотипа А был выявлен только у 4% пациентов, случаи же другого генотипа и «микст-генотипов» зафиксированы не были [4]. При сравнении с результатами наблюдения предыдущих годов, в 2008-2014 гг. на территории Санкт-Петербурга

отмечалось увеличение доли ВГВ генотипа А с 4% - в 2002-2006 гг. до 16,5% - в 2008-2014 гг. Также в 2008-2014 гг. были выявлены случаи «микст-генотипа» (2,7%) и генотипа С (0,7%).

Данные по циркуляции генотипов ВГВ в Карелии в 2008-2014 гг. не соответствуют результатам, полученным в период 2002-2006 гг., когда доля ВГВ генотипа А составляла 20,3%, а генотипа D – 71,6%. Изменение частоты встречаемости генотипов ВГВ, циркулирующих в Санкт-Петербурге и Петрозаводске, возможно, связано с различной степенью миграции населения в этих регионах, а также с возрастающими возможностями молекулярной биологии для выявления скрытых форм хронического вирусного гепатита.

Ранее было доказано, что генотип влияет на частоту хронизации, скорость сероконверсии HBeAg, уровень вирусной нагрузки, эффективность противовирусной терапии, вероятность возникновения мутаций и прогрессирование хронической инфекции в цирроз и ГЦК [85, 93, 104, 127]. В настоящее время известно 10 генотипов (А-J) и 9 серотипов ВГВ — ауw1, ауw2, ауw3, ауw4, аур, адw2, адw4, адrq-v, адrq- (см. Главу 1 «Обзор литературы»).

Не смотря на то, что генетический анализ не выявил четкого соответствия между генотипами и субтипами, некоторые субтипы свойственны нескольким определенным генотипам. В различных регионах мира структура циркулирующих субтипов HBsAg и генотипов ВГВ неодинакова. Исследование географического распределения серотипов и генотипов широко используется в качестве эпидемиологических маркеров для мониторинга эффективности применяемых вакцин против ВГВ [104, 127, 164].

Для ВГВ генотипа А найдены субтипы адw2 и ауw1. Субтипы ауw2 и ауw3 свойственны только ВГВ генотипа D [15, 127, 164].

Для более глубокого анализа структуры генома циркулирующих вирусов гепатита В, прослеживания их эволюционных связей и определения серотипа нами были получены последовательности 12 полных геномов ВГВ, полученных от 6 пациентов с ХГВ в различное время течения заболевания, методом глубокого секвенирования (NGS – секвенирования следующего поколения). У трех

пациентов секвенирование геномов ВГВ проводилось на разных этапах терапии для диагностики минорных вариантов популяции ВГВ (табл. 3.3). Образцы № 37-s27, 35-s25 и 36-s26 были получены от одного пациента после 6, 12 и 18 месяцев лечения ламивудином соответственно, а образец № 40-s30 после лечения энтекавиром данного пациента. Образцы № 43-s33, № 44-s34 и 46-s36 были получены от второго пациента до лечения, а также после 12 и 18 месяцев лечения энтекавиром, соответственно. Образцы №45-s35 и № 38-s28 были получены от третьего пациента до лечения и после 16 месяцев лечения телбивудином, соответственно. У остальных трех пациентов секвенирование геномов ВГВ проводилось до терапии (образцы № 42-s32 и № 39-s29), и во время вирусологического прорыва при лечении энтекавиром (образец № 41-s31).

Таблица 3.3 - NGS секвенирование геномов ВГВ

№ пациента	Время взятия образца сыворотки крови	№ образца ДНК ВГВ
1	после 6 месяцев лечения ламивудином	37-s27
	после 12 месяцев лечения ламивудином	35-s25
	после 18 месяцев лечения ламивудином	36-s26
	после лечения энтекавиром	40-s30
2	до лечения	43-s33
	после 12 месяцев лечения энтекавиром	44-s34
	после 18 месяцев лечения энтекавиром	46-s36
3	до лечения	45-s35
	после 16 месяцев лечения телбивудином	38-s28
4	до лечения	42-s32
5	до лечения	39-s29
6	до лечения	41-s31

Наряду с секвенированными последовательностями на филогенетическом древе также представлены последовательности изолятов из Международной базы данных GenBank, характеризующие основные антигенные серотипы (ayw2, ayw3, adw2), включенные в вакцины против ВГВ, применяемые в том числе, на

территории РФ, с учетом А и D генотипов, циркулирующих на территории Северо-Западного региона.

Проведенный филогенетический анализ показал, что все изоляты ВГВ (рис. 3.1) принадлежали к генотипу D2 (субтипу ауw3).

Превалирование ВГВ генотипа D отражает адекватность применяющихся в данном регионе вакцин, ориентированных на субтипы ауw2 и ауw3. Следует отметить, что увеличение циркуляции ВГВ генотипа А, определяющего субтипы адw и ауw, в Санкт-Петербурге и ЛО за последние годы требует дальнейшего мониторинга для исключения возможного снижения эффективности вакцинации. Применение вакцин, содержащих НВsAg субтипов ауw и адw, может исключить возможные проблемы вакцинации.

Следует отметить, что для ВГВ генотипа D характерно развитие мутаций в различных участках генома под действием аналогов нуклеозидов и иммунного прессинга [83, 85, 93]. Поскольку ВГВ генотипа D превалировал в Северо-Западном регионе, для дальнейшего анализа генетических вариантов ВГВ были отобраны 122 пациента с ХГВ.

3.2 Выявление мутантных форм ВГВ

3.2.1 Определение мутаций в гене полимеразы ВГВ, определяющих устойчивость к АН, методом прямого секвенирования

Для определения мутаций устойчивости к АН методом прямого секвенирования по Сенжеру у 122 пациентов с ХГВ (83 пациента из Санкт-Петербурга и Ленинградской области, 19 – из г. Петрозаводска и 20 человек из Вьетнама) была определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена полимеразы.

3.2.1.1 Определение мутаций устойчивости ВГВ к АН у пациентов г. Санкт-Петербурга

Для анализа мутаций устойчивости все пациенты из Санкт-Петербурга были разбиты на 5 групп.

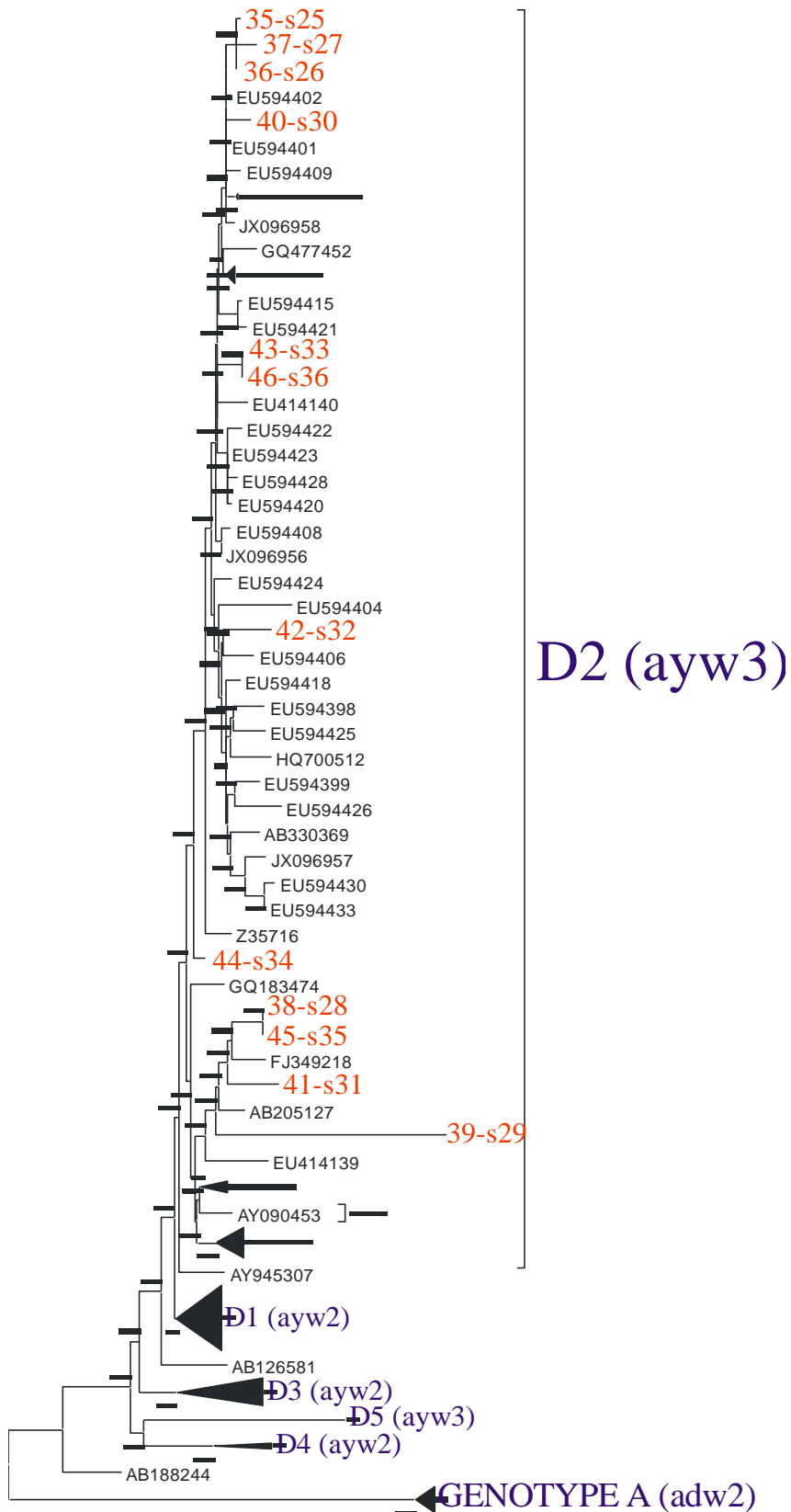


Рисунок 3.1 Филогенетическое дерево последовательностей полных геномов ВГВ. Референс-последовательности для сравнения взяты из международной базы данных GenBank [206]. Красным цветом отмечены последовательности ВГВ, полученные в данном исследовании.

Пациенты первой группы (n=14) получали монотерапию пегилированным интерфероном (ПЕГ-ИФН) и 1 пациент – ПЕГ-ИФН и энтекавир. 14 пациентов получали ПЕГ-ИФН в течение 48 недель и 1 пациент принимал ПЕГ-ИФН 3 года (табл. 3.4). Пациенты второй группы принимали ламивудин (ЛАМ), третьей группы – телбивудин (ТБВ), четвертой – энтекавир (ЭНТ), в пятую группу вошли пациенты, не получавшие противовирусную терапию (ПВТ).

Таблица 3.4 - Влияние замен в полимеразе на эффективность лечения пациентов с ХГВ из Санкт-Петербурга

Показатели, n (%)	Группа I Пег-ИФН n=15	Группа II ЛАМ n=18	Группа III ТБВ n=10	Группа IV ЭНТ n=27	Группа V без ПВТ n=13
Мужчины	12 (80%)	11 (61%)	7 (70%)	19 (70%)	6 (46%)
Женщины	3 (20%)	7 (39%)	3 (30%)	8 (30%)	7 (54%)
Средний возраст	36,5±17,6	29,7±16,7	37,9±15,2	38,4±14,2	45±11,7
Средняя длительность лечения, недели	54±24	47±34	144,4±7,2	159,7±8,5	0±0
HBsAg(+) до лечения	15 (100%)	18 (100%)	10 (100%)	27 (100%)	13 (100%)
HBeAg(+) до лечения	2 (13%)	4 (22%)	1 (10%)	7 (26%)	0 (0%) **, ****
AbHBe (+) до лечения	13 (87%)	14 (78%)	9 (90%)	20 (74%)	13 (100%) **, ****
Снижение вирусной нагрузки	6 (40%)	6 (33%)	3 (30%)	12 (44%)	0 (0%) *, **, ****
Без эффекта	4 (27%)	11 (61%) **	1 (10%) **	6 (22%) **	13 (100%) *, **, **, ****
Рост уровня вирусной нагрузки при терапии	2 (13%) **	1 (6%) ***, ****	6 (60%) *, **	8 (30%) **	0 (0%) ***, ****
Рост уровня вирусной нагрузки после прекращения лечения	3 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)	0 (0%)
Замены в полимеразе, приводящие к резистентности	0 (0%)**	5 (28%)*	2 (20%)	3 (11%)	1 (7%)**

* - Разница достоверна с I группой (P<0,05); ** - Разница достоверна с группой II (P<0,05); *** - Разница достоверна с группой III (P<0,05); **** - Разница достоверна с группой IV (P<0,05);

Длительность лечения АН была различной (от трех месяцев до шести лет) из-за разного исходного уровня вирусной нагрузки, степени фиброза и в соответствии с этим разного ответа на терапию АН.

Среди пациентов первой группы, получавших терапию Пег-ИНФ, снижение вирусной нагрузки до недектируемого уровня (менее 300 копий/мл) наблюдалась у шести (40%) пациентов (табл. 3.4). Причем у двух пациентов была зарегистрирована HBeAg-сероконверсия (исчезновение детектируемого титра HBeAg, и появление AbHBe), у четырех - ответа на терапию не выявлено, поэтому два пациента были переведены на терапию телбивудином, и один – энтекавиром. У пяти пациентов после временного снижения наблюдалось резкое увеличение уровня вирусной нагрузки во время терапии (n=2) или после прекращения лечения (n=3), двоим из этих пациентов впоследствии была назначена терапия энтекавиром. Мутаций устойчивости к АН в гене полимеразы ВГВ в данной группе обнаружено не было. У шести пациентов второй группы (33%) регистрировалось снижение вирусной нагрузки, причем у пяти пациентов – до недектируемого уровня, и у одного – более чем в два раза. В оставшихся случаях эффекта от лечения выявлено не было: у 11 пациентов (61%) уровень вирусной нагрузки при приеме ламивудина не менялся, а у одного пациента после временного снижения с 3млн копий/мл до 900 копий/мл после 6 месяцев терапии вирусная нагрузка возрасла до исходного уровня в течении последующих 6 месяцев приема ламивудина.

Среди пациентов, не ответивших на лечение ламивудином, три пациента были переведены на терапию телбивудином, пять – энтекавиром, и один пациент получал параллельно телбивудин и энтекавир в рамках клинического исследования. Мутации устойчивости были выявлены у пяти пациентов, не ответивших на терапию. У четырех пациентов были обнаружены замены, приводящие к вторичным (компенсаторным) мутациям устойчивости: rtQ215S (n=1), rtL80V (n=1) и rtS85F+rtV84G (n=2), в то время как первичных мутации устойчивости обнаружено не было. Мутации, приводящие к заменам в 215, 80, 84

и 85 положениях обратной транскриптазы – это вторичные или компенсаторные мутации, усиливающие первичную устойчивость к ламивудину [56]. Следует отметить, что в отличие от других, замена rtS85F была найдена только у пациентов после лечения ламивудином с или без замены rtM204I/V [30]. Существует предположение, что замена rtS85F – это второй эволюционный путь, наряду с заменой rtL80I/V, для усиления первичной устойчивости индуцированной заменой rtM204I [30]. Хотя в данном исследовании замены rtL80V и rtS85F найдены у пациентов, не ответивших на терапию ламивудином, первичной мутации устойчивости у этих пациентов обнаружено не было. Мутация в YMDD-мотиве полимеразы (rtM204I), приводящая к резистентности вируса была выявлена у одного пациента после 6 месяцев лечения ламивудином. Через 18 месяцев лечения ламивудином у этого пациента были обнаружены ряд замен в полимеразном белке (rtM204V, rtL80I, rtL180M, rtA181V), усиливающих невосприимчивость вируса к терапии [30, 96].

Снижение вирусной нагрузки было диагностировано у трех пациентов третьей группы (30%). После неэффективной терапии ламивудином у одного пациента лечение телбивудином и энтекавиром привело к снижению вирусной нагрузки до недектируемого уровня (менее 50 копий/мл). У второго - лечение телбивудином привело к появлению антител к HBeAg, при этом снижение синтеза белка не зафиксировано, а концентрация ДНК ВГВ колебалась в диапазоне 300-1000 копий/мл. У третьего пациента вирусная нагрузка снизилась с 10 миллионов копий/мл до недектируемого уровня за 4 года лечения телбивудином. У остальных (n=6; 60%) - регистрировался рост виремии на фоне терапии. Поэтому пять из семи пациентов были переведены на терапию энтекавиром. Мутации устойчивости к телбивудину были выявлены у двух пациентов. У одного пациента - после возникновения устойчивости к ламивудину, лечение в течение 14 месяцев телбивудином привело к появлению дополнительных изменений в последовательности полимеразы (замены rtM204V, rtV173L, rtL180M, rtA181C), что по данным литературы снижает эффективность противовирусной терапии [30, 96, 97]. У второго пациента после 58 месяцев лечения телбивудином были

обнаружены мутации устойчивости в гене полимеразы, приводящие к заменам rtM204I, rtL80I и rtQ215S.

Среди пациентов четвертой группы снижение уровня вирусной нагрузки до недетектируемого уровня регистрировалось в 44% случаев (n=12), причем у двух пациентов во время терапии произошла HBsAg-сероконверсия, и у одного – появление AbHBe на фоне исчезновения HBeAg. У шести пациентов лечение энтекавиром в течении года не привело к подавлению репликации вируса и вирусная нагрузка оставалась на прежнем уровне. Рост виремии наблюдался у 8 пациентов во время терапии (табл. 3.5), а также у одного пациента в течении года после прекращения лечения (с недетектируемого уровня ВН до 16500 копий/мл).

Таблица 3.5 - Увеличение вирусной нагрузки (ВН) у пациентов при лечении энтекавиром

Пор.№ пациента	Уровень ВН до терапии, копий/мл	Уровень ВН после терапии, копий/мл	
1	13700	менее 50 (через полгода лечения)	29308 (через 3 года лечения)
2	5,03 x10 ⁶	23700 (через 1,5 года лечения)	более 50x10 ⁶ (через 2 года лечения)
3	165000	менее 300 (через 1,5 года лечения)	7300 (через 2 года лечения)
4	341200	1,02x10 ⁶ (через 1 год лечения)	
5	36500	менее 300 (через 1 год лечения)	4700 (через 3 года лечения)
6	1610	271000 (через 2 года лечения)	237000 (через 3 года лечения)
7	менее 300	менее 300 (через 6 лет лечения)	более 50 млн (через 7 лет лечения)
8	372000	3,01x10 ⁶ (через 0,5 года лечения)	

Вирусологический прорыв при лечении энтекавиром у двух пациентов (табл. 3.5 пациенты №2 и №7) было следствием выявленных мутаций устойчивости, приводящих к заменам rtM204V, rtV173L и rtL180M. Причем у одного из них также выявлена замена rtL229V, которая совместно с заменой rtM204V снижает сродство обратной транскриптазы к энтекавиру [30]. У пациента с резистентностью к ламивудину и телбивудину (табл. 3.5 пациент №8)

лечение энтекавиром также не было эффективным ввиду сохранения популяции мутантных вирусов (сохранялись замены: rtM204V, rtV173L, rtL180M, rtA181C) и лишь после добавления в схему лечения тенофовира вирусная нагрузка за 12 месяцев снизилась до уровня 300 копий/мл.

В группе пациентов, не получавших противовирусную терапию, была обнаружена замена rtS78T (n=1), характерная для АДФ-устойчивых вариантов ВГВ. Не смотря на то, что данная замена может быть найдена у пациентов, не получавших терапию АН, она может потенциально воздействовать на патогенез и онкогенность ВГВ (более подробно это описано в п. 3.2.4) [30].

В настоящее время накоплено большое количество данных об использовании АН для лечения ХГВ. Не смотря на то, что во время терапии или после окончания лечения часто наблюдается резкое увеличение уровня вирусной нагрузки, длительное использование АН с высоким барьером против возникновения мутаций устойчивости, таких как тенофовир и энтекавир, оправдано и показало высокую эффективность [2, 41]. Показано, что у пациентов, не получавших ранее ПВТ, лечение энтекавиром и телбивудином приводит к снижению ВН, нормализации биохимических и печеночных показателей уже в первый год терапии [4, 10–12].

Значительно меньше данных о применении АН у пациентов с неэффективной предыдущей схемой лечения. При возникновении устойчивости к ламивудину применение телбивудина может привести к кросс-резистентности, и как следствие, к усилению устойчивости, что было показано в нашем исследовании у одного пациента. У пациентов, не ответивших на терапию ламивудином и/или телбивудином, использование энтекавира не всегда достаточно эффективно. В нашем исследовании у пациента с резистентностью к ламивудину и телбивудину снижение вирусной нагрузки было зарегистрировано только после добавления тенофовира.

Полученные нами результаты показали, что увеличение ВН или ее отсутствие при длительном лечении АН лишь в редких случаях может быть следствием возникновения мутаций. Лечение энтекавиром показало высокую

эффективность. Однако длительная терапия энтекавиром в редких случаях может привести к резистентности, что было показано у двух человек на третий и восьмой год приема препарата.

3.2.1.2 Определение мутаций устойчивости ВГВ к АН у пациентов г. Петрозаводска

Мутации устойчивости к АН у пациентов с ХГВ из Петрозаводска определяли у 19 пациентов с ХГВ. Соотношение мужчин и женщин в этой группе: мужчин – 12 (63,2%), женщин – 7 (36,8%). Средний возраст $44 \pm 6,8$ г. Средняя вирусная нагрузка $2,3 \pm 1,5 \times 10^4$ копий/мл. У всех пациентов данной группы были выявлены антитела к HBeAg (AbHBe) и у 13 человек (68%) – HBsAg. У 6 пациентов (32%) с отрицательным значением HBsAg были найдены антитела к коровому белку (AbHBcorIgG). Среди пациентов данной группы, получавших терапию АН, у одного пациента была найдена замена rtL80V и у одного пациента – замены rtA181S и rtQ215H, также были определены вторичные мутации устойчивости, приводящие к замене rtV84G - у двух пациентов и rtQ215S - у одного пациента. Мутаций, приводящих к заменам rtM204I/V, обнаружено не было.

3.2.1.3 Определение мутаций устойчивости ВГВ к АН у пациентов из Вьетнама

Мутации устойчивости к АН у пациентов с ХГВ из г. Ханой (Вьетнам) определяли у 20 пациентов с ХГВ. Средний возраст $29,3 \pm 9,8$ г. По половому составу: 13 мужчин – 65% и 7 женщин – 35%. Средняя вирусная нагрузка составила $43,78 \pm 16,6 \times 10^7$ копий/мл. Только у двух пациентов был диагностирован HBeAg, у остальных же только AbHBe. Распределение генотипов в этой группе было следующим: ВГВ генотипа В был найден у 15 (75%) пациентов, в остальных случаях был выявлен ВГВ генотипа С (25%). Среди пациентов данной группы 7 человек не получали противовирусную терапию и мутаций устойчивости к АН у них выявлено не было (табл.3.6). Для лечения ХГВ у 13 пациентов применялась комбинированная терапия аналогами нуклеозидов (ламивудин/адефовир). Среди этих больных у трех человек были выявлены замены rtS202N и rtA181T, и у одного пациента только rtS202N.

Таблица 3.6 - Выявление мутаций устойчивости ВГВ к к аналогам нуклеот(з)идов у пациентов с ХГВ из Вьетнама

Показатели	Группа I без ПВТ n=7	Группа II ЛАМ+АДФ n=13
Мужчины, n (%)	5 (71%)	8 (62%)
Женщины, n (%)	2 (29%)	5 (38%)
Средний возраст, годы	31,4±6,6	28,2±10,6
Средняя вирусная нагрузка, копии/мл	50,4±5,4x10 ⁶	61,8±19,4x10 ⁷
НВеAg(+) до лечения, n (%)	1 (14%)	1 (8%)
AbHBe (+) до лечения, n (%)	6 (86%)	12 (92%)
Генотип В, n (%)	4 (57%)	11 (85%)
Генотип С, n (%)	3 (43%)	2 (15%)
Замены в полимеразе, приводящие к резистентности, n (%)	0 (0%)	rtS202N – 4 (31%)* rtA181T – 3 (23%)
*- Разница достоверна с I группой (P<0,05);		

В анализируемый период времени во Вьетнаме широко применялась комбинированная терапия аналогами нуклеозидов (ламивудин/адефовир), что объясняет наличие мутации резистентности rtA181T у исследуемых пациентов. Особо следует отметить, что обследованные пациенты из Вьетнама не получали лечение энтекавиром, однако геном вируса гепатита В уже содержал мутации устойчивости rtS202N.

Появление резистентности при длительном лечении ламивудином связано в первую очередь с появлением замен rtM204I/V, которые разрушают YMDD (тирозин, метионин, аспартат, аспартат) локус в каталитическом центре С домена гена полимеразы и оказывают стерические препятствия для связывания с ламивудином [40, 101, 161]. Замена лейцина на метионин в В домене полимеразы (rtL180M) часто сопровождает rtM204I/V замену [41, 96], что повышает репликативную эффективность YMDD-мутанта, возможно, путем связывания с природным dNTP [97]. Устойчивость к адефовиру редко встречается в первый год лечения и связана с заменами D и в В домене полимеразы (rtN236T и rtA181V, соответственно) [41, 97, 101]. Таким образом у пациентов при комбинированной терапии ламивудином и адефовиром часто наблюдается резистентность под

действием замены rtA181V, что и было показано у трех пациентов в данном исследовании.

Замена в 202 положении (rtS202I/G/C) обратной транскриптазы характерна для пациентов с резистентностью к энтекавиру, наряду с другими специфичными заменами: T184S/I/A/L/G и M250I/V, а также замен, характерных для лечения ламивудином M204I/V, L180M [74, 84, 119, 173]. В данном исследовании замена rtS202N была определена у четырех пациентов, не получавших лечение энтекавиром. Не смотря на то, что замена rtS202N может быть определена у пациентов до терапии энтекавиром [30], однако у трех из четырех пациентов с заменой rtS202N также была найдена замена rtA181V. Возможно, замена в 202 положении обратной транскриптазы возникает для усиления устойчивости к ламивудину/адефовиру по механизму сходному с механизмом возникновения резистентности к энтекавиру [119].

3.2.2 Выявление мутаций, приводящих к изменениям YMDD-мотива ВГВ, методом ПЦР в реальном времени

В последние десятилетия в России для лечения ХГВ широко применялись аналоги нуклеозидов (ламивудин, телбивудин и энтекавир). Однако длительная терапия данными препаратами часто не была эффективна из-за возникновения мутации устойчивости rtM204I/V, которые изменяют YMDD-мотив (тирозин, метионин, аспарат, аспарат) - локус в каталитическом центре гена полимеразы, и создают стерические препятствия для связывания с аналогами нуклеозидов (ламивудин, телбивудин, энтекавир) [40, 101, 161].

Применение аналогов нуклеотидов (адефовир и тенофовир) у пациентов с устойчивостью к ламивудину, телбивудину и энтекавиру показало высокую эффективность. В связи с этим, раннее выявление мутаций устойчивости к АН имеет большое значение для определения стратегии лечения пациентов с ХГВ.

Для определения мутации устойчивости в YMDD-мотиве полимеразы (rtM204I/V) был разработан метод, основанный на ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

3.2.2.1 Специфичность метода

Для оценки специфичности праймеров были сконструированы плазмиды pUC18 со вставкой из последовательности ДНК, кодирующей М, I или V в 204 положении обратной транскриптазы (рис. 3.2).

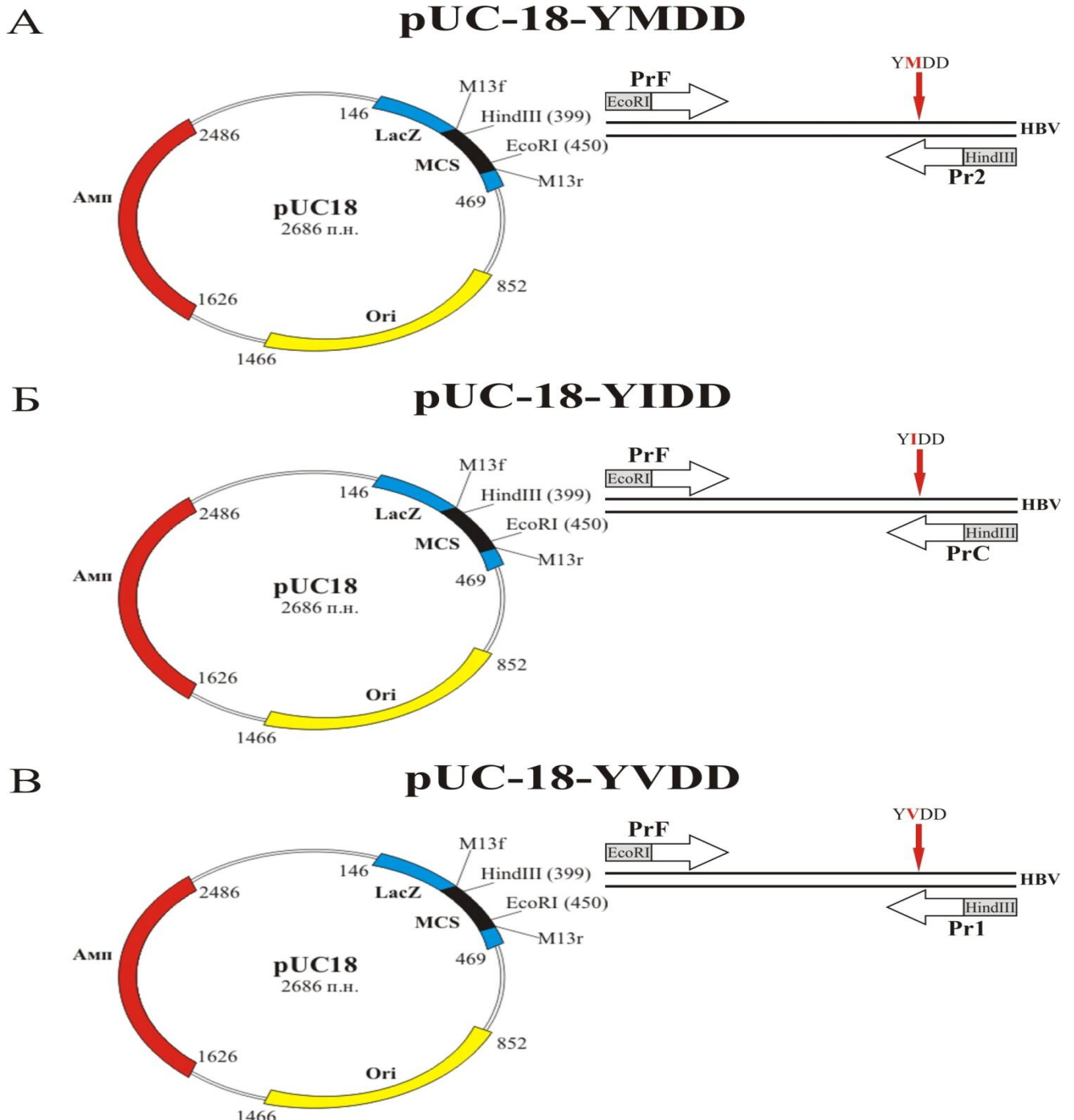


Рисунок 3.2 Схема конструирования плазмид pUC-18-YMDD, pUC-18-YIDD и pUC-18-YVDD. LacZ – лактозный оперон; MCS – сайт множественного клонирования; Ori – участок начала репликации; Амп – ген устойчивости к ампициллину; EcoRI, HindIII – сайты узнавания для ферментов рестрикции; M13f, M13r – последовательности для праймеров M13f и M13r; PrF, Pr1, Pr2, PrC - ПЦР-праймеры с сайтами узнавания для ферментов рестрикции;

Наличие вставки в данных плаزمидах было подтверждено секвенированием с использованием праймеров M13F и M13R. Расчет статистически достоверной разницы в среднем значении Ct позволил определить положительные результаты ПЦР: для pUC-18-YMDD $\Delta Ct_1 \geq 5$, $\Delta Ct_2 < 5$; для pUC-18-YIDD $\Delta Ct_1 \geq 5$, $\Delta Ct_2 \geq 5$; для pUC-18-YVDD $\Delta Ct_1 < 5$, $\Delta Ct_2 \geq 5$, где $\Delta Ct_1 = Ct_{Pr1} - Ct_{PrC}$, $\Delta Ct_2 = Ct_{Pr2} - Ct_{PrC}$ (рис. 3.3).

Для pUC-18-YMDD разница достоверна между Pr1 и Pr2 ($P=0,0079$), между Pr1 и PrC ($P=0,0079$) и не достоверна между Pr2 и PrC ($P>0,9999$) (рис. 3.3 Г). Для pUC-18-YIDD разница достоверна между Pr1 и PrC ($P=0,0079$), между Pr2 и PrC ($P=0,0079$) и не достоверна между Pr1 и Pr2 ($P=0,1429$) (рис. 3.3 Д). А для pUC-18-YVDD разница достоверна между Pr1 и Pr2 ($P=0,0079$), между Pr2 и PrC ($P=0,0079$) и не достоверна между Pr1 и PrC ($P>0,9999$) (рис. 3.3 Е).

Для пары праймеров prF и pr1 разница достоверна для плазмид pUC-18-YMDD и pUC-18-YVDD ($P=0,0079$) и для плазмид pUC-18-YIDD и pUC-18-YVDD ($P=0,0079$) и не достоверна для плазмид pUC-18-YMDD и pUC-18-YIDD ($P=0,2063$) (рис. 3.3 Ж). Для пары праймеров prF и pr2 разница достоверна для плазмид pUC-18-YMDD и pUC-18-YVDD ($P=0,0079$) и для плазмид pUC-18-YMDD и pUC-18-YIDD ($P=0,0159$) и не достоверна для плазмид pUC-18-YIDD и pUC-18-YVDD ($P=0,0517$) (рис. 3.3 З). Для пары праймеров prF и prC разница не достоверна для плазмид pUC-18-YIDD и pUC-18-YVDD ($P=0,4841$), для плазмид pUC-18-YMDD и pUC-18-YVDD ($P=0,1111$) и для плазмид pUC-18-YMDD и pUC-18-YIDD ($P=0,381$) (рис. 3.3 И).

Для оценки специфичности праймеров в образцах, содержащих различные варианты ВГВ, плазмиды pUC-18-YIDD и pUC-18-YVDD были смешаны с плазмидой pUC-18-YMDD («дикий тип») в конечной концентрации 10^5 копий/мл (табл. 3.7). Было показано, что праймеры, выявляющие замену rtM204V специфичны, если образец содержит 30 и более процентов плазмиды pUC-18-YVDD. В случаях, если образец содержит 10 и менее процентов плазмиды pUC-18-YVDD замена rtM204V не выявляется, а регистрируется только «дикий» тип вируса.

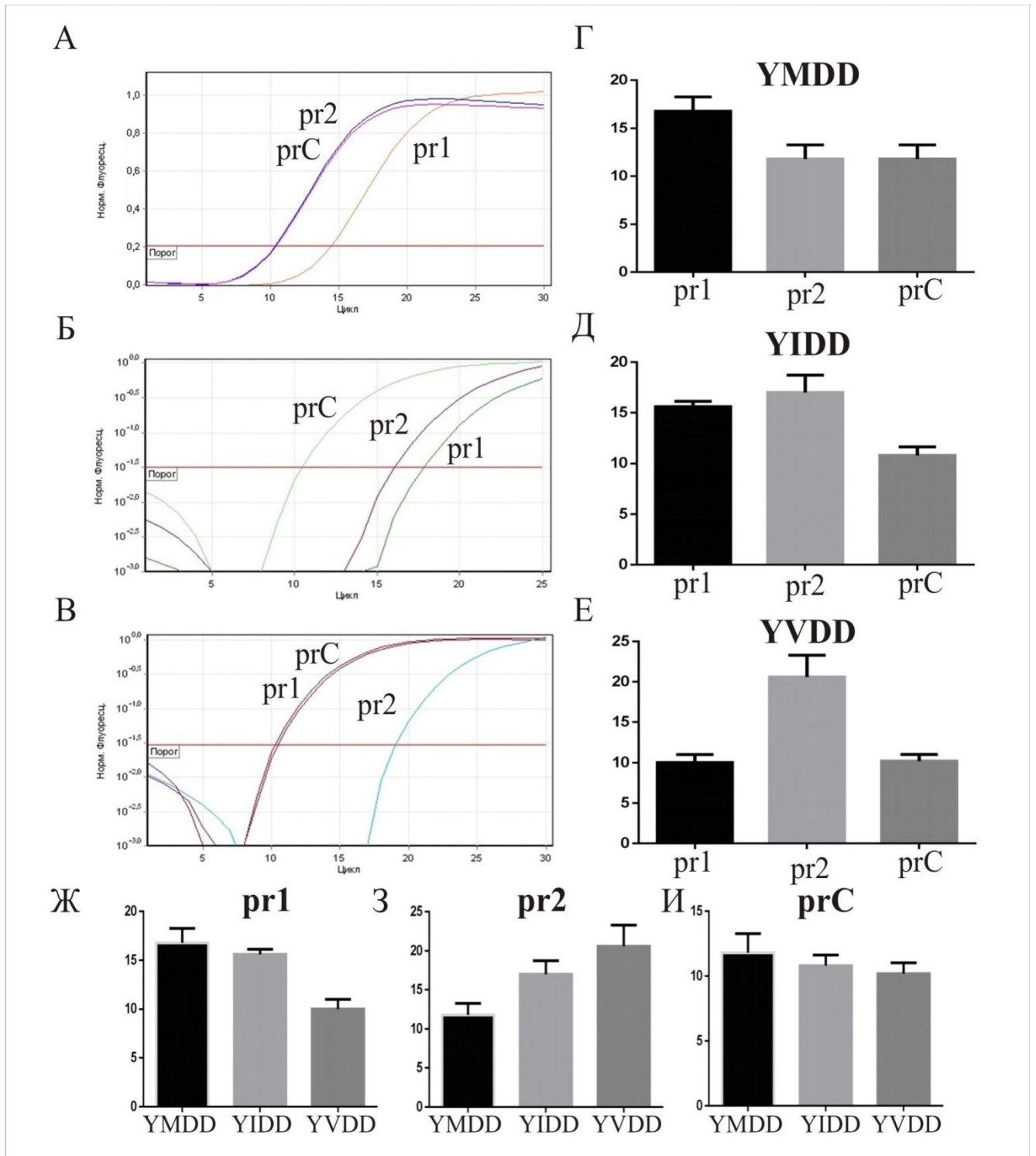


Рисунок 3.3 Специфичность праймеров для анализа мутаций устойчивости *rtM204I/V* и расчет статистически достоверной разницы в значении *Ct* для *pUC-18-YMDD*, *pUC-18-YIDD* и *pUC-18-YVDD*. Амплификация плазмид *pUC-18-YMDD* в концентрации 10^4 копий/мл (А), *pUC-18-YIDD* в концентрации 10^3 копий/мл (Б), *pUC-18-YVDD* в концентрации 10^3 копий/мл (В) Средние значения *Ct* для плазмиды *pUC-18-YMDD* (Г), для плазмиды *pUC-18-YIDD* (Д), для плазмиды *pUC-18-YVDD* (Е), для пары праймеров PrF и Pr1 (Ж), для пары праймеров PrF и Pr2 (З), для пары праймеров PrF и PrC (И).

Таблица 3.7 - Оценка специфичности праймеров в образцах, содержащих различные варианты плазмид

Пор. №	Образец	Итоговый результат
1	50% pUC-18-YVDD + 50% pUC-18-YMDD	M/V
2	30% pUC-18-YVDD + 70% pUC-18-YMDD	M/V
3	10% pUC-18-YVDD + 90% pUC-18-YMDD	M
4	50% pUC-18-YIDD + 50% pUC-18-YMDD	M/I
5	30% pUC-18-YIDD + 70% pUC-18-YMDD	M/I
6	10% pUC-18-YIDD + 90% pUC-18-YMDD	M
7	30% pUC-18-YIDD + 30% pUC-18-YVDD + 40% pUC-18-YMDD	V/I/M
8	10% pUC-18-YIDD + 30% pUC-18-YVDD + 60% pUC-18-YMDD	M/V
9	30% pUC-18-YIDD + 10% pUC-18-YVDD + 60% pUC-18-YMDD	M/I

Применение праймеров, выявляющих замену rtM204I, показало аналогичные результаты. Было обнаружено, что в образцах, содержащих три плазмиды: 30% pUC-18-YIDD, 30% pUC-18-YVDD и 40% pUC-18-YMDD, выявлялись три варианта последовательности ВГВ (rtM204M/I/V) с преобладанием «мутантных» типов вируса (rtM204I и rtM204V). В образцах, содержащих 60% pUC-18-YMDD, 30% pUC-18-YVDD и 10% pUC-18-YIDD, регистрировалась только последовательность с заменой rtM204V и «дикий» тип вируса. Аналогично, в образцах, содержащих 60% pUC-18-YMDD, 30% pUC-18-YIDD и 10% pUC-18-YVDD, выявлялись только последовательности с заменой rtM204I и «дикий» тип вируса.

3.2.2.2 Чувствительность метода

Чувствительность метода ПЦР оценивали с помощью серии разведений плазмид pUC-18-YMDD, pUC-18-YIDD и pUC-18-YVDD до конечных концентраций 1млн, 100 тыс., 10 тыс., 1 тыс. и 100 копий/мл (пять повторов для каждого разведения). Результаты представлены на рисунках 3.4-3.6. Для плазмиды pUC-18-YVDD были сделаны дополнительные серии разведений до

конечных концентраций 10 и 1 копий/мл. Это было сделано для корректного анализа чувствительности и эффективности ПЦР (см. п. 3.2.2.3).

Чувствительность ПЦР составила 100 копий/мл и менее (для плазмиды pUC-18-YVDD). Однако при оценке специфичности была рассчитана разница в среднем значении C_t (см. п. 3.2.2.1), которая составила 5 циклов. Данный расчет специфичности достоверен только при конечной концентрации плазмид pUC-18-YMDD, pUC-18-YIDD и pUC-18-YVDD 1млн, 100 тыс., 10 тыс. и 1 тыс. копий/мл.

Таким образом, общая чувствительность разработанного метода составила 1000 копий/мл.

3.2.2.3 Расчет эффективности ПЦР

Во всех исследуемых образцах для серии разведений был рассчитан показатель эффективности ПЦР (E). Во всех случаях $E=2$, что подтверждает специфичность данных реакций без образования побочных продуктов или димеров праймеров (рис. 3.4-3.6).

Отсутствие побочных продуктов также было подтверждено анализом кривых плавления для данных ПЦР продуктов (рис. 3.7).

3.2.2.4 Сравнение результатов ПЦР-РВ и секвенирования по Сенжеру

Для сравнения результатов секвенирования и ПЦР-РВ разработанный метод был апробирован на образцах плазмы крови от пациентов с определенной секвенированием по Сенжеру последовательностью, кодирующей YMDD-мотив.

Мутаций устойчивости к АН определяли у 5 групп пациентов с ХГВ (табл. 3.4). Пациенты первой группы получали монотерапию пегилированным интерфероном (ПЕГ-ИФН), пациенты второй группы принимали ламивудин (ЛАМ), третьей группы – телбивудин (ТБВ), четвертой – энтекавир (ЭНТ). В пятую группу вошли пациенты, не получавшие противовирусную терапию (ПВТ). В сыворотке крови от пациентов первой и пятой групп вирусов, содержащих мутации устойчивости rtM204I/V к АН выявлено не было, что было подтверждено результатами ПЦР (табл. 3.8).

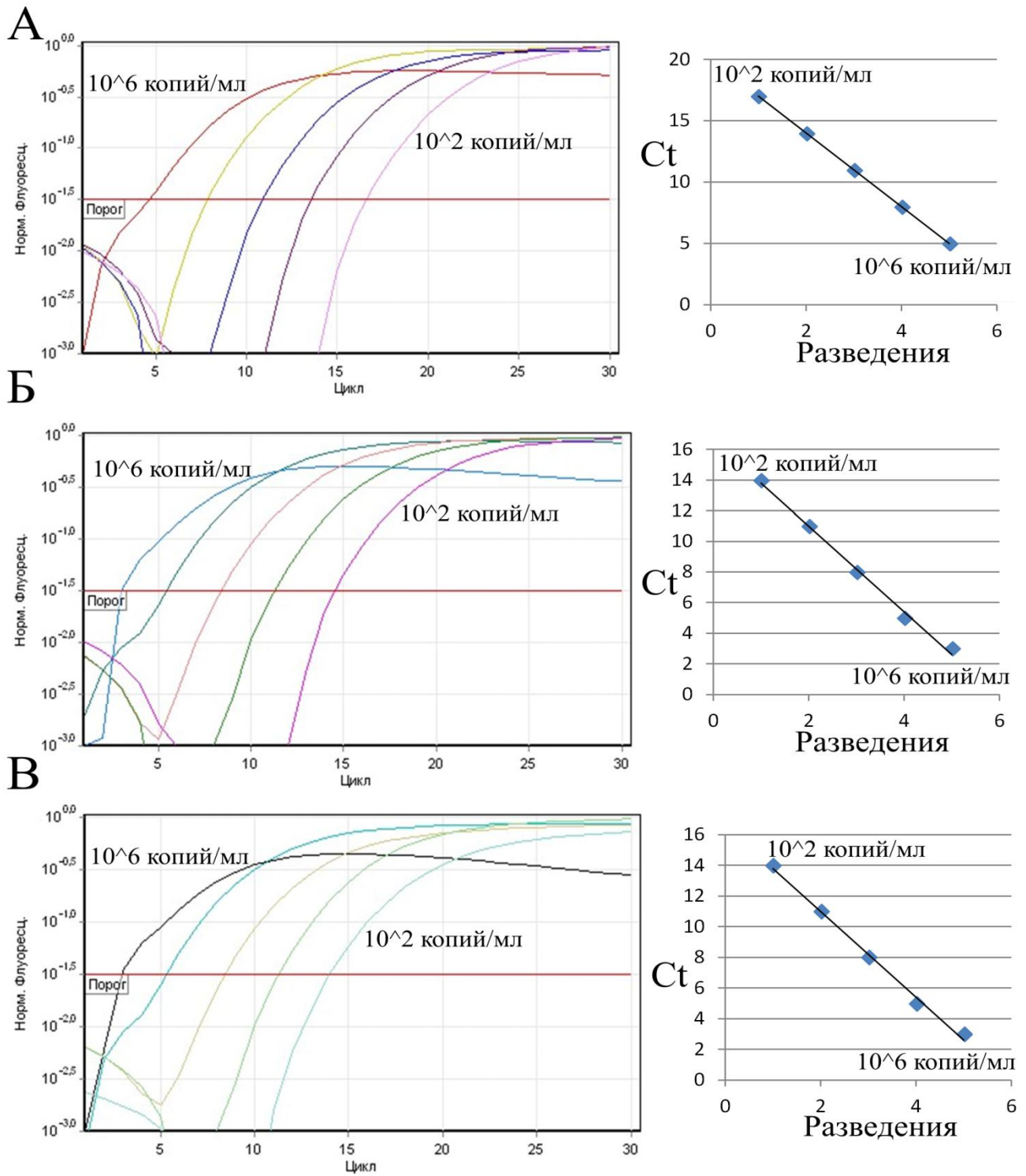


Рисунок 3.4 Чувствительность и анализ эффективности метода ПЦР для плазмиды rUC-18-YMDD в концентрациях 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10² копий/мл (А) Амплификация с праймерами PrF и Pr1, стандартные кривые: $Y = -3X + 20$. Slope=-3. R2=1. E=2. (Б) Амплификация с праймерами PrF и Pr2, стандартные кривые: $Y = -2,8X + 16,6$. Slope=-2,8. R2=0,99. E=2. (В) Амплификация с праймерами PrF и PrC, стандартные кривые: $Y = -2,8X + 16,6$. Slope=-2,8. R2=0,99. E=2.

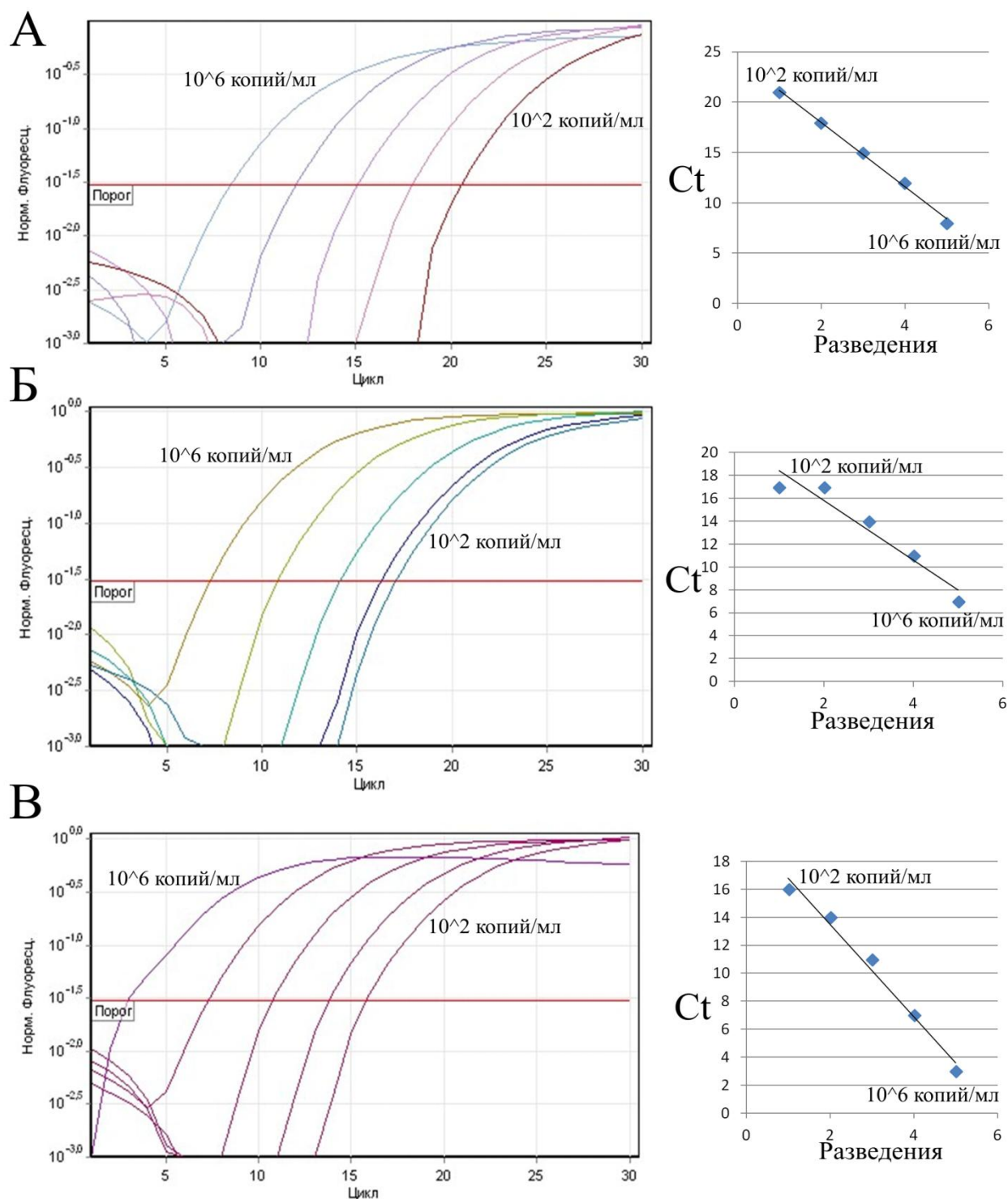


Рисунок 3.5 Чувствительность и анализ эффективности метода ПЦР для плазмиды pUC-18-YIDD в концентрациях 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10² копий/мл (А) Амплификация с использованием праймеров PrF и Pr1, стандартные кривые: $Y = -2,2X + 24,4$. Slope = -3,2. R² = 0,99. E = 2. (Б) Амплификация с использованием праймеров PrF и Pr2, стандартные кривые: $Y = -2,6X + 21$. Slope = -2,6. R² = 0,93. E = 2. (В) Амплификация с использованием праймеров PrF и PrC, стандартные кривые: $Y = -3,3X + 20,1$. Slope = -3,3. R² = 0,98. E = 2.

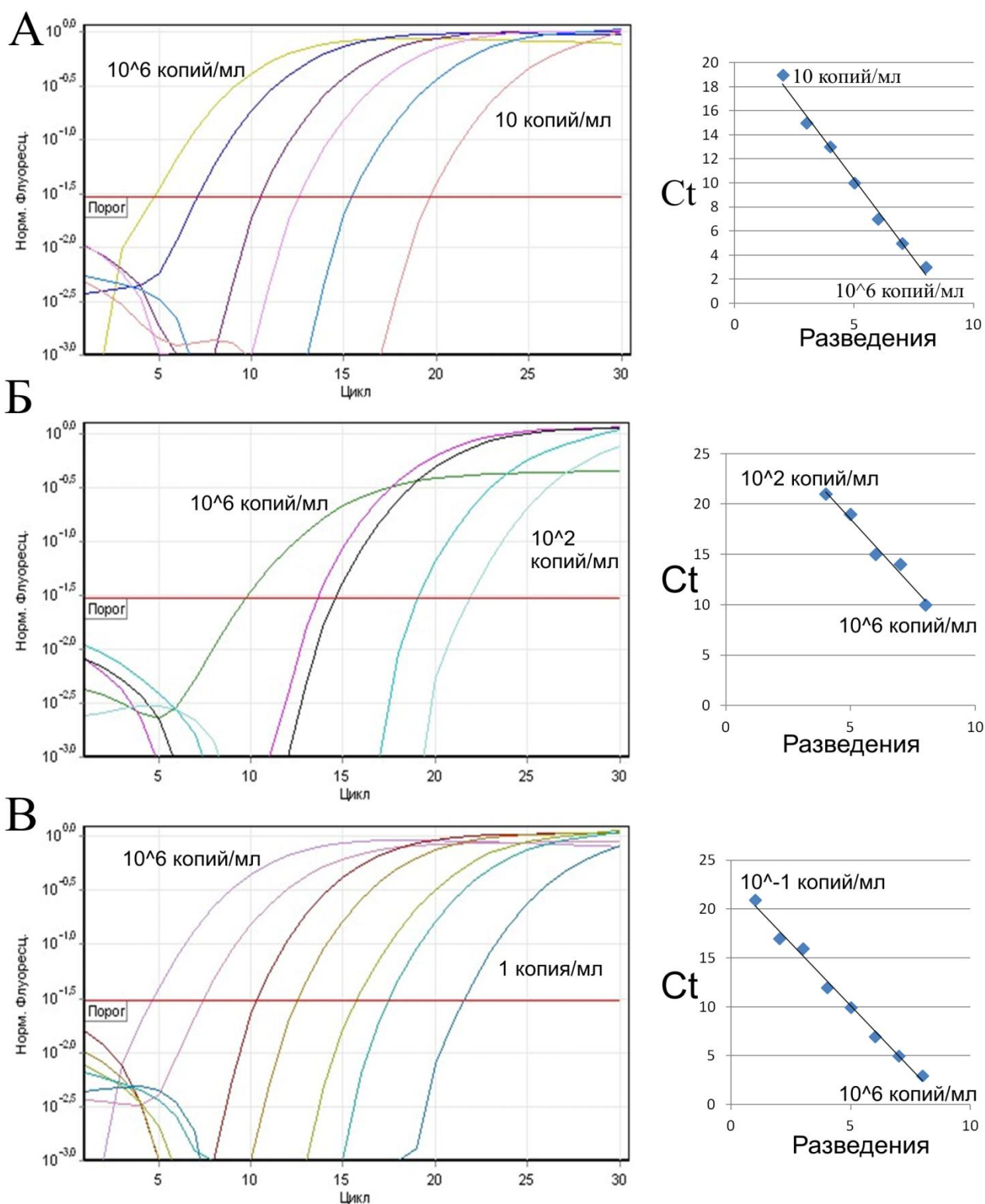


Рисунок 3.6 Чувствительность и анализ эффективности метода ПЦР для плазмиды rUC-18-YVDD в концентрациях 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, 10⁰, 10⁻¹ копий/мл (А) Амплификация с праймерами PrF и Pr1, стандартные кривые: $Y = -2,6X + 23,5$. Slope = -2,6. R2 = 0,99. E = 2. (Б) Амплификация с праймерами PrF и Pr2, стандартные кривые: $Y = -2,7X + 32$. Slope = -2,7. R2 = 0,97. E = 2. (В) Амплификация с праймерами PrF и PrC, стандартные кривые: $Y = -2,6X + 22,9$. Slope = -2,6. R2 = 0,99. E = 2.

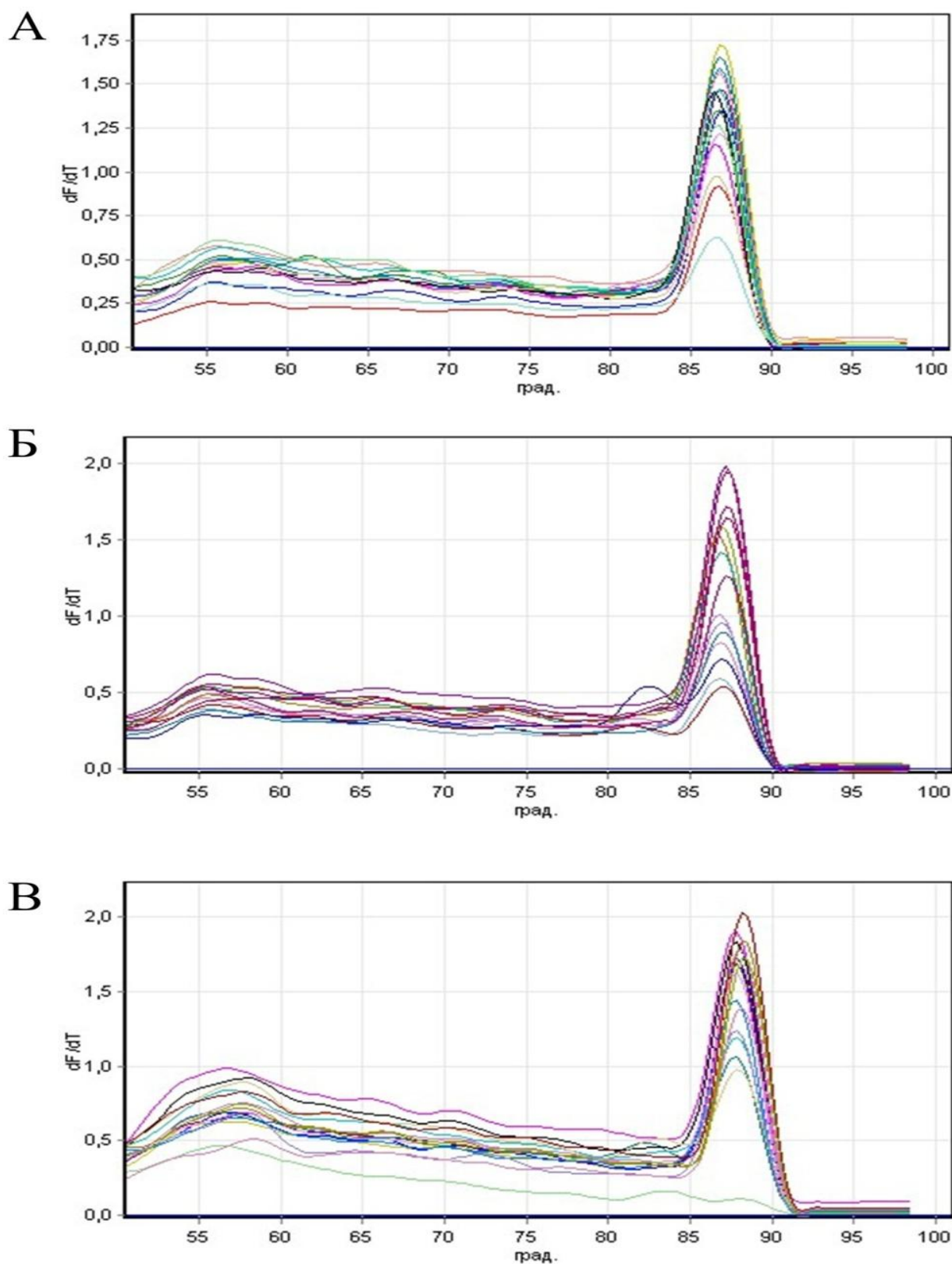


Рисунок 3.7 Анализ кривых плавления (А) Амплификация плазмиды pUC-18-YMDD в концентрациях 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 копий/мл, (Б) Амплификация плазмиды pUC-18-YIDD в концентрациях 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 копий/мл, (В) Амплификация плазмиды pUC-18-YVDD в концентрациях 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} копий/мл.

Таблица 3.8 - Сравнение результатов ПЦР и секвенирования по Сенжеру у пациентов с ХГВ

		Аминокислотный остаток в 204 положении обратной транскриптазы		Примечание
		Секвенирование по Сенжеру	ПЦР в реальном времени	
Группа I ПЕГ-ИФН (n=15)	n=15 (100%)	M	M	
Группа II ЛАМ (n=18)	n=17 (94%)	M	M	
	n=1 (6%)	I	I	после 6 мес. леч.
		I V	M/I I/V	после 12 мес. леч. после 18 мес. леч.
Группа III ТБВ (n=10)	n=8 (80%)	M	M	
	n=1 (10%)	I	I/M	после 58 мес. леч.
		I V	I V	после 65 мес. леч.
Группа IV ЭНТ (n=27)	n=24 (89%)	M	M	
	n=3 (11%)	V	V	
Группа V без ПВТ n=13	n=13 (100%)	M	M	

В плазме крови от пациентов второй группы у одного пациента были выявлены последовательности, кодирующие замену в 204 положении обратной транскриптазы. После 6 месяцев лечения ламивудином была выявлена замена метионина на изолейцин. Причем, методом секвенирования по Сенжеру была определена только замена метионина на изолейцин через 12 месяцев лечения и замена на валин после 18 месяцев терапии, в то время как методом ПЦР-РВ после 12 и 18 месяцев терапии были выявлены смесь последовательностей ДНК ВГВ, кодирующих метионин/изолейцин и метионин/валин, соответственно. После неэффективной терапии ламивудином пациент получал в течение 14 месяцев

телбивудин, что привело к выявлению вирусов только с заменой rtM204V обоими методами. У одного пациента после 58 месяцев лечения ТБВ была обнаружен вирус с заменой rtM204I, причем методом ПЦР кроме «мутантного» был обнаружен и «дикий» тип вируса. Еще через 7 месяцев у данного пациента обоими методами обнаруживался только «мутантный» тип вируса (rtM204I). У трех пациентов четвертой группы были выявлены вирусы, содержащие мутации устойчивости к энтекавиру (rtM204V), что также было подтверждено методом ПЦР.

Разработанный метод выявления мутаций устойчивости rtM204I/V к АН обладает высокой специфичностью и чувствительностью 1000 копий/мл и позволяет определять различные варианты популяции ВГВ. Было показано, что данный метод выявляет «мутантные» варианты вируса, составляющие 30% и более от общей популяции ВГВ.

Общая распространенность мутаций в YMDD-мотиве полимеразы у пациентов, получавших ламивудин, составила 6%, энтекавир - 3%, телбивудин – 20%. У двух из 83 пациентов были выявлены последовательности YMDD/YIDD и у одного пациента –YIDD/YVDD.

Предложенный метод не позволяет дифференцировать последовательности для прямого определения rtM204I. В дальнейшем данный метод может быть модифицирован для обнаружения YIDD мотива путем добавления праймеров, выявляющих замену rtM204I, в смесь-1. Преимущества данного метода заключается в простоте анализа. Выявление последовательностей ВГВ с заменой rtM204V может быть рассчитано по разнице между Ct значения образца (Pr1) и контроля (PrC) без дополнительных количественных стандартов. Неспецифический отжиг праймеров, как рассчитано выше, исключается при значении $\Delta Ct < 5$.

К недостаткам данной методики относится невозможность определять другие замены в полимеразе, которые могут оказать влияние на эффективность противовирусного лечения АН. Однако, в нашем исследовании не были показаны

случаи возникновения резистентности к АН под действием мутаций в других сайтах, не относящихся к заменам в YMDD-мотиве (замены rtM204I/V).

При сравнении разработанного метода с широко используемым секвенированием по Сенжеру, данный метод более быстрый, экономичный и позволяет выявлять минорные варианты популяции ВГВ.

Для подтверждения выявленных минорных вариантов ПЦР-РВ, для одного пациента с устойчивостью к ламивудину, телбивудину и энтекавиру было выполнено высокопроизводительное глубокое секвенирование нового поколения (NGS) ДНК ВГВ (табл. 3.9). Во всех образцах плазмы крови данного пациента минорные варианты ВГВ выявленные методом ПЦР-РВ, были найдены и методом NGS. Методом секвенирования по Сенжеру были определены только преобладающие варианты вируса во всех образцах от пациента.

Таблица 3.9 - Сравнение результатов NGS, ПЦР в реальном времени и секвенирования по Сенжеру

Терапия	Аминокислотный остаток в 204 положении обратной транскриптазы		
	Секвенирование по Сенжеру	ПЦР в реальном времени	NGS (% от общей популяции вируса)
6 месяцев ЛАМ	I	I	I (90,4%)
12 месяцев ЛАМ	I	M / I	M (26,1%) / I (73,9%)
18 месяцев ЛАМ	V	I / V	I (63,3%) / V (24,1%) / M (12,6%)
14 месяцев ТБВ	V	V	Н/Д
3 месяцев ЭНТ	V	V	V (99,8%)

3.2.3 NGS секвенирование геномов ВГВ

В настоящее время наряду с развитием быстрых методов выявления мутаций устойчивости, таких как ПЦР-РВ и технологии микрочипов, все большее значение для молекулярно-генетической характеристики возбудителей инфекционных заболеваний используются методы глубокого секвенирования нового поколения (NGS – next generation sequencing). До появления технологии NGS секвенирования для определения нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот широко применялся метод Сенжера, который и сегодня

считается «золотым стандартом», поскольку позволяет определять нуклеотидную последовательность ДНК с высокой точностью [116, 149, 178]. Технология NGS секвенирования на приборах MiSeq (Illumina) способно параллельно определять нуклеотидные последовательности множества нитей ДНК с глубиной прочтения до 34 миллионов раз, позволяющей определять квазивиды [116, 178]. Процесс секвенирования в зависимости от объема исследований занимает до 39 часов, в отличие от метода Сенжера, при котором аналогичные полногеномные исследования выполнялись бы в течение нескольких недель [68]. Применение платформ NGS для диагностики инфекционных заболеваний и мониторинга мутаций устойчивости вирусов и бактерий может помочь в решении как фундаментальных, так и практических задач вирусологии и эпидемиологии [4, 5, 57, 69, 82].

Для изучения популяции вируса гепатита В, циркулирующего на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области, на приборе MiSeq (Illumina) было выполнено NGS секвенирование 12 полных геномов ВГВ, полученных от 6 пациентов с ХГВ.

Результаты сборки, картирования и поиска вариантов представлены в таблице 3.10.

Таблица 3.10 - Результаты сборки, картирования и поиска вариантов

№ образца	Число контигов	N50, п.н.	Максимальная длина контига, п.н.	Суммарная длина контигов, п.н.	Число чтений	Чтения, для которых найдены выравнивания, n (%)	Покрываемость чтениями, для которых найдены выравнивания	Число найденных вариантов
1	79	1310	3256	65318	58069	813 (1,4)	52	97
2	253	422	3238	87346	615884	1170 (0,19)	79	91
3	486	280	627	123744	916119	757813 (82,72)	9278	78
4	586	286	3212	185183	170635	119222 (69,87)	6711	83

Продолжение таблицы 3.10.

№ образца	Число контигов	N50, п.н.	Максимальная длина контига, п.н.	Суммарная длина контигов, п.н.	Число чтений	Чтения, для которых найдены выравнивания, n (%)	Покрытие чтениями, для которых найдены выравнивания	Число, найденных вариантов
5	381	360	1512	120805	256051	167764 (65,52)	6018	81
6	3078	186	1606	499837	517120	445860 (86,22)	9396	85
7	103	411	2882	34601	76449	42299 (55,33)	2467	110
8	167	737	3563	68954	299374	108822 (36,35)	6198	72
9	1046	267	1997	307826	267487	193446 (72,32)	8424	79
10	564	257	2002	143790	179828	146415 (81,42)	7818	66
11	90	334	1439	26959	152819	126304 (82,65)	7332	74
12	415	255	1266	107873	352888	287250 (81,4)	8597	94

В семи образцах от 4 пациентов с ХГВ мутаций устойчивости к АН обнаружено не было ни методом секвенирования по-Сенжеру, ни NGS-секвенированием. У одного пациента были определены первичные и вторичные мутации устойчивости к тенофовиру (rtA194T, rtV214V, rtQ215P), несмотря на то, что данный пациент не получал лечение АН. Существуют данные, что в редких

случаях данные мутации могут быть найдены у пациентов с ХГВ до начала терапии АН [46].

Как было описано в п. 3.2.1.1, у одного пациента после пересадки печени и лечения в течение 6 месяцев ламивудином была выявлена замена в YMDD-мотиве полимеразы (rtM204I), приводящая к резистентности вируса и через 18 месяцев терапии ламивудином у этого пациента были обнаружены еще ряд замен в полимеразном белке rtM204V, rtL80I, rtL180M, rtA181V, усиливающих невосприимчивость вируса к терапии [30, 96].

После возникновения устойчивости к ламивудину, лечение в течение 14 месяцев телбивудином лишь «усилило» резистентность, что было показано изменениями в последовательности полимеразы (замены rtM204V, rtV173L, rtL180M, rtA181C). Терапия энтекавиром также не была эффективна ввиду сохранения популяции мутантных вирусов (сохранялись замены: rtM204V, rtV173L, rtL180M, rtA181C) и лишь после добавления тенофовира вирусная нагрузка за 12 месяцев снизилась до уровня 300 копий/мл.

Анализ популяции ВГВ у данного пациента методом NGS-секвенирования показал, что после 6 месяцев лечения ламивудином в 90,4% популяции ВГВ регистрировалась мутация, приводящая к замене rtM204I (табл. 3.11). Через год терапии ламивудином замена rtM204I определялась обоими методами, кроме того методом NGS были определены вирусы с заменами rtL80I и rtL180M (в 58,5% и в 29,7% популяции ВГВ, соответственно), усиливающие устойчивость вируса к лекарственному препарату. Эти же мутации были определены обоими методами после 18 месяцев лечения ламивудином, причем методом Сенжера были определены замена метионина на валин, в то время как методом NGS-секвенирования выявлены замены и на изолейцин (63,3%), и на валин (24,1%). Также усиление устойчивости к ламивудину было представлено заменой rtA181V (27,98%). После неудачного лечения ламивудин был заменен телбивудином, однако из-за кросс-резистентности эта терапия также не была эффективна. Замена телбивудина энтекавиром не привела к снижению вирусной нагрузки ввиду сохранения популяции мутантных вирусов (сохранялись замены: rtM204V,

rtV173L, rtL180M, rtA181C) Интересно отметить, что кроме замены аланина на цистеин в 181 положении обратной транскриптазы методом NGS была выявлена замена аланина на глицин (в 2,6% популяции вируса). Также была определена мутация, приводящая к замене rtV173L (100% популяции ВГВ). Устойчивость к энтекавиру также была отмечена появлением вирусов с заменой rtM309K (100%). Данная замена была выявлена только методом NGS, поскольку праймеры для секвенирования методом Сенжера (в данном исследовании) расположены выше по последовательности и не захватывают эту область полимеразы. Хотя связь замены rtM309K с возможной устойчивостью к энтекавиру на сегодняшний день дискуссионна, в нашем исследовании данная замена была определена у одного пациента после лечения энтекавиром [30].

Таблица 3.11 - Замены в полимеразе ВГВ у пациента с ХГВ после терапии АН, определенных методом секвенирования по-Сенжеру и методом NGS

Терапия	Секвенирование по-Сенжеру	NGS (% замен от общей популяции вируса)
6 месяцев ЛАМ	rtM204I	rtM204I (90,4%)
12 месяцев ЛАМ	rtM204I	rtL80I (58,46%) rtL180M (29,73%) rtM204I (73,91%)
18 месяцев ЛАМ	rtL80I rtL180M rtA181V rtM204V	rtL80I (69,89%) rtL180M (59,17%) rtA181V (27,98%) rtM204V (24,1%) rtM204I (63,32%)
14 месяцев ТБВ	rtM204V rtV173L rtL180M rtA181C	Н/Д
3 месяцев ЭНТ	rtV173L rtL180M rtA181C rtM204V	rtV173L (100%) rtL180M (99,79%) A181C (97,35%) A181G (2,65%) rtM204V (99,75%) rtM309K (100%)

Репликация ВГВ через стадию обратной транскрипции приводит к появлению различных генетических вариантов вируса, известных, как квазивиды. В процессе эволюции под действием селективного давления, индуцированного

иммунным ответом организма и/или противовирусной терапией, квазивиды могут преобладать над «диким» типом [1]. Последние исследования показали, что мутации устойчивости к АН в редких случаях могут встречаться у пациентов с ХГВ еще до начала противовирусной терапии [56]. Наличие квазивидов в минорной популяции ВГВ тесно связано с ответом на лечение АН. Выявление мутаций устойчивости, когда доля мутаций составляет менее 20% от общей популяции ВГВ, методом секвенирования по Сенжеру невозможно из-за низкой чувствительности данного анализа. Применение технологии NGS могут преодолеть эти ограничения и определять данные варианты в минорной популяции ВГВ.

3.2.4 Мутации S гена

Благодаря наличию перекрывающихся рамок считывания в геноме ВГВ мутации в гене полимеразы могут приводить и к изменению аминокислотной последовательности и длины поверхностного белка [97, 168]. Так, в наших исследованиях обнаруженные замены в 173, 181 и 204 положениях обратной транскриптазы приводили к замене аминокислотного остатка в 164, 172/173 и 195/196 положениях S-белка, соответственно. Причем замена rtM204I приводила к замене в 196 положении белка S, а замена rtM204V – в 195 положении во всех случаях. У трех пациентов была обнаружена замена rtA181T, которая привела к образованию стоп-кодона в перекрывающейся ОРС S гена и терминации синтеза полноразмерного поверхностного белка (sW172*).

Мутации в S гене, приводящей к замене sG145R, ответственной за «вакцинное бегство», обнаружено не было, однако у 13 пациентов были выявлены missense-мутации в гене полимеразы, которые привели к замене rtR153W. У одного пациента была найдена замена sD144E, при этом характерного снижения концентрации HBsAg зафиксировано не было. Обнаруженные замены в обратной транскриптазе rtT128A/I (n=2) не привели к соответствующим изменениям S белка (sP120T), и, следовательно, снижение секреции HBsAg у этих пациентов зафиксировано не было.

У одного пациента, не получавшего терапию АН, была найдена замена rtS78T, которая привела к образованию стоп-кодона в ОРС S гена и появлению укороченной формы HBsAg (sC69*). Появление стоп-кодона в 69 положении поверхностного белка может иметь важные клинические последствия. Наличие цистеина в 69 положении является обязательным для всех гепаднавирусов и имеет большое значение для секреции HBsAg. Укороченная форма HBsAg может накапливаться в гепатоцитах и способна вызывать трансактивацию клеточных промоторов, в том числе тех, которые кодируют онкогенные белки [56].

Анализ влияния мутаций устойчивости на изменение структуры поверхностного белка имеет большое значение для практического здравоохранения. Изменение структуры HBsAg, снижение или прекращение его секреции из гепатоцита не только затрудняет этиологическую верификацию хронического гепатита, но и способствует развитию окислительного стресса, воспалению, увеличению числа кзкДНК и раковой трансформации гепатоцитов на поздних стадиях ХГВ [14, 56, 175]. Хотя в нашем исследовании мутации в S гене, приводящей к заменам sG145R и sP120T, обнаружено не было, а замена sD144E у одного пациента не привела к снижению уровня HBsAg, наличие замен в обратной транскриптазе (rtR153W и rtT128A/I) может способствовать появлению вариантов ВГВ с измененными поверхностными белками [56]. У четырех пациентов мутации в гене обратной транскриптазы, образовавшиеся под действием противовирусной терапии, привели к образованию стоп-кодона в S гене и преждевременной терминации синтеза полноразмерного поверхностного белка (rtA181T/sW172* и rtS78T/sC69*). Несмотря на то, что в настоящее время доля подобных случаев незначительна, необходим постоянный мониторинг мутаций, возникающих под действием терапии и одновременно приводящих к изменению антигенных свойств вируса гепатита В.

3.2.5 Мутации *preCore/Core* и X генов

Мутации в основном Core промоторе (BCP) были выявлены у шести пациентов A1762T, G1764A, и у двух – T1753V (табл.3.12). Из-за перекрывающихся ОРС данные мутации привели к двойным заменам

K130M+V131I и к заменам на треонин в 127 положении в X белке у шести и двух пациентов, соответственно. Мутации в области энхансера II (C1653T) были определены у двух пациентов и у трех пациентов выявлена мутация G1896A в preCore области. У пациентов с мутациями в BCP (1762+1764) и preCore (1896) было зафиксировано снижение концентрации HBeAg, у пациентов с заменой G1896A - увеличение степени фиброза. Следует отметить, что у одного пациента с мутациями A1762T+G1764A+G1896A наблюдался цирроз печени, что и стало причиной летального исхода заболевания. Мутации в 1814 и 1815 положениях гена Core у одного пациента не привели к прекращению синтеза HBeAg.

Таблица 3.12 - Мутации в preCore/Core области и замены в белке X вируса гепатита В у пациентов с ХГВ

Замены	Пациенты, чел.	Клинические проявления мутаций
A1814T+T1815C	1	HBeAg(+)
A1762T+G1764A (xK130M+xV131I)	4	Сероконверсия HBeAg, увеличение степени фиброза
A1762T+G1764A+G1896A+сдвиг ОРС (xK130M+xV131I)	1	Цирроз, смерть
G1896A	1	Цирроз
T1753V (x127T)	1	нет
C1653T+ G1896A+T1753 (x127T)	1	Увеличение степени фиброза, цирроз
C1653T+ A1762T+G1764A (xK130M+xV131I)	1	Сероконверсия HBeAg, увеличение степени фиброза

Анализ мутаций в preCore/Core области имеет большое клиническое значение для HBeAg-позитивных пациентов. Поскольку HBeAg-сероконверсия является терапевтической конечной точкой, появление мутантных вариантов ВГВ, может привести к ложным результатам серологических тестов. Из-за перекрытия ОРС мутации в preCore/Core области приводят к возникновению изменений в структуре X гена [56]. Таким образом, мутации ВГВ в preCore/Core

области способствуют не только снижению синтеза HBeAg и ускользанию вируса от иммунных защитных механизмов хозяина, но и могут привести к развитию ЦП и ГЦК [174].

Мутация G1896A, обнаруженная у двух пациентов в данном исследовании, приводит к образованию стоп кодона в 28 положении последовательности HBeAg, в результате чего нарушается транспорт preCore к ЭР и синтез HBeAg [36, 56]. Несмотря на то, что HBeAg не используется в сборке вируса, HBeAg-сероконверсия играет важнейшую роль во взаимодействии вируса и иммунной системы хозяина. Потеря HBeAg и появление AbHBe способствует ускользанию вируса от иммунных киллеров и продолжению вирусной репликации на поздних стадиях ВГВ-инфекции.

Показано, что мутации A1762T и G1764A в ВСР регионе Core гена снижают уровень HBeAg приблизительно на 50 % [56]. В нашем исследовании у пациентов с данными мутациями также было зафиксировано снижение концентрации HBeAg до недектируемого стандартными серологическими методами уровня.

Существуют данные, что двойные замены в иницирующем кодоне (мутации в 1814 или 1815 положении Core гена) также приводят к HBeAg-сероконверсии [28]. Однако, в нашем исследовании у одного пациента с мутациями A1814T и T1815C снижение синтеза HBeAg и появление антител к этому белку зафиксировано не было.

Недавние исследования показали, что мутации в ВСР регионе и мутация G1896A, приводящая к образованию стоп-кодона в preCore, часто появляются вместе и могут привести к тяжелым заболеваниям печени, включая молниеносный гепатит и ГЦК [56, 94, 95, 174]. В нашем исследовании у двух пациентов с циррозом были обнаружены комбинации данных мутаций (A1762T+G1764A+G1896A, n=1 и C1653T+ G1896A+T1753, n=1).

Связь мутаций в preCore/Core гене с повышенным риском развития ГЦК, возможно, связано с тем, что данные мутации приводят к возникновению изменений в структуре X гена из-за перекрытия ORC. Замены в X гене играют решающую роль в гепатоканцерогенезе и были определены у пациентов с ГЦК.

Как было показано в данном исследовании, мутации в 1753, 1762 и 1764 положениях Core гена приводили к образованию замен в 127, 130, 131 положениях белка X. Существуют данные, что для ВГВ с заменами в белке X характерно увеличение активности NFκB, что в свою очередь может предотвратить апоптоз и способствовать выживанию инфицированных и мутировавших клеток [187]. Хотя в нашем исследовании не доказано воздействие замен в белке X на ускользание вируса от иммунных механизмов хозяина, у шести пациентов с заменами K130M и V131I в белке X было зафиксировано увеличение степени фиброза (n=5) или развитие цирроза (n=1).

Заключение

Настоящее исследование посвящено изучению генетических вариантов вируса гепатита В, циркулирующих на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Для решения поставленных задач методом ПЦР было определено распределение генотипов ВГВ в Санкт-Петербурге и Ленинградской области в период 2008-2014 гг. Полученные результаты были сравнены с исследованиями предыдущих годов наблюдения с 2002-2006 гг. и было отмечено изменение частоты встречаемости генотипов ВГВ (А и D), циркулирующих в данном регионе. Мониторинг циркулирующих генотипов ВГВ имеет большое значение для характеристики адекватности применяемых в данном регионе вакцин [104, 128, 164]. Было показано, что все исследуемые образцы геномов ВГВ принадлежали к генотипу D2 (субтипу ауw3), что отражает адекватность применяющихся вакцин. Однако увеличение циркуляции ВГВ генотипа А, определяющего субтипы adw, в Санкт-Петербурге за последние годы требует дальнейшего мониторинга для исключения возможного снижения эффективности вакцинации [52, 104, 128, 164].

Для ВГВ генотипа D, преобладающего в Северо-Западном регионе, характерно развитие мутаций в различных участках генома под действием аналогов нуклеозидов и иммунного «прессинга» [77, 85, 93, 153], поэтому у 122 пациентов с ХГВ был выполнен анализ генетических вариантов ВГВ. Полученные результаты показали, что выявление аминокислотных замен, которые приводят к появлению устойчивости к противовирусным препаратам, имеет важное практическое значение для прогнозирования эффективности терапии [41, 96, 97, 173]. Для первичного скрининга пациентов с ХГВ, не отвечающих на лечение АН, был разработан метод обнаружения мутаций устойчивости ВГВ rtM204I/V при помощи ПЦР в реальном времени. Данный метод показал высокую специфичность и чувствительность. При сравнении разработанного метода с широко используемым секвенированием по Сенжеру, данный метод более быстрый, экономичный и способен выявлять квазивиды в популяции ВГВ.

Поскольку выявление мутаций устойчивости, когда доля мутаций составляет менее 20% от общей популяции ВГВ имеет большое практическое значение, а методом секвенирования по Сенжеру данный анализ невозможен из-за низкой чувствительности метода, применение технологии глубокого секвенирования нового поколения (NGS – next generation sequencing) могут преодолеть эти ограничения и определять данные варианты в минорной популяции ВГВ [116, 149, 178].

Из-за наличия перекрывающихся рамок считывания в геноме ВГВ мутации в гене полимеразы могут приводить и к изменению аминокислотной последовательности и длины поверхностного белка [97, 168]. В данном исследовании, у четырех пациентов под действием противовирусной терапии мутации в гене обратной транскриптазы привели к образованию стоп-кодона в S гене и преждевременной терминации синтеза полноразмерного поверхностного белка (rtA181T/sW172* и rtS78T/sC69*). Не смотря на то, что в настоящее время доля подобных случаев незначительна, необходим постоянный мониторинг мутаций, возникающих под действием терапии и одновременно приводящих к изменению антигенных свойств вируса гепатита В. Изменение структуры HBsAg, снижение или прекращение его секреции из гепатоцита не только затрудняет этиологическую верификацию хронического гепатита, но и способствует развитию окислительного стресса, воспалению, увеличению числа кзкДНК и раковой трансформации гепатоцитов на поздних стадиях ХГВ [56, 138].

В гепатоканцерогенезе также решающую роль играют мутации в X гене [36, 153, 166]. Обнаруженные в данном исследовании мутации, приводящие к заменам в 127, 130 и 131 кодонах белка X, могут быть следствием мутаций в preCore/Core области из-за перекрытия ОРС. Анализ мутаций в preCore/Core области имеет большое клиническое значение для HBeAg-позитивных пациентов. Поскольку HBeAg-сероконверсия является терапевтической конечной точкой, появление мутантных вариантов ВГВ, может привести к ложным результатам серологических тестов [41, 47, 85, 93, 193]. Снижение секреции HBeAg и увеличение степени фиброза у восьми пациентов в данном исследовании,

возможно, было следствием выявленных мутаций в Core гене (G1896A, A1762T, G1764A). Таким образом, мутации ВГВ в preCore/Core области способствуют не только снижению синтеза HBeAg и ускользанию вируса от иммунных защитных механизмов хозяина, но и могут привести к развитию ЦП и ГЦК [28, 36, 93].

Определение генотипов ВГВ и выявление аминокислотных замен, которые приводят к снижению концентрации серологических маркеров и появлению устойчивости к противовирусным препаратам, имеет важное практическое значение для прогнозирования эффективности терапии и скорости прогрессирования патологических процессов в печени. Применение технологии NGS расширяет возможности диагностики ХГВ, помогает в выборе адекватной терапии, а также позволяет проводить углубленный анализ структуры генома ВГВ, расширяя возможности решения практических и фундаментальных задач вирусологии и эпидемиологии.

ВЫВОДЫ

1. В период 2008-2014 гг. в Санкт-Петербурге и Ленинградской области у пациентов с хроническим гепатитом В отмечено преобладание ВГВ генотипов D (80,1%) и А (16,5%). По сравнению с периодом 2002-2006 гг. выявлено увеличение доли генотипа А ВГВ (с 4% до 16,5%).
2. Длительное применение телбивудина после возникновения устойчивости к ламивудину приводит к кросс-резистентности, и как следствие, к «усилению» лекарственной устойчивости ВГВ. Лечение энтекавиром показало высокую эффективность, однако в редких случаях длительное лечение этим препаратом также приводит к появлению мутаций устойчивости.
3. Разработанный оригинальный метод определения мутаций в YMDD-мотиве полимеразы может быть использован для первичного скрининга образцов от пациентов с ХГВ, не отвечающих на противовирусную терапию аналогами нуклеозидов.
4. Применение метода секвенирования нового поколения (NGS) позволяет выявлять мутации устойчивости к аналогам нуклеозидов в минорных вариантах (менее 20%) в составе популяции ВГВ, выделенной от одного носителя.
5. Наличие мутаций в preCore/Core области (G1896A, A1762T, G1764A) и nonsense мутаций в preS/S области, приводящих к образованию стоп-кодонов в гене, кодирующем поверхностный белок (sW172*, sC69*), обеспечивает снижение синтеза вирусных белков (HBeAg и HBsAg), что затрудняет этиологическую верификацию хронического гепатита и является неблагоприятным прогностическим фактором риска развития цирроза и ГЦК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВГВ – вирус гепатита В

ЦП – цирроз печени

ГЦК - гепатоцеллюлярная карцинома

ОГВ – острый вирусный гепатит В

ХГВ – хронический вирусный гепатит В

АН – аналоги нуклеозидов и нуклеотидов

ОРС - открытая рамка считывания

ПЦР – полимеразная цепная реакция

NGS – next generation sequencing – секвенирование нового поколения

ПЦР-РВ - ПЦР в реальном времени

HBsAg – поверхностный антиген вируса гепатита В

LHBsAg, L или preS1 – большой поверхностный гликопротеин вируса гепатита В

MHBsAg, M или preS2 – средний поверхностный гликопротеин вируса гепатита В

SHBsAg, HBsAg или S – малый поверхностный гликопротеин вируса гепатита В

HBcAg – ядерный антиген или коровый белок вируса гепатита В

P – полимеразы вируса гепатита В

HBeAg – e-антиген вируса гепатита В

ЭР – эндоплазматический ретикулум

RT - reverse transcriptase – обратная транскриптаза вируса гепатита В

HBx – белок X вируса гепатита В

NFκB - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells - ядерный фактор «каппа-би»

AP1, AP2 - activator protein 1, 2 - активирующий протеин-1, 2

кзкДНК – ковалентно-замкнутая кольцевая ДНК

пгРНК - прегеномная РНК

ε - энкапсидационный сигнал

AbHBs – антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В

AbHBe – антитела к e-антигену вируса гепатита В

AbHBcorIgM, AbHBcorIgG – антитела IgM и IgG к ядерному антигену вируса гепатита В

АЛТ – аланинаминотрансфераза

МЕ – международные единицы для оценки вирусной нагрузки гепатита В

ВГВ-А, ВГВ-В, ВГВ-С, ВГВ-D – вирус гепатита В генотипа А, В, С, D

MHR - major hydrophilic region - большой гидрофильный регион

ИФН – интерферон

BCP – Basal Core Promoter – основной Core промотор

ЛАМ - ламивудин

ТБВ – телбивудин

АДФ – адефовир

ЭНТ - энтекавир

ТФВ - тенофовир

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

п.н. – пары нуклеотидов

а.к. – аминокислота, аминокислотный остаток

ПЭГ-ИФН - пегилированный интерферон

ПВО – первичный вирусологический ответ

СВО – стойкий вирусологический ответ

ПВТ – противовирусная терапия

ИФА - иммуноферментного анализа

ИГА – индекс гистологической активности

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдурахманов Д.Т. Резистентность вируса гепатита В к противовирусной терапии: диагностика, профилактика и лечение / Д. Т. Абдурахманов // Клиническая гепатология – 2009. – Т.1 – С.25–30.
2. Громова Н.И. Применение аналогов нуклеотидов для лечения больных с хроническим гепатитом В / Н. И. Громова // Доказательная Гастроэнтерология – 2013. – Т. 2, № 1(2) – С.26–30.
3. Громова Н.И. Естественное течение хронической HBV-инфекции / Н. И. Громова, И. В. Гордейчук, Ю. П. Зубков, Т. В. Кожанова, К. К. Кюрегян, Л. Ю. Ильченко, М. И. Михайлов // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии – 2012. – Т. 1, № 3 – С.10–18.
4. Елпаева Е.А. Генотипическая характеристика вируса гепатита В у хронически инфицированных больных / Е. А. Елпаева, Е. А. Порецкова, А. Ю. Ковеленов, И. С. Аликян, Р. Б. Гальбрайт, М. П. Грудинин, Е. В. Эсауленко // Дальневосточный Журнал Инфекционной Патологии – 2009. – № 15 – С. 56–59.
5. Киселев О.И. Пандемический грипп в России: диагностика и молекулярно-биологические характеристики вируса / О. И. Киселев, А. Б. Комиссаров, М. . Стукова, Ж. . Бузицкая, М. М. Писарева, Е. А. Елпаева, Д. М. Даниленко, Н. И. Коновалова, Т. М. Гудкова, Григорьева В.А, Т. С. Смирнова, А. . Слита, Е. А. Романовская-Романько, Л. М. Цыбалова, А. А. Соминина, М. Ю. Еропкин, М. П. Грудинин // Вопросы вирусологии. М.-Медицина – 2011. – Т. 1, № 56 – С.17–21.
6. Кожанова Т.В. Циркуляция вариантов вируса гепатита В, несущих мутации в гене полимеразы, среди ВГВ-инфицированных и ВГВ/ВИЧ-коинфицированных пациентов / Т. В. Кожанова, Л. Ю. Ильченко, О. В. Исаева, М. Н. Алексеева, А. А. Сарыглар, Н. И. Миронова, Н. И. Громова, М. Н. Цыкина, Ю. П. Зубков, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов // Современные технологии в медицине – 2013. – Т. 5, № 2 – С. 60–64.
7. Чуланов В.П. Проблемы лекарственной резистентности при противовирусной терапии хронического гепатита В / В. П. Чуланов // Клиническая

гастроэнтерология и гепатология – 2011. – Т. 3 – С.167–172.

8. Чуланов В.П. Полимеразная цепная реакция в диагностике вирусных гепатитов / В. П. Чуланов, Г. А. Шипулин, О. Ю. Шипулина, Е. В. Волчкова, С. Г. Пак, В. И. Покровский // Инфекционные болезни – 2003. – Т. 1 – С. 43–48.

9. Чуланов В.П. Вирусные гепатиты сочетанной этиологии / В. П. Чуланов, О. Ю. Шипулина, Г. А. Шипулин, Е. В. Волчкова, С. Г. Пак // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии – 2003. – Т. 4 – С.81–86.

10. Эсауленко Е.В. Опыт применения препарата энтекавир в терапии хронического гепатита В / Е. В. Эсауленко, И. С. Аликян, О. Ю. Емельянова, Т. А. Сташишкис, А. Ю. Ковеленов // ЖУРНАЛ ИНФЕКТОЛОГИИ – 2009. – Т. 1, № 4 – С.72–75.

11. Эсауленко Е.В. Вирусная нагрузка при хроническом гепатите в: корреляции с лабораторно-морфологическими показателями / Е. В. Эсауленко, О. Е. Никитина, Е. А. Порецкова, М. М. Писарева // ЖУРНАЛ ИНФЕКТОЛОГИИ – 2012. – Т. 4, № 2 – С.67–72.

12. Эсауленко Е.В. Эффективность противовирусной терапии аналогами нуклеозидов при хроническом гепатите В / Е. В. Эсауленко, О. Е. Никитина, Е. А. Порецкова, Б. В. Стуков, И. С. Аликян, А. Ю. Ковеленов // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии – 2011. – № 5 – С.21–25.

13. Abraham P. Evaluation of a new recombinant DNA hepatitis B vaccine (Shanvac-B) / P. Abraham, F. P. Mistry, M. R. Vapat, G. Sharma, G. R. Reddy, K. S. Prasad, V. Ramanna // Vaccine – 1999. – V. 17, № 9-10 – P.1125–1129.

14. Ahn S.H. The impact of the hepatitis B virus polymerase rtA181T mutation on replication and drug resistance is potentially affected by overlapping changes in surface gene / S. H. Ahn, Y. K. Park, E.-S. Park, J. H. Kim, D. H. Kim, K.-H. Lim, M. S. Jang, W. H. Choe, S. Y. Ko, I.-K. Sung, S. Y. Kwon, K.-H. Kim // J. Virol. – 2014. – V. 88 – P.1–39.

15. Arauz-Ruiz P. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America / P. Arauz-Ruiz, H. Norder, B. H. Robertson, L. O. Magnius // J. Gen. Virol. – 2002. – V. 83, № Pt 8 – P.2059–2073.

16. Baldo V. Combined hexavalent diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B-inactivated poliovirus-Haemophilus influenzae type B vaccine; InfanrixTM hexa: twelve years of experience in Italy / V. Baldo, P. Bonanni, M. Castro, G. Gabutti, E. Franco, F. Marchetti, R. Prato, F. Vitale // *Hum. Vaccin. Immunother.* – 2014. – V. 10, № 1 – P.129–137.
17. Bankevich A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov, A. A. Gurevich, M. Dvorkin, A. S. Kulikov, V. M. Lesin, S. I. Nikolenko, S. Pham, A. D. Prjibelski, A. V Pyshkin, A. V Sirotkin, N. Vyahhi, G. Tesler, M. A. Alekseyev, P. A. Pevzner // *J. Comput. Biol.* – 2012. – V. 19, № 5 – P.455–477.
18. Bao H. Rapid high-throughput genotyping of HBV DNA using a modified hybridization-extension technique / H. Bao, W. Zhao, B. Ruan, Q. Wang, J. Zhao, X. Lei, W. Wang, Y. Liu, J. Sun, A. Xiang, Y. Guo, Z. Yan // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2013. – V. 15, № 41 – P.18179–18184.
19. Bar-On E.S. Combined DTP-HBV-HIB vaccine versus separately administered DTP-HBV and HIB vaccines for primary prevention of diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B and Haemophilus influenzae B (HIB) / E. S. Bar-On, E. Goldberg, S. Hellmann, L. Leibovici // *Cochrane database Syst. Rev.* – 2012. – V. 4 – 47p.
20. Basaras M. Comparison of INNO-LIPA and TRUGENE assays for genotyping and drug-resistance mutations in chronic hepatitis B virus infection / M. Basaras, E. Arrese, S. Blanco, L. S. Arroyo, P. Ruiz, R. Cisterna // *Intervirology* – 2013. – V. 56, № 3 – P.190–194.
21. Beck J. Hepatitis B virus replication / J. Beck, M. Nassal // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – V. 13, № 1 – P.48–64.
22. Blumberg B.S. A “New” Antigen in Leukemia Sera / B. S. Blumberg // *JAMA J. Am. Med. Assoc.* – 1965. – V. 191, № 7 – 541 p.
23. Bock C.T. Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell / C. T. Bock, P. Schranz, C. H. Schröder, H. Zentgraf // *Virus Genes* – 1994. – V. 8, № 3 – P.215–229.
24. Bouvier G.L. Serotypes of hepatitis B antigen (HBs Ag): the problem of “new”

- determinants, as exemplified by “t” / G. L. Bouvier, A. Williams // *Am. J. Med. Sci.* – 1975. – V. 270, № 1 – P.165–171.
25. Breiner K.M. Carboxypeptidase D (gp180), a Golgi-resident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses / K. M. Breiner, S. Urban, H. Schaller // *J. Virol.* – 1998. – V. 72, № 10 – P.8098–8104.
26. Bruss V. Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis B virion maturation / V. Bruss, R. Thomssen // *J. Virol.* – 1994. – V. 68, № 3 – P.1643–1650.
27. Burdino E. Quantification of hepatitis B surface antigen with the novel DiaSorin LIAISON XL Murex HBsAg Quant: correlation with the ARCHITECT quantitative assays / E. Burdino, T. Ruggiero, A. Proietti, M. G. Milia, A. Olivero, G. P. Caviglia, M. Marietti, M. Rizzetto, A. Smedile, V. Ghisetti // *J. Clin. Virol.* – 2014. – V. 60, № 4 – P.341–346.
28. Buti M. Hepatitis B virus genome variability and disease progression: the impact of pre-core mutants and HBV genotypes / M. Buti, F. Rodriguez-Frias, R. Jardi, R. Esteban // *J. Clin. Virol.* – 2005. – V. 34, № 1 – P.S79–S82.
29. Cao G.-W. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations / G.-W. Cao // *World J. Gastroenterol.* – 2009. – V. 15, № 46 – P.5761–5769.
30. Cento V. Anti-HBV treatment induces novel reverse transcriptase mutations with reflective effect on HBV S antigen / V. Cento, F. Van Hemert, M. Neumann-Fraune, C. Mirabelli, V. C. Di Maio, R. Salpini, A. Bertoli, V. Micheli, G. Gubertini, S. Romano, M. Visca, G. M. De Sanctis, B. Berkhout, N. Marino, F. Mazzotta, G. Cappiello, A. Spanò, C. Sarrecchia, F. Ceccherini-Silberstein, M. Andreoni, M. Angelico, J. Verheyen, C. F. Perno, V. Svicher // *J. Infect.* – 2013. – V. 67, № 4 – P.303–312.
31. Chan H.L.-Y. Viral genotype and hepatitis B virus DNA levels are correlated with histological liver damage in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection / H. L.-Y. Chan, S. W.-C. Tsang, C.-T. Liew, C.-H. Tse, M.-L. Wong, J. Y. Ching, N. W.-Y. Leung, J. S.-L. Tam, J. J.-Y. Sung // *Am. J. Gastroenterol.* – 2002. – V. 97, № 2 – P.406–412.

32. Chen C.-H. The role of hepatitis B surface antigen quantification in predicting HBsAg loss and HBV relapse after discontinuation of lamivudine treatment / C.-H. Chen, S.-N. Lu, C.-H. Hung, J.-H. Wang, T.-H. Hu, C.-S. Changchien, C.-M. Lee // *J. Hepatol.* – 2014. – V. 61, № 3 – P.515–522.
33. Chen E.-Q. Meta-analysis: Adefovir dipivoxil in combination with lamivudine in patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus / E.-Q. Chen, L.-C. Wang, J. Lei, L. Xu, H. Tang // *Virology*. – 2009. – V. 6, № 1 – P.1-9.
34. Chen G.-Y. Baseline HBsAg predicts response to pegylated interferon- α 2b in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients / G.-Y. Chen, M.-F. Zhu, D.-L. Zheng, Y.-T. Bao, J. Wang, X. Zhou, G.-Q. Lou // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – V. 20, № 25 – P.8195–8200.
35. Chen L.-Y. Clinical evaluation of oligonucleotide microarrays for the detection of HBV mutants associated with lamivudine resistance / L.-Y. Chen, J. Huang, X.-P. Zhang, P. Qiao, W. Zhang, N.-M. Yang, H.-J. Liu, Y.-Y. Geng, J.-M. Qiu, S.-Q. Wang // *Pharmacogenomics* – 2005. – V. 6, № 7 – P.721–730.
36. Chen W.N. Human hepatitis B virus mutants: significance of molecular changes. / W. N. Chen, C. J. Oon // *FEBS Lett.* – 1999. – V. 453, № 3 – P.237–242.
37. Chevaliez S. New virologic tools for management of chronic hepatitis B and C / S. Chevaliez, C. Rodriguez, J.-M. Pawlotsky // *Gastroenterology* – 2012. – V. 142, № 6 – P.1303–1313.
38. Clercq E. Antiviral treatment of chronic hepatitis B virus (HBV) infections / E. de Clercq, G. Férrir, S. Kaptein, J. Neyts // *Viruses* – 2010. – V. 2, № 6 – P.1279–1305.
39. Cullen B.R. Nuclear RNA export pathways. / B. R. Cullen // *Mol. Cell. Biol.* – 2000. – V. 20, № 12 – P.4181–4187.
40. Damerow H. Mutation pattern of lamivudine resistance in relation to hepatitis B genotypes: hepatitis B genotypes differ in their lamivudine resistance associated mutation pattern / H. Damerow, L. Yuen, J. Wiegand, C. Walker, C.-T. Bock, S. Locarnini, H. L. Tillmann // *J. Med. Virol.* – 2010. – V. 82, № 11 – P.1850–1858.
41. Dandri M. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection / M. Dandri, S. Locarnini // *Gut* – 2012. – V. 61, № 1 – P.i6–i17.

42. Dane D.S. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis / D. S. Dane, C. H. Cameron, M. Briggs // *Lancet* (London, England) – 1970. – V. 1, № 7649 – P.695–698.
43. Deterding K. Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe / K. Deterding, I. Constantinescu, F. D. Nedelcu, J. Gervain, V. Nemecek, O. Srtunecy, A. Vince, I. Grgurevic, K. P. Bielawski, M. Zalewska, T. Bock, A. Ambrozaitis, J. Stanczak, M. Takács, V. Chulanov, J. Slusarczyk, M. Drazd'áková, J. Wiegand, M. Cornberg, M. P. Manns, H. Wedemeyer // *J. Med. Virol.* – 2008. – V. 80, № 10 – P.1707–1711.
44. Devarbhavi H.C. Preliminary results: outcome of liver transplantation for hepatitis B virus varies by hepatitis B virus genotype / H. C. Devarbhavi, A. J. Cohen, R. Patel, R. H. Wiesner, R. C. Dickson, M. B. Ishitani // *Liver Transpl.* – 2002. – V. 8, № 6 – P.550–555.
45. Ding X. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China / X. Ding, M. Mizokami, G. Yao, B. Xu, E. Orito, R. Ueda, M. Nakanishi // *Intervirology* – 2001. – V. 44, № 1 – P.43–47.
46. Dupouey J. Hepatitis B virus variant with the a194t substitution within reverse transcriptase before and under adefovir and tenofovir therapy / J. Dupouey, R. Gerolami, C. Solas, P. Colson // *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* – 2012. – V. 36, № 2 – P.e26–e28.
47. European Association For The Study Of The Liver EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B / European Association For The Study Of The Liver // *J. Hepatol.* – 2009. – V. 50, № 2 – P.227–242.
48. Feng Z. Rapid detection of the hepatitis B virus YMDD mutant using AllGlo™ probes / Z. Feng, X. Yu, Z. Lu, D. Geng, L. Zhang, S. Chen // *Clin. Chim. Acta.* – 2011. – V. 412, № 11-12 – P.1018–1021.
49. Fernholz D. Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier / D. Fernholz, P. R. Galle, M. Stemler, M. Brunetto, F. Bonino, H. Will // *Virology* – 1993. – V. 194, № 1 – P.137–148.
50. Franco A. Transferrin receptor mediates uptake and presentation of hepatitis B

- envelope antigen by T lymphocytes / A. Franco, M. Paroli, U. Testa, R. Benvenuto, C. Peschle, F. Balsano, V. Barnaba // *J. Exp. Med.* – 1992. – V. 175, № 5 – P.1195–1205.
51. Franco E. Hepatitis B: Epidemiology and prevention in developing countries / E. Franco, B. Bagnato, M. G. Marino, C. Meleleo, L. Serino, L. Zaratti // *World J. Hepatol.* – 2012. – V. 4, № 3 – P.74–80.
52. Franco E. Hepatitis B: Epidemiology and prevention in developing countries / E. Franco, B. Bagnato, M. G. Marino, C. Meleleo, L. Serino, L. Zaratti // *World J. Hepatol.* – 2012. – V. 4, № 3 – P.74–80.
53. Fried M.W. HBeAg and hepatitis B virus DNA as outcome predictors during therapy with peginterferon alfa-2a for HBeAg-positive chronic hepatitis B / M. W. Fried, T. Piratvisuth, G. K. K. Lau, P. Marcellin, W.-C. Chow, G. Cooksley, K.-X. Luo, S. W. Paik, Y.-F. Liaw, P. Button, M. Popescu // *Hepatology* – 2008. – V. 47, № 2 – P.428–434.
54. Ganem D. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences / D. Ganem, A. M. Prince // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – V. 350, № 11 – P.1118–1129.
55. Ganem D. The molecular biology of the hepatitis B viruses / D. Ganem, H. E. Varmus // *Annu. Rev. Biochem.* – 1987. – V. 56 – P.651–693.
56. Gao S. Clinical relevance of hepatitis B virus variants / S. Gao // *World J. Hepatol.* – 2015. – V. 7, № 8 – P.1086-1096.
57. Gardy J.L. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak / J. L. Gardy, J. C. Johnston, S. J. Ho Sui, V. J. Cook, L. Shah, E. Brodtkin, S. Rempel, R. Moore, Y. Zhao, R. Holt, R. Varhol, I. Birol, M. Lem, M. K. Sharma, K. Elwood, S. J. M. Jones, F. S. L. Brinkman, R. C. Brunham, P. Tang // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – V. 364, № 8 – P.730–739.
58. Gauthier M. Microarray for hepatitis B virus genotyping and detection of 994 mutations along the genome / M. Gauthier, B. Bonnaud, M. Arzac, F. Lavocat, J. Maisetti, A. Kay, F. Simon, F. Zoulim, G. Vernet // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – V. 48, № 11 – P.4207–4215.
59. Ge G. Removing N-Terminal Sequences in Pre-S1 Domain Enhanced Antibody and B-Cell Responses by an HBV Large Surface Antigen DNA Vaccine / G. Ge, S. Wang,

- Y. Han, C. Zhang, S. Lu, Z. Huang // PLoS One – 2012. – V. 7, № 7 – P.1-9.
60. Gerken G. Hepatitis B defective virus with rearrangements in the preS gene during chronic HBV infection / G. Gerken, D. Kremsdorf, F. Capel, M. A. Petit, C. Dauge, M. P. Manns, K. H. Meyer zum Büschenfelde, C. Brechot // Virology – 1991. – V. 183, № 2 – P.555–565.
61. Gerlich W.H. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now / W. H. Gerlich // Virol. J. – 2013. – V. 10, № 1 – P.2-25.
62. Gerner P.R. The hepatitis B virus seroconversion to anti-HBe is frequently associated with HBV genotype changes and selection of preS2-defective particles in chronically infected children / P. R. Gerner, M. Friedt, R. Oettinger, E. Lausch, S. Wirth // Virology – 1998. – V. 245, № 1 – P.163–172.
63. Gish R. Selection of chronic hepatitis B therapy with high barrier to resistance. / R. Gish, J.-D. Jia, S. Locarnini, F. Zoulim // Lancet. Infect. Dis. – 2012. – V. 12, № 4 – P.341–353.
64. Gong S.S. Double-stranded linear duck hepatitis B virus (DHBV) stably integrates at a higher frequency than wild-type DHBV in LMH chicken hepatoma cells / S. S. Gong, A. D. Jensen, C. J. Chang, C. E. Rogler // J. Virol. – 1999. – V. 73, № 2 – P.1492–1502.
65. Günther S. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients / S. Günther, B. C. Li, S. Miska, D. H. Krüger, H. Meisel, H. Will // J. Virol. – 1995. – V. 69, № 9 – P.5437–5444.
66. Guo W. Hepatocyte-specific expression of the hepatitis B virus core promoter depends on both positive and negative regulation / W. Guo, M. Chen, T. S. Yen, J. H. Ou // Mol. Cell. Biol. – 1993. – V. 13, № 1 – P.443–448.
67. Guo Y. Development of magnetic capture hybridization and quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus covalently closed circular DNA / Y. Guo, S. Sheng, B. Nie, Z. Tu // Hepat. Mon. – 2015. – V. 15, № 1 – P.1-9.
68. Hamady M. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges / M. Hamady, R. Knight // Genome Res. – 2009. – V. 19, №

7 – P.1141–1152.

69. Hasan N.A. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains / N. A. Hasan, S. Y. Choi, M. Eppinger, P. W. Clark, A. Chen, M. Alam, B. J. Haley, E. Taviani, E. Hine, Q. Su, L. J. Tallon, J. B. Prosper, K. Furth, M. M. Hoq, H. Li, C. M. Fraser-Liggett, A. Cravioto, A. Huq, J. Ravel, T. A. Cebula, R. R. Colwell // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2012. – V. 109, № 29 – P.E2010–2017.

70. Hsieh T.-H. Hepatitis B virus genotype B has an earlier emergence of lamivudine resistance than genotype C / T.-H. Hsieh, T.-C. Tseng, C.-J. Liu, M.-Y. Lai, P.-J. Chen, H.-L. Hsieh, D.-S. Chen, J.-H. Kao // *Antivir. Ther.* – 2009. – V. 14, № 8 – P.1157–1163.

71. Hu J. Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase / J. Hu, C. Seeger // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1996. – V. 93, № 3 – P.1060–1064.

72. Hua W. Microarray-based genotyping and detection of drug-resistant HBV mutations from 620 Chinese patients with chronic HBV infection / W. Hua, G. Zhang, S. Guo, W. Li, L. Sun, G. Xiang // *Brazilian J. Infect. Dis.* – 2015. – V. 19, № 3 – P.291–295.

73. Huang Z.M. Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts / Z. M. Huang, T. S. Yen // *Mol. Cell. Biol.* – 1995. – V.15, № 7 – P.3864–3869.

74. Inoue J. Four-year study of lamivudine and adefovir combination therapy in lamivudine-resistant hepatitis B patients: influence of hepatitis B virus genotype and resistance mutation pattern / J. Inoue, Y. Ueno, Y. Wakui, H. Niitsuma, K. Fukushima, Y. Yamagiwa, M. Shiina, Y. Kondo, E. Kakazu, K. Tamai, N. Obara, T. Iwasaki, T. Shimosegawa // *J. Viral Hepat.* – 2011. – V. 18, № 3 – P.206–215.

75. Jeulin H. Clinical impact of hepatitis B and C virus envelope glycoproteins / H. Jeulin, A. Velay, J. Murray, E. Schvoerer // *World J. Gastroenterol.* – 2013. – V. 19, № 5 – P.654–664.

76. Junker-Niepmann M. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA / M. Junker-Niepmann, R. Bartenschlager, H. Schaller // *EMBO J.* – 1990. – V. 9, № 10 – P.3389–

3396.

77. Kao J.-H. Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus / J.-H. Kao // *Korean J. Intern. Med.* – 2011. – V. 26, № 3 – P.255-261.

78. Kim H.-S. Evaluation of methods for monitoring drug resistance in chronic hepatitis B patients during lamivudine therapy based on mass spectrometry and reverse hybridization / H.-S. Kim, K.-H. Han, S. H. Ahn, E.-O. Kim, H.-Y. Chang, M. S. Moon, H. J. Chung, W. Yoo, S.-O. Kim, S. P. Hong // *Antivir. Ther.* – 2005. – V. 10, № 3 – P.441–449.

79. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences / M. Kimura // *J. Mol. Evol.* – 1980. – V. 16, № 2 – P.111–120.

80. Ko S.-Y. Analysis of hepatitis B virus drug-resistant mutant haplotypes by ultra-deep pyrosequencing / S.-Y. Ko, H.-B. Oh, C.-W. Park, H. C. Lee, J.-E. Lee // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – V. 18, № 10 – P.E404–411.

81. Kobayashi M. Clinical characteristics of patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B, and C / M. Kobayashi, Y. Arase, K. Ikeda, A. Tsubota, Y. Suzuki, S. Saitoh, M. Kobayashi, F. Suzuki, N. Akuta, T. Someya, M. Matsuda, J. Sato, H. Kumada // *J. Gastroenterol.* – 2002. – V. 37, № 1 – P.35–39.

82. Köser C.U. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology / C. U. Köser, M. J. Ellington, E. J. P. Cartwright, S. H. Gillespie, N. M. Brown, M. Farrington, M. T. G. Holden, G. Dougan, S. D. Bentley, J. Parkhill, S. J. Peacock // *PLoS Pathog.* – 2012. – V. 8, № 8 – P.1-9.

83. Kramvis A. Structure and function of the encapsidation signal of hepadnaviridae / A. Kramvis, M. C. Kew // *J. Viral Hepat.* – 1998. – V. 5, № 6 – P.357–367.

84. Krastev Z. A. The “return” of hepatitis B / Z. A. Krastev // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – V. 12, № 44 – P.7081–7086.

85. Kuo A. Chronic hepatitis B infection / A. Kuo, R. Gish // *Clin. Liver Dis.* – 2012. – V. 16, № 2 – P.347–369.

86. Lanford R.E. Transcomplementation of nucleotide priming and reverse transcription between independently expressed TP and RT domains of the hepatitis B virus reverse

- transcriptase / R. E. Lanford, L. Notvall, H. Lee, B. Beames // *J. Virol.* – 1997. – V. 71, № 4 – P.2996–3004.
87. Langmead B. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 / B. Langmead, S. L. Salzberg // *Nat. Methods* – 2012. – V. 9, № 4 – P.357–359.
88. Larsson S.B. HBsAg quantification for identification of liver disease in chronic hepatitis B virus carriers / S. B. Larsson, A. Eilard, S. Malmström, C. Hannoun, A. P. Dhillon, G. Norkrans, M. Lindh // *Liver Int.* – 2014. – V. 34, № 7 – P.e238–245.
89. Li H. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools / H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin // *Bioinformatics* – 2009. – V. 25, № 16 – P.2078–2079.
90. Li X.-M. Effect of hepatitis B immunoglobulin on interruption of HBV intrauterine infection / X.-M. Li, M.-F. Shi, Y.-B. Yang, Z.-J. Shi, H.-Y. Hou, H.-M. Shen, B.-Q. Teng // *World J. Gastroenterol.* – 2004. – V. 10, № 21 – P.3215–3217.
91. Li Z.G. Quantification of the relative levels of wild-type and lamivudine-resistant mutant virus in serum of HBV-infected patients using microarray / Z. G. Li, L. Y. Chen, J. Huang, P. Qiao, J. M. Qiu, S. Q. Wang // *J. Viral Hepat.* – 2005. – V. 12, № 2 – P.168–175.
92. Lien J.M. Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis / J. M. Lien, C. E. Aldrich, W. S. Mason // *J. Virol.* – 1986. – V. 57, № 1 – P.229–236.
93. Lin C.-L. Hepatitis B Virus Genotypes and Variants / C.-L. Lin, J.-H. Kao // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2015. – V. 5, № 5 – P.a021436–a021436.
94. Lindh M. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers / M. Lindh, C. Hannoun, A. P. Dhillon, G. Norkrans, P. Horal // *J. Infect. Dis.* – 1999. – V. 179, № 4 – P.775–782.
95. Lindh M. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B / M. Lindh, P. Horal, A. P. Dhillon, G. Norkrans // *J. Viral Hepat.* – 2000. – V. 7, № 4 – P.258–267.
96. Locarnini S. A. Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants / S. A. Locarnini, L. Yuen // *Antivir. Ther.* – 2010. – V. 15, № 3 PART B –

P.451–461.

97. Locarnini S. Molecular genetics of HBV infection / S. Locarnini, F. Zoulim // *Antivir. Ther.* – 2010. – V. 15, № SUPPL. 3 – P.3–14.

98. Loeb D.D. Sequence identity of the terminal redundancies on the minus-strand DNA template is necessary but not sufficient for the template switch during hepadnavirus plus-strand DNA synthesis / D. D. Loeb, K. J. Gulya, R. Tian // *J. Virol.* – 1997. – V. 71, № 1 – P.152–160.

99. Loeb D.D. Sequence-independent RNA cleavages generate the primers for plus strand DNA synthesis in hepatitis B viruses: implications for other reverse transcribing elements / D. D. Loeb, R. C. Hirsch, D. Ganem // *EMBO J.* – 1991. – V. 10, № 11 – P.3533–3540.

100. Löffler-Mary H. Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins / H. Löffler-Mary, J. Dumortier, C. Klentsch-Zimmer, R. Prange // *Virology* – 2000. – V. 270, № 2 – P.358–367.

101. Lok A.S.F. Monitoring Drug Resistance in Chronic Hepatitis B Virus (HBV) - Infected Patients during Lamivudine Therapy : Evaluation of Performance of INNO-LiPA HBV DR Assay / A. S. F. Lok, F. Zoulim, S. Locarnini, A. Mangia, G. Niro, H. Decraemer, G. Maertens, F. Hulstaert, K. De Vreese, E. Sablon // *Society* – 2002. – V. 40, № 10 – P.3729–3734.

102. Lusida M.I. Genotype and subtype analyses of hepatitis B virus (HBV) and possible co-infection of HBV and hepatitis C virus (HCV) or hepatitis D virus (HDV) in blood donors, patients with chronic liver disease and patients on hemodialysis in Surabaya, Indonesia / M. I. Lusida, Surayah, H. Sakugawa, M. Nagano-Fujii, Soetjipto, Mulyanto, R. Handajani, Boediwarsono, P. B. Setiawan, C. a Nidom, S. Ohgimoto, H. Hotta // *Microbiol. Immunol.* – 2003. – V. 47, № 12 – P.969–975.

103. Macovei A. Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells / A. Macovei, C. Radulescu, C. Lazar, S. Petrescu, D. Durantel, R. A. Dwek, N. Zitzmann, N. B. Nichita // *J. Virol.* – 2010. – V. 84, № 1 – P.243–253.

104. Magnius L.O. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B

- virus as reflected by sequence variability of the S-gene / L. O. Magnius, H. Norder // *Intervirology* – 1995. – V. 38, № 1-2 – P.24–34.
105. Mahoney F.J. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection / F. J. Mahoney // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1999. – V. 12, № 2 – P.351–366.
106. Maksyutov R.A. Genotyping of hepatitis B and C virus Russian isolates for reference serum panel construction / R. A. Maksyutov, E. V Gavrilova, A. Z. Maksyutov, A. N. Kanev // *J. Med. Virol.* – 2015. – V. 87, № 7 – P.1192–1198.
107. Malmström S. Novel method for genotyping hepatitis B virus on the basis of taqMan real-time PCR / S. Malmström, I. Berglin-Enquist, M. Lindh // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – V. 48, № 4 – P.1105–1111.
108. Martinot-Peignoux M. The role of HBsAg quantification for monitoring natural history and treatment outcome / M. Martinot-Peignoux, M. Lapalus, T. Asselah, P. Marcellin // *Liver Int.* – 2013. – V. 33, Suppl 1 – P.125–132.
109. Martinot-Peignoux M. HBsAg quantification: useful for monitoring natural history and treatment outcome / M. Martinot-Peignoux, M. Lapalus, T. Asselah, P. Marcellin // *Liver Int.* – 2014. – V. 34, Suppl 1 – P.97–107.
110. Mayerat C. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? / C. Mayerat, A. Mantegani, P. C. Frei // *J. Viral Hepat.* – 1999. – V. 6, № 4 – P.299–304.
111. Melegari M. Properties of hepatitis B virus pre-S1 deletion mutants / M. Melegari, S. Bruno, J. R. Wands // *Virology* – 1994. – V. 199, № 2 – P.292–300.
112. Mikhaïlov M.I. Comparative evaluation of prevalence of infections caused by hepatitis B and C viruses among individuals of various groups with high risk of infection / M. I. Mikhaïlov, M. K. Mamedov, A. E. Dadasheva // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – 2013. – № 4 – P.44–48.
113. Milich D.R. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence / D. R. Milich, M. K. Chen, J. L. Hughes, J. E. Jones // *J. Immunol.* – 1998. – V. 160, № 4 – P.2013–2021.
114. Mitsui F. Importance of serum concentration of adefovir for Lamivudine-adeфовир

combination therapy in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B / F. Mitsui, M. Tsuge, T. Kimura, S. Kitamura, H. Abe, H. Saneto, T. Kawaoka, D. Miki, T. Hatakeyama, N. Hiraga, M. Imamura, Y. Kawakami, H. Aikata, S. Takahashi, C. N. Hayes, H. Igarashi, K. Morimoto, M. Shimizu, K. Chayama // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – V. 54, № 8 – P.3205–3211.

115. Mohamadkhani A. The Importance of Hepatitis B Virus Genome Diversity in Basal Core Promoter Region / A. Mohamadkhani, G. Montazeri, H. Poustchi // *Middle East J. Dig. Dis.* – 2011. – V. 3, № 1 – P.13–19.

116. Moorthie S. Review of massively parallel DNA sequencing technologies / S. Moorthie, C. J. Mattocks, C. F. Wright // *Hugo J.* – 2011. – V. 5, № 1-4 – P.1–12.

117. Moradi A. Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype D in Golestan Province-Iran / A. Moradi, S. Zhand, A. Ghaemi, N. Javid, A. Tabarraei // *Virus Genes* – 2012. – V. 44, № 3 – P.382–387.

118. Mu D. A sensitive and accurate quantification method for the detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by the application of a droplet digital polymerase chain reaction amplification system / D. Mu, L. Yan, H. Tang, Y. Liao // *Biotechnol. Lett.* – 2015.

119. Mukaide M. Mechanism of entecavir resistance of hepatitis B virus with viral breakthrough as determined by long-term clinical assessment and molecular docking simulation / M. Mukaide, Y. Tanaka, T. Shin-I, M. F. Yuen, F. Kurbanov, O. Yokosuka, M. Sata, Y. Karino, G. Yamada, K. Sakaguchi, E. Orito, M. Inoue, S. Baqai, C. L. Lai, M. Mizokami // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – V. 54, № 2 – P.882–889.

120. Mukomolov S.L. Frequency of antibodies against surface and nuclear antigens of hepatitis B virus in population of St. Petersburg in 2013 / S. L. Mukomolov, D. D. Bolsun, V. K. Krasniakov, I. A. Levakova, A. I. Griбанov, E. A. Siniavskaya, M. V. Alekseeva, V. I. Likhacheva // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – 2014. – № 5 – P.43–49.

121. Nassal M. Hepatitis B viruses: Reverse transcription a different way / M. Nassal // *Virus Res.* – 2008. – V. 134, № 1-2 – P.235–249.

122. Neurath A.R. Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for

- interleukin 6 on the virus envelope protein / A. R. Neurath, N. Strick, P. Sproul // *J. Exp. Med.* – 1992. – V. 175, № 2 – P.461–469.
123. Newbold J.E. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes / J. E. Newbold, H. Xin, M. Tencza, G. Sherman, J. Dean, S. Bowden, S. Locarnini // *J. Virol.* – 1995. – V. 69, № 6 – P.3350–3357.
124. Niesters H.G.M. Validation of the INNO-LiPA HBV DR assay (version 2) in monitoring hepatitis B virus-infected patients receiving nucleoside analog treatment / H. G. M. Niesters, F. Zoulim, C. Pichoud, M. Buti, F. Shapiro, N. D’Heuvaert, L. Celis, J. Doutreloigne, E. Sablon // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – V. 54, № 3 – P.1283–1289.
125. Nishijima N. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing / N. Nishijima, H. Marusawa, Y. Ueda, K. Takahashi, A. Nasu, Y. Osaki, T. Kou, S. Yazumi, T. Fujiwara, S. Tsuchiya, K. Shimizu, S. Uemoto, T. Chiba // *PLoS One* – 2012. – V. 7, № 4 – P.1-10.
126. Noguchi A. HBsAg subtypes among HBsAg carriers in Okinawa, Japan. Evidence of an important relationship in seroconversion from HBeAg to anti-HBe / A. Noguchi, J. Hayashi, K. Nakashima, M. Hirata, H. Ikematsu, S. Kashiwagi // *J. Infect.* – 1994. – V. 28, № 2 – P.141–150.
127. Norder H. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes / H. Norder, A.-M. Couroucé, P. Coursaget, J. M. Echevarria, S.-D. Lee, I. K. Mushahwar, B. H. Robertson, S. Locarnini, L. O. Magnius // *Intervirology* – 2004. – V. 47, № 6 – P.289–309.
128. Norder H. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen / H. Norder, B. Hammas, S. D. Lee, K. Bile, a. M. Courouce, I. K. Mushahwar, L. O. Magnius // *J. Gen. Virol.* – 1993. – V. 74, № 7 – P.1341–1348.
129. Okamoto H. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen / H. Okamoto, F. Tsuda, Y.

- Akahane, Y. Sugai, M. Yoshiba, K. Moriyama, T. Tanaka, Y. Miyakawa, M. Mayumi // *J. Virol.* – 1994. – V. 68, № 12 – P.8102–8110.
130. Okamoto H. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes / H. Okamoto, F. Tsuda, H. Sakugawa, R. I. Sastrosoewignjo, M. Imai, Y. Miyakawa, M. Mayumi // *J. Gen. Virol.* – 1988. – V. 69 – P.2575–2583.
131. Orito E. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan / E. Orito, T. Ichida, H. Sakugawa, M. Sata, N. Horiike, K. Hino, K. Okita, T. Okanoue, S. Iino, E. Tanaka, K. Suzuki, H. Watanabe, S. Hige, M. Mizokami // *Hepatology* – 2001. – V. 34, № 3 – P.590–594.
132. Orito E. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group / E. Orito, M. Mizokami, H. Sakugawa, K. Michitaka, K. Ishikawa, T. Ichida, T. Okanoue, H. Yotsuyanagi, S. Iino // *Hepatology* – 2001. – V. 33, № 1 – P.218–223.
133. Ouzan D. Add-on peg-interferon leads to loss of HBsAg in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis and HBV DNA fully suppressed by long-term nucleotide analogs / D. Ouzan, G. Pénaranda, H. Joly, H. Khiri, A. Pironti, P. Halfon // *J. Clin. Virol.* – 2013. – V. 58, № 4 – P.713–717.
134. Park G.T. A negative regulatory element and its binding protein in the upstream of enhancer II of hepatitis B virus / G. T. Park, Y. W. Yi, C. Y. Choi, H. M. Rho // *DNA Cell Biol.* – 1997. – V. 16, № 12 – P.1459–1465.
135. Pisareva M.M. Usage of polymerase chain reaction in complex diagnosis of hepatitis B / M. M. Pisareva, V. M. Morozov, K. V Tarasov, O. I. Reshetnikova, S. N. Semenov, E. N. Vinogradova, O. I. Kiselev, M. P. Grudin // *Vopr. Virusol.* – V. 44, № 6 – P.284–286.
136. Pollack J.R. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation / J. R. Pollack, D. Ganem // *J. Virol.* – 1993. – V. 67, № 6 – P.3254–3263.
137. Pollack J.R. Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis / J. R. Pollack, D.

Ganem // *J. Virol.* – 1994. – V. 68, № 9 – P.5579–5587.

138. Pollicino T. Impact of hepatitis B virus (HBV) preS/S genomic variability on HBV surface antigen and HBV DNA serum levels / T. Pollicino, G. Amaddeo, A. Restuccia, G. Raffa, A. Alibrandi, G. Cutroneo, A. Favaloro, S. Maimone, G. Squadrito, G. Raimondo // *Hepatology* – 2012. – V. 56, № 2 – P.434–443.

139. Pontisso P. The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross-react in their binding to the hepatocyte surface / P. Pontisso, M. G. Ruvoletto, C. Tiribelli, W. H. Gerlich, A. Ruol, A. Alberti // *J. Gen. Virol.* – 1992. – V. 73 – P.2041–2045.

140. Rabe B. Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome / B. Rabe, A. Vlachou, N. Panté, A. Helenius, M. Kann // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2003. – V. 100, № 17 – P.9849–9854.

141. Radziwill G. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity / G. Radziwill, W. Tucker, H. Schaller // *J. Virol.* – 1990. – V. 64, № 2 – P.613–620.

142. Ramachandran J. Serum HBsAg quantification in treatment-naïve Indian patients with chronic hepatitis B / J. Ramachandran, A. M. Ismail, G. Chawla, G. J. Fletcher, A. Goel, C. E. Eapen, P. Abraham // *Indian J. Gastroenterol.* – 2014. – V. 33, № 2 – P.131–135.

143. Reifenberg K. The hepatitis B virus e antigen cannot pass the murine placenta efficiently and does not induce CTL immune tolerance in H-2b mice in utero / K. Reifenberg, T. Deutschle, J. Wild, R. Hanano, I. Gastrock-Balitsch, R. Schirmbeck, H. J. Schlicht // *Virology* – 1998. – V. 243, № 1 – P.45–53.

144. Rieger A. Specific hepatitis B virus minus-strand DNA synthesis requires only the 5' encapsidation signal and the 3'-proximal direct repeat DR1 / A. Rieger, M. Nassal // *J. Virol.* – 1996. – V. 70, № 1 – P.585–589.

145. Romano L. The worldwide impact of vaccination on the control and protection of viral hepatitis B / L. Romano, S. Paladini, P. Van Damme, A. R. Zanetti // *Dig. Liver Dis.* – 2011. – V. 43 Suppl 1 – P.S2–S7.

146. Rosenblum B.B. New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns / B. B. Rosenblum, L. G. Lee, S. L. Spurgeon, S. H. Khan, S. M. Menchen, C.

- R. Heiner, S. M. Chen // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – V. 25, № 22 – P.4500–4504.
147. Rybicka M. High-throughput matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative approach to monitoring drug resistance of hepatitis B virus / M. Rybicka, P. Stalke, M. Dreczewski, T. Smiatacz, K. P. Bielawski // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – V. 52, № 1 – P.9–14.
148. Saitou N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // *Mol. Biol. Evol.* – 1987. – V. 4, № 4 – P.406–425.
149. Sanger F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1977. – V. 74, № 12 – P.5463–5467.
150. Seifer M. Telbivudine, a nucleoside analog inhibitor of HBV polymerase, has a different in vitro cross-resistance profile than the nucleotide analog inhibitors adefovir and tenofovir / M. Seifer, A. Patty, I. Serra, B. Li, D. N. Strandring // *Antiviral Res.* – 2009. – V. 81, № 2 – P.147–155.
151. Shao Q. Role of peripheral blood mononuclear cell transportation from mother to baby in HBV intrauterine infection / Q. Shao, X. Zhao, M. D. Yao Li // *Arch. Gynecol. Obstet.* – 2013. – V. 288, № 6 – P.1257–1261.
152. Shi M. Rapid quantitation of lamivudine-resistant mutants in lamivudine treated and untreated patients with chronic hepatitis B virus infection / M. Shi, Z.-J. Yang, R.-S. Wang, H. Zhang, Y.-F. Zhu, Y.-P. Xu, Q.-Y. Lin, L.-J. Jin // *Clin. Chim. Acta.* – 2006. – V. 373, № 1-2 – P.172–175.
153. Shi Y.-H. Correlation between hepatitis B virus genotypes and clinical outcomes / Y.-H. Shi // *Jpn. J. Infect. Dis.* – 2012. – V. 65, № 6 – P.476–482.
154. Shi Z. Hepatitis B immunoglobulin injection in pregnancy to interrupt hepatitis B virus mother-to-child transmission-a meta-analysis / Z. Shi, X. Li, L. Ma, Y. Yang // *Int. J. Infect. Dis.* – 2010. – V. 14, № 7 – P.e622–e634.
155. Shih Y.-H. Hepatitis B virus quantification and detection of YMDD mutants in a single reaction by real-time PCR and annealing curve analysis / Y.-H. Shih, S.-H. Yeh, P.-J. Chen, W.-P. Chou, H.-Y. Wang, C.-J. Liu, S.-F. Lu, D.-S. Chen // *Antivir. Ther.* –

2008. – V. 13, № 4 – P. 469–480.

156. Shiina S. Relationship of HBsAg subtypes with HBeAg/anti-HBe status and chronic liver disease. Part I: Analysis of 1744 HBsAg carriers / S. Shiina, H. Fujino, Y. Uta, K. Tagawa, T. Unuma, M. Yoneyama, T. Ohmori, S. Suzuki, M. Kurita, Y. Ohashi // *Am. J. Gastroenterol.* – 1991. – V. 86, № 7 – P.866–871.

157. Shliakhtenko L.I. The theoretical bases of the epidemiology of viral hepatitis B / L. I. Shliakhtenko, S. L. Mukomolov, V. V Nechaev, L. N. Kryga // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – № 4 – P.25–29.

158. Smith G.J. The hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element contains two conserved RNA stem-loops which are required for function / G. J. Smith, J. E. Donello, R. Lück, G. Steger, T. J. Hope // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – V. 26, № 21 – P.4818–4827.

159. Sonneveld M.J. Pros and Cons of Peginterferon Versus Nucleos(t)ide Analogues for Treatment of Chronic Hepatitis B / M. J. Sonneveld, H. L. A. Janssen // *Curr. Hepat. Rep.* – 2010. – V. 9, № 2 – P.91–98.

160. Staprans S. Mutations affecting hepadnavirus plus-strand DNA synthesis dissociate primer cleavage from translocation and reveal the origin of linear viral DNA / S. Staprans, D. D. Loeb, D. Ganem // *J. Virol.* – 1991. – V. 65, № 3 – P.1255–1262.

161. Stuyver L.J. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region / L. J. Stuyver, S. a. Locarnini, a. Lok, D. D. Richman, W. F. Carman, J. L. Dienstag, R. F. Schinazi, a. Bartholomeusz, a. Di Bisceglie, R. a. De Man, G. Dusheiko, P. a. Furman, P. La Colla, C. L. Lai, J. Y. N. Lau, M. P. Manns, H. G. M. Niesters, M. Omata, S. K. Ono-Nita, M. J. Otto, D. Pillay, T. Poynard, J. P. Sommadossi, D. Shouval, V. Soriano, H. Thomas, H. Will, F. Zoulim // *Hepatology* – 2001. – V. 33, № 3 – P.751–757.

162. Summers J. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification / J. Summers, P. M. Smith, A. L. Horwich // *J. Virol.* – 1990. – V. 64, № 6 – P.2819–2824.

163. Takkenberg R.B. Baseline hepatitis B surface antigen (HBsAg) as predictor of sustained HBsAg loss in chronic hepatitis B patients treated with pegylated interferon-

- α 2a and adefovir / R. B. Takkenberg, L. Jansen, A. de Niet, H. L. Zaaijer, C. J. Weegink, V. Terpstra, M. G. W. Dijkgraaf, R. Molenkamp, P. L. M. Jansen, M. Koot, V. Rijckborst, H. L. A. Janssen, M. G. H. M. Beld, H. W. Reesink // *Antivir. Ther.* – 2013. – V. 18, № 7 – P.895–904.
164. Tallo T. Hepatitis B virus genotype D strains from Estonia share sequence similarity with strains from Siberia and may specify ayw4 / T. Tallo, H. Norder, V. Tefanova, T. Krispin, L. Priimägi, S. Mukomolov, M. Mikhailov, L. O. Magnus // *J. Med. Virol.* – 2004. – V. 74, № 2 – P.221–227.
165. Tamura K. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – V. 28, № 10 – P.2731–2739.
166. Tan Y.-J. Hepatitis B virus infection and the risk of hepatocellular carcinoma / Y.-J. Tan // *World J. Gastroenterol.* – 2011. – V. 17, № 44 – P.4853-4857.
167. Tavis J.E. Hepadnavirus reverse transcription initiates within the stem-loop of the RNA packaging signal and employs a novel strand transfer / J. E. Tavis, S. Perri, D. Ganem // *J. Virol.* – 1994. – V. 68, № 6 – P.3536–3543.
168. Teo C.-G. Potential threat of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants to public health / C.-G. Teo, S. A. Locarnini // *Antivir. Ther.* – 2010. – V. 15, № 3 Pt B – P.445–449.
169. Thakur V. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent / V. Thakur, R. C. Guptan, S. N. Kazim, V. Malhotra, S. K. Sarin // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2002. – V. 17, № 2 – P.165–170.
170. Thakur V. Efficacy of Shanvac-B recombinant DNA hepatitis B vaccine in health care workers of Northern India / V. Thakur, N. T. Pati, R. C. Gupta, S. K. Sarin // *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int* – 2010. – V. 9, № 4 – P.393–397.
171. Thompson J.D. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice / J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – V. 22, № 22 – P.4673–4680.

172. Tian S. Suppression of hepatocellular carcinoma proliferation and hepatitis B surface antigen secretion with interferon- λ 1 or PEG-interferon- λ 1 / S. Tian, X. Hui, Z. Fan, Q. Li, J. Zhang, X. Yang, X. Ma, B. Huang, D. Chen, H. Chen // *FASEB J.* – 2014. – V. 28, № 8 – P.3528–3539.
173. Tillmann H.L. Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection / H. L. Tillmann // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – V. 13, № 1 – P.125–140.
174. Tong S. Mechanism of HBV genome variability and replication of HBV mutants / S. Tong // *J. Clin. Virol.* – 2005. – V. 34, № SUPPL. 1 – P.134–138.
175. Tong S. Hepatitis B virus genetic variants: biological properties and clinical implications / S. Tong, J. Li, J. R. Wands, Y.-M. Wen // *Emerg. Microbes Infect.* – 2013. – V. 2, № 3 – P.1-11.
176. Treichel U. Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells / U. Treichel, K. H. Meyer zum Büschenfelde, H. P. Dienes, G. Gerken // *Arch. Virol.* – 1997. – V. 142, № 3 – P.493–498.
177. Tsubota A. Genotype may correlate with liver carcinogenesis and tumor characteristics in cirrhotic patients infected with hepatitis B virus subtype adw / A. Tsubota, Y. Arase, F. Ren, H. Tanaka, K. Ikeda, H. Kumada // *J. Med. Virol.* – 2001. – V. 65, № 2 – P. 257–265.
178. Voelkerding K. V Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics / K. V Voelkerding, S. A. Dames, J. D. Durtschi // *Clin. Chem.* – 2009. – V. 55, № 4 – P.641–658.
179. Vogelstein B. Preparative and analytical purification of DNA from agarose / B. Vogelstein, D. Gillespie // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1979. – V. 76, № 2 – P.615–619.
180. Vries-Sluijs T.E.M.S. de Long-term therapy with tenofovir is effective for patients co-infected with human immunodeficiency virus and hepatitis B virus / T. E. M. S. de Vries-Sluijs, J. G. P. Reijnders, B. E. Hansen, H. L. Zaaijer, J. M. Prins, S. D. Pas, M. Schutten, A. I. M. Hoepelman, C. Richter, J. W. Mulder, R. A. de Man, H. L. A. Janssen, M. E. van der Ende // *Gastroenterology* – 2010. – V. 139, № 6 – P.1934–1941.
181. Wang G.H. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer

- for viral DNA synthesis / G. H. Wang, C. Seeger // *Cell* – 1992. – V. 71, № 4 – P.663–670.
182. Wang G.H. Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses / G. H. Wang, C. Seeger // *J. Virol.* – 1993. – V. 67, № 11 – P.6507–6512.
183. Wang R.S. Detection of YMDD mutants using universal template real-time PCR / R. S. Wang, H. Zhang, Y. F. Zhu, B. Han, Z. J. Yang // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – V. 12, № 8 – P.1308–1311.
184. Wang R.-S. Detection of YMDD mutants using universal template real-time PCR / R.-S. Wang, H. Zhang, Y.-F. Zhu, B. Han, Z.-J. Yang // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – V. 12, № 8 – P.1308–1311.
185. Wang Y.M. Antiviral therapy for hepatitis B virus associated hepatic failure / Y. M. Wang, Y. Z. Tang // *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* – 2009. – V. 8, № 1 – P.17–24.
186. Wang Z. Screening for serum biomarkers in patients with chronic hepatitis B with hepatitis B surface antigen seroclearance, following pegylated interferon alpha therapy / Z. Wang, X. Li, C. Shi, M. Zhang, R. Chen, W. Wu, Q. Hou, W. Ke, T. Fan, Z. Wen, X. Hao, N. Qu // *Mol. Med. Rep.* – 2015. – V. 11, № 1 – P.427–433.
187. Wei Y. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene / Y. Wei, C. Neuveut, P. Tiollais, M. Buendia // *Pathol. Biol. (Paris)*. – 2010. – V. 58, № 4 – P.267–272.
188. Wu T.T. In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway / T. T. Wu, L. Coates, C. E. Aldrich, J. Summers, W. S. Mason // *Virology* – 1990. – V. 175, № 1 – P.255–261.
189. Yan H. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus / H. Yan, G. Zhong, G. Xu, W. He, Z. Jing, Z. Gao, Y. Huang, Y. Qi, B. Peng, H. Wang, L. Fu, M. Song, P. Chen, W. Gao, B. Ren, Y. Sun, T. Cai, X. Feng, J. Sui, W. Li // *Elife* – 2012. – V. 1 – P. 1-28.
190. Yang W. Illegitimate replication of linear hepadnavirus DNA through nonhomologous recombination / W. Yang, J. Summers // *J. Virol.* – 1995. – V. 69, № 7 – P.4029–4036.
191. Yang W. Infection of ducklings with virus particles containing linear double-

- stranded duck hepatitis B virus DNA: illegitimate replication and reversion / W. Yang, J. Summers // *J. Virol.* – 1998. – V. 72, № 11 – P.8710–8717.
192. Yeh C.-T. Development of HBV S gene mutants in chronic hepatitis B patients receiving nucleotide/nucleoside analogue therapy / C.-T. Yeh // *Antivir. Ther.* – 2010. – V. 15, № 3 Part B – P.471–475.
193. Yim H.J. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005 / H. J. Yim, A. S.-F. Lok // *Hepatology* – 2006. – V. 43, № 2 Suppl 1 – P.S173–S181.
194. Yuh C.H. Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus / C. H. Yuh, Y. L. Chang, L. P. Ting // *J. Virol.* – 1992. – V. 66, № 7 – P.4073–4084.
195. Zanetti A.R. The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview / A. R. Zanetti, P. Van Damme, D. Shouval // *Vaccine* – 2008. – V. 26, № 49 – P.6266–6273.
196. Zang W.Q. Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a cellular protein that binds to the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element / W. Q. Zang, A. M. Fieno, R. A. Grant, T. S. Yen // *Virology* – 1998. – V. 248, № 1 – P.46–52.
197. Zhang P. Characterization of functional Sp1 transcription factor binding sites in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter / P. Zhang, A K. Raney, A McLachlan // *J. Virol.* – 1993. – V. 67, № 3 – P.1472–1481.
198. Zhang P. Characterization of the hepatitis B virus X- and nucleocapsid gene transcriptional regulatory elements / P. Zhang, A. K. Raney, A. McLachlan // *Virology* – 1992. – V. 191, № 1 – P.31–41.
199. Zhi X. Quick genotyping detection of HBV by giant magnetoresistive biochip combined with PCR and line probe assay / X. Zhi, Q. Liu, X. Zhang, Y. Zhang, J. Feng, D. Cui // *Lab Chip* – 2012. – V. 12, № 4 – P.741–745.
200. Zhong Y. A novel method for detection of HBVcccDNA in hepatocytes using rolling circle amplification combined with in situ PCR / Y. Zhong, S. Hu, C. Xu, Y. Zhao, D. Xu, Y. Zhao, J. Zhao, Z. Li, X. Zhang, H. Zhang, J. Li // *BMC Infect. Dis.* –

2014. – V. 14 – P.1-8.

201. Zhou B. Quantification of hepatitis B surface antigen and E antigen: correlation between Elecsys and architect assays / B. Zhou, M. Liu, G. Lv, H. Zheng, Y. Wang, J. Sun, J. Hou // *J. Viral Hepat.* – 2013. – V. 20, № 6 – P.422–429.

202. Zöllner B. Subtype-dependent response of hepatitis B virus during the early phase of lamivudine treatment / B. Zöllner, J. Petersen, P. Schäfer, M. Schröter, R. Laufs, M. Sterneck, H.-H. Feucht // *Clin. Infect. Dis.* – 2002. – V. 34, № 9 – P.1273–1277.

203. Zoulim F. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo / F. Zoulim, J. Saputelli, C. Seeger // *J. Virol.* – 1994. – V. 68, № 3 – P.2026–2030.

204. WHO | Hepatitis B [Электронный ресурс]. URL: <http://www.who.int/immunization/diseases/hepatitisB/en/>.

205. Hepatitis B virus complete genome, genotype D - Nucleotide - NCBI [Электронный ресурс]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AJ344117>.

206. NCBI [Электронный ресурс]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Перечень рисунков:

Рисунок 1.1 Схема строения вириона и организации генома ВГВ.....	12
Рисунок 1.2 Схема транскрипции и трансляции генома ВГВ.....	14
Рисунок 1.3 Трансмембранная топология белков оболочки.....	15
Рисунок 1.4 Репликативный цикл гепаднавирусов.....	18
Рисунок 1.5 Инициация обратной транскрипции и образование комплекса полимеразы с ϵ	20
Рисунок 1.6 Профиль появления и исчезновения пяти серологических маркеров инфекции ВГВ.....	22
Рисунок 1.7 Химические формулы аналогов нуклеозидов/нуклеотидов.....	33
Рисунок 1.8 Локализация основных мутаций устойчивости к аналогам нуклеозидов/нуклеотидов на полимеразе ВГВ.....	34
Рисунок 1.9 Схема организации генома ВГВ и влияние замен в полимеразе на поверхностный белок.....	36
Рисунок 3.1 Филогенетическое дерево последовательностей полных геномов ВГВ.....	57
Рисунок 3.2 Схема конструирования плазмид pUC-18-YMDD, pUC-18-YIDD и pUC-18-YVDD.....	66
Рисунок 3.3 Специфичность праймеров для анализа мутаций устойчивости rtM204I/V и расчет статистически достоверной разницы в значении Ct для pUC-18-YMDD, pUC-18-YIDD и pUC-18-YVDD.....	68
Рисунок 3.4 Чувствительность и анализ эффективности метода ПЦР для плазмиды pUC-18-YMDD в концентрациях 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 копий/мл.....	71
Рисунок 3.5 Чувствительность и анализ эффективности метода ПЦР для плазмиды pUC-18-YIDD в концентрациях 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 копий/мл.....	72

Рисунок 3.6 Чувствительность и анализ эффективности метода ПЦР для плазмиды pUC-18-YVDD в концентрациях 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} копий/мл.....	73
Рисунок 3.7 Анализ кривых плавления.....	74

Перечень таблиц:

Таблица 1.1 Влияние генотипов ВГВ на исходы хронической инфекции.....	28
Таблица 2.1 Алгоритм определения мутаций устойчивости к аналогам нуклеозидов в YMDD-мотиве гена полимеразы ВГВ.....	45
Таблица 3.1 Зависимость между вирусной нагрузкой и генотипом ВГВ.....	53
Таблица 3.2 Распределение генотипов вируса гепатита В среди больных ХГВ в Санкт-Петербурге и Петрозаводске в период с 2002-2006 гг. и 2008-2014 гг.....	53
Таблица 3.3 NGS секвенирование геномов ВГВ.....	55
Таблица 3.4 Влияние замен в полимеразе на эффективность лечения пациентов с ХГВ из Санкт-Петербурга.....	58
Таблица 3.5 Увеличение вирусной нагрузки (ВН) у пациентов при лечении энтекавиром.....	61
Таблица 3.6 Выявление мутаций устойчивости ВГВ к аналогам нуклеот(з)идов у пациентов с ХГВ из Вьетнама.....	64
Таблица 3.7 Оценка специфичности праймеров в образцах, содержащих различные варианты плазмид.....	69
Таблица 3.8 Сравнение результатов ПЦР и секвенирования по Сенжеру у пациентов с ХГВ.....	75
Таблица 3.9 Сравнение результатов NGS, ПЦР в реальном времени и секвенирования по Сенжеру.....	77
Таблица 3.10 Результаты сборки, картирования и поиска вариантов.....	78
Таблица 3.11 Замены в полимеразе ВГВ у пациента с ХГВ после терапии	

АН, определенных методом секвенирования по-Сенжеру и методом NGS...	81
Таблица 3.12 Мутации в preCore/Core области и замены в белке X вируса гепатита В у пациентов с ХГВ.....	84

Перечень формул:

Формула 2.1 Расчет эффективности ПЦР.....	46
Формула 2.2 Вычисление концентрации библиотеки.....	50