

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ АЛЛЕЛЯ HLA-B*57:01 У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ (2018–2023 гг.)

Бунас А. С., Гасич Е. Л., Булда К. Ю., Коско А. Д.

*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии», г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Наличие аллеля HLA-B*57:01 у пациентов с ВИЧ-инфекцией ассоциировано с высоким риском развития реакции гиперчувствительности к нуклеозидному ингибитору обратной транскриптазы ВИЧ-1 абакавиру. Распространенность данного аллеля может достигать 20 % в зависимости от популяции. Рутинное тестирование на наличие аллеля HLA-B*57:01 позволяет уменьшить частоту возникновения иммунологически опосредованной реакции гиперчувствительности к абакавиру, характеризующейся полиорганным поражением.

Целью настоящего исследования явилось определение распространенности аллеля HLA-B*57:01 среди пациентов с ВИЧ-инфекцией на территории Республики Беларусь за период 2018–2023 гг.

Исследование было проведено для 1368 пациентов, образцы цельной крови которых поступали из всех регионов Республики Беларусь в период с июня 2018 по апрель 2023 г. Было установлено, что распространенность аллеля HLA-B*57:01 в Республике Беларусь составила 6,7 %, что соответствует его встречаемости в странах Европы и СНГ.

Применение метода определения аллеля HLA-B*57:01 позволит снизить риск развития реакции гиперчувствительности при назначении лекарственного средства абакавир ВИЧ-инфицированным пациентам.

Ключевые слова: HLA-B*57, реакция гиперчувствительности, абакавир, ВИЧ-инфекция.

Введение. Абакавир является нуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы ВИЧ-1, используемым в качестве средства высокоактивной антиретровирусной терапии ВИЧ-1 в сочетании с такими лекарственными средствами, как зидовудин, эмтрицитабин, тенофовир и ламивудин. Противовирусная активность препарата обусловлена фосфорилированием внутриклеточными ферментами с образованием

карбовиртрифосфата (аналог гуанозина). Карбовиртрифосфат конкурирует с природным субстратом фермента обратной транскриптазы ВИЧ-1, который включается в вирусную ДНК. После включения аналог нуклеозида терминирует удлинение цепи ДНК, тем самым предотвращая дальнейший синтез вирусной ДНК.

Большой проблемой для применения данного лекарственного средства является

опосредованная абакавиром реакция гиперчувствительности. У 1–8 % пациентов, начинающих терапию с применением схем, включающих абакавир, в течение первых 6 недель (в среднем 11 дней) может возникнуть реакция гиперчувствительности. Симптомом данной реакции является полиорганическое поражение, характеризующееся двумя или более клиническими проявлениями: сыпь, обычно в виде крапивницы; тошнота, рвота, диарея, боль в брюшной полости, язвы во рту; одышка, кашель, боль в горле, дистресс-синдром у взрослых; лихорадка, летаргия, недомогание, отеки, лимфаденопатия, артериальная гипотензия, конъюнктивит, анафилаксия; головная боль, парестезия, лимфопения; печеночная недостаточность; миалгия, артралгия, повышение уровня креатининфосфокиназы; повышение уровня креатинина, почечная недостаточность. При тяжелых реакциях могут возникнуть опасные для жизни кожные заболевания (синдром Стивенса — Джонсона и токсико-эпидермальный некролиз). При продолжении терапии состояние пациента усугубляется. Однако, как правило, после отмены абакавира данные симптомы исчезают. Считается, что реакция гиперчувствительности на абакавир сохраняется в течение всей жизни человека. Повторное введение абакавира сенсibilизированным индивидуумам может быть фатальным, по-видимому, из-за быстрой активации популяции Т-клеток памяти. Следовательно, абакавир противопоказан лицам с предшествующей реакцией гиперчувствительности к нему [1].

Гены *HLA* являются членами семейства генов главного комплекса гистосовместимости (МНС), которое включает в себя более 200 генов. Семейство МНС было разделено на три подгруппы в зависимости от структуры и функции кодируемых белков: класс I, класс II и класс III. Область класса I содержит гены, кодирующие молекулы HLA HLA-A, HLA-B и HLA-C. Эти молекулы экспрессируются на поверхности почти всех клеток и играют важную роль в презентации антигена. Важная роль молекул HLA класса I заключается в представлении пептидов иммунным клеткам (CD8+ Т-клеткам). Большинство из этих пептидов происходят от расщепления собственных клеточных белков. Однако в присутствии чужеродных пеп-

тидных фрагментов CD8+ Т-клетки распознают такие пептиды, как не «свои» и в последствии будут активированы для высвобождения воспалительных цитокинов и запуска иммунного ответа для удаления патогена [2]. Варианты HLA также были связаны с восприимчивостью к побочным лекарственным реакциям типа В.

HLA-B*57:01 (специфический аллель системы тканевой совместимости человека) значительно увеличивает частоту возникновения гиперчувствительности к абакавиру. Абакавир специфически связывается с белком HLA-B*57:01 в его лиганд-связывающем F-кармане, после чего происходит образование белкового комплекса, распознаваемого как чужеродный агент, что приводит к аутоиммунной активации CD8+ Т-клетками. Результатом этой аутоиммунной активации и является возникновение реакции гиперчувствительности к абакавиру. В 2008 г. Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA, США) рекомендовало проведение скрининга на наличие аллеля HLA-B*57:01 для всех пациентов перед назначением абакавира [3].

Взаимосвязь между HLA-B*57:01 и реакцией гиперчувствительности к абакавиру обширно изучалась в различных эпидемиологических исследованиях. Было обнаружено, что в разных этнических группах данный аллель встречается с различной частотой. Так, аллель является наиболее распространенным среди населения Северного Таиланда и Индии (до 20 %), Российской Федерации (5 %), а также присутствует, но менее распространен среди афроамериканцев и смешанного населения США и населения стран Ближнего Востока (2–3 %). HLA-B*57:01 редко встречается в гомогенных популяциях Южной Азии и Африки, в основном отсутствует в Японии и в некоторых африканских популяциях [4]. В странах Европы распространенность HLA-B*57:01 составляет от 1,53 % в Финляндии до 7,75 % в Швейцарии, а общая распространенность среди представителей европеоидной расы в этих странах составляет 6,49 % [5]. В соседних странах данный показатель составляет: от 2,5 до 6,0 % в Российской Федерации, в зависимости от региона и национальности включенных в исследование пациентов, и 5,5 % в Республике Польша [6].

Таким образом, важность проведения скрининга на наличие аллеля HLA-B*57:01 перед назначением абакавира варьирует в зависимости от популяции, также как его экономическая эффективность отличается в разных странах.

Цель работы — установить распространённость фармакогенетического маркера, аллеля главного комплекса гистосовместимости человека HLA-B*57:01 у пациентов с ВИЧ-инфекцией в Республике Беларусь за период с 2018 по 2023 г.

Материалы и методы. Исследование проводили, используя образцы цельной крови пациентов с ВИЧ-инфекцией, полученные из разных регионов Республики Беларусь в период с июня 2018 г. по апрель 2023 г.

Взятие крови производили в специальную вакуумную систему типа Vacuett®. Для получения лейкоцитов проводилась реакция гемолиза с реагентов «ГЕМОЛИТИК» согласно инструкции производителя (производитель — Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация). Экстракцию ДНК человека из лейкоцитарного кольца осуществляли в соответствии с инструкцией по применению комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (производитель — Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация).

Исследования на наличие аллеля HLA-B*57:01 выполняли согласно инструк-

ции по применению «Метод выявления аллеля 57:01 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA-B*57:01)» (регистрационный № 024-1221, утв. 10.06.2022, учреждение разработчик ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь) [7].

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2016.

Результаты и их обсуждение. В ходе проведения исследования наличие аллеля HLA-B*57:01 определено у 1368 пациентов с положительным ВИЧ-статусом, проживающих в разных регионах Республики Беларусь.

Эпидемиологическая характеристика исследуемой выборки. Среди пациентов, включенных в исследование, 588 (43,0 ± 1,3 %) пациентов были женского пола, 780 (57,0 ± 1,3 %) — мужского. Наибольшее количество образцов — 82,1 ± 1,0 % поступило из Минской области. Средний возраст пациентов составил 41 год, при этом от пациентов младше 18 лет поступило 67 (4,9 ± 0,6 %) образцов, от пациентов из возрастной группы 18–25 лет — 35 (2,6 ± 0,4 %) образцов, 244 (17,8 ± 1,0 %) образца было получено от пациентов возраста от 26 до 35 лет, 627 образцов (45,8 ± 1,3 %) — от пациентов 36–45 лет и 395 образцов (28,9 ± 1,2 %) — от пациентов старше 45 лет. Количество образцов, полученных из каждого региона, а также половозрастная структура выборки пациентов с ВИЧ-инфекцией, включенных в исследование, указаны в таблице 1.

Таблица 1 — Половозрастная характеристика выборки пациентов с ВИЧ-инфекцией

Административно-территориальная единица	Женщины		Мужчины		Всего	
	Абсолютное число	Средний возраст, лет	Абсолютное число	Средний возраст, лет	Абсолютное число	Средний возраст, лет
Брестская обл.	7	26,6	8	28,0	15	27,3
Витебская обл.	—	—	2	12,5	2	12,5
Гомельская обл.	34	35,4	36	37,3	70	36,4
Гродненская обл.	5	35,2	5	38,6	10	36,9
г. Минск	52	33,3	78	31,3	130	32,3
Минская обл.	484	41,4	639	42,2	1123	41,8
Могилевская обл.	6	40,5	12	23,4	18	31,9
Итого	588	35,4	780	30,5	1368	30,4

Результаты исследования распространенности аллеля HLA-B*57:01 в популяции ВИЧ-инфицированных пациентов. Для определения наличия аллеля HLA-B*57:01 был использован метод гнездовой ПЦР с последующей электрофоретической детекцией. С учетом низкой встречаемости аллеля HLA-B*57:01 в популяции и для повышения специфичности результатов исследования, электрофоретическую детекцию продукта амплификации проводили дважды — после первого и второго раундов ПЦР. После первого раунда ПЦР в агарозном геле могут присутствовать фрагменты ДНК двух размеров: фрагмент LOXL-1 размером 444 пар нуклеотидов, выступающий в качестве вну-

треннего контроля и должен выявляться во всех исследуемых образцах. При получении второго фрагмента 262 пар нуклеотидов, который соответствует ампликону искомого маркера — аллеля HLA-B*57:01 (рисунок 1 [1]). Для подтверждения принадлежности данного аллеля к варианту HLA-B*57:01:01 проводится второй раунд амплификации с продуктом первой ПЦР для всех образцов, в которых были обнаружены оба фрагмента. В случае обнаружения методом электрофоретической детекции продукта второго раунда третьего фрагмента ДНК размером 96 пар нуклеотидов, то получали подтверждение наличия фрагмент HLA-B*57:01:01 (рисунок 1[2]).

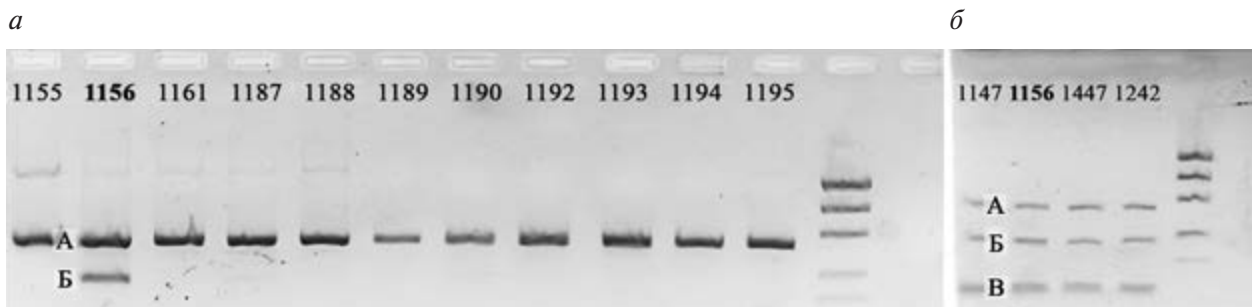


Рисунок 1 — Результаты электрофоретической детекции 1-го и 2-го раундов ПЦР:
а — электрофоретическая детекция первого раунда ПЦР; *б* — электрофоретическая детекция второго раунда ПЦР; А — фрагмент LOXL-1 размером 444 bp; Б — фрагмент HLA-B*57:01 размером 262 bp; В — фрагмент HLA-B*57:01:01 размер 94 bp

Для выявления однонуклеотидных полиморфизмов также был разработан метод, основанный на выявлении однонуклеотидных полиморфизмов, что позволяет отличить вариант HLA-B*57:01:01 от остальных вариантов аллеля HLA-B*57:01. Исследования проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Специфичность полученных результатов была подтверждена анализом нуклеотидных последовательностей положительных и отрицательных образцов, секвенированных Сэнгеру. Данный метод более быстрый, менее трудоемкий по сравнению с методом, основанным на «гнездовой» ПЦР с электрофоретической детекцией. В качестве внутреннего контроля, указывающего на успешную экстракцию ДНК и проведение ПЦР, использовали ген РНКазы Р человека. Внутренний контроль учитывали по флуоресценции по каналу FAM. Детекцию аллеля HLA-B*57:01 осуществляли по каналу HEX. В ходе проведения анализа ам-

плификация внутреннего контрольного образца (флуоресценция по каналу FAM) указывала на успешную экстракцию ДНК и проведение ПЦР. Наличие кривых флуоресценции сразу по двум каналам детекции (FAM и HEX) указывало на наличие аллеля HLA-B*57:01 (рисунок 2).

Результаты типирования аллеля HLA-B*57:01 в выборке, включающей 1368 образцов, полученных из регионов страны, показали следующее. Фармакогенетический маркер, аллель 57:01 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека, был выявлен в 92 исследуемых образцах, что составило $6,7 \pm 0,7 \%$. Результаты представлены на рисунке 3. В целом частота встречаемости аллеля HLA-B*57:01 в регионах варьировала от $5,7 \pm 2,8 \%$ ($n = 4$) в Гомельской области до $7,0 \pm 0,8 \%$ ($n = 79$) в Минской области, но статистически значимых различий не обнаружено ($p > 0,02$).

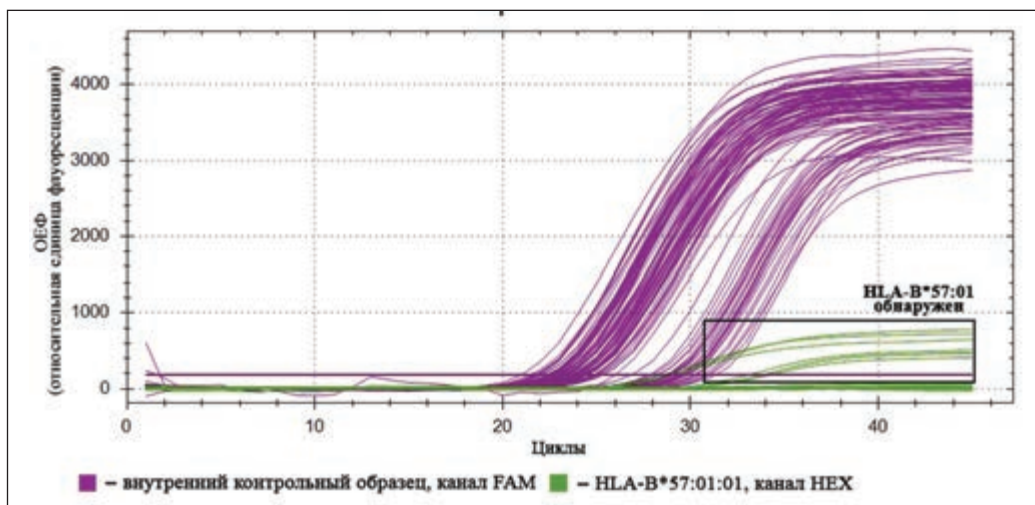


Рисунок 2 — Результаты исследования аллеля HLA-B*57:01 методом ПЦР в режиме реального времени

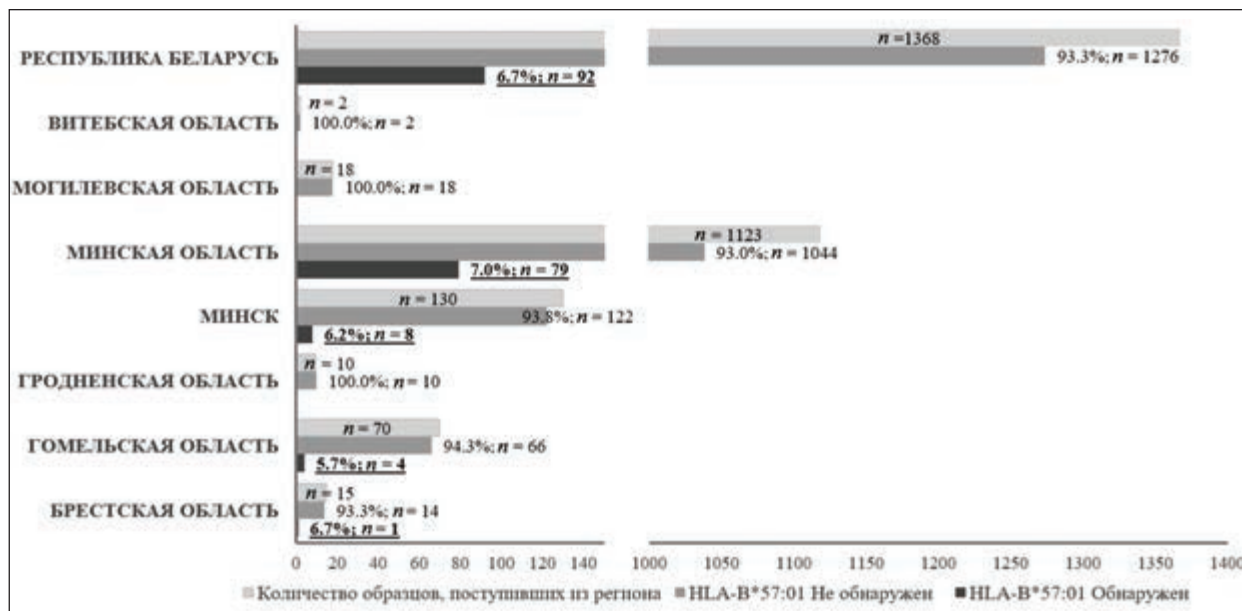


Рисунок 3 — Частота выявления аллеля HLA-B*57:01 в Республике Беларусь и регионах

Согласно клиническим данным, из 92 пациентов, у которых был выявлен аллель HLA-B*57:01, 36 ($39,1 \pm 5,1$ %), получали абакавир в качестве лекарственного средства первого ряда антиретровирусной терапии ВИЧ-1. У 12 пациентов ($13,0 \pm 3,5$ %), принимавших абакавир, зарегистрированы нежелательные побочные реакции, у 10 ($10,9 \pm 3,2$ %) возникла реакция гиперчувствительности. В отношении четырех пациентов было принято решение об изменении схемы антиретровирусной терапии и исключении из нее лекарственного средства абакавир.

Заключение. В Республиканском научно-практическом центре эпидемиологии и микробиологии был разработан и внедрен метод выявления фармакогенетического маркера, аллеля 57:01 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA-B*57:01). Применение метода в практике здравоохранения позволяет подобрать эффективную схему антиретровирусной терапии для пациентов с ВИЧ-инфекцией и снизить частоту развития побочных реакций, связанных с данным препаратом, в том числе и реакции гиперчувствительности. Проведение такого теста является обязательным

условием перед назначением лечения. Лекарственное средство абакавир входит в схемы первой линии антиретровирусной терапии и производители указывают о необходимости предварительного выявления фармакогенетического маркера, аллеля 57:01 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека при назначении абакавир-содержащих лекарственных средств в инструкции по применению препарата.

Результаты исследования показали, что распространенность фармакогенетического маркера — аллеля 57:01 локуса В — главного комплекса гистосовместимости человека в

Республике Беларусь составила 6,7 %, что в целом соответствует данным о его распространенности в странах Европы — от 1,53 (Финляндия) до 7,75 % (Швейцария) в зависимости от страны. Стоит отметить, что согласно приведенным данным, при общей распространенности аллеля HLA-B*57:01 в 4,98 %, распространенность аллеля HLA-B*57:01 была выше среди белого населения (6,49 %) и значительно ниже среди темнокожего населения (0,39 %) [5]. В соседних странах данный показатель составил 5,0 и 5,5 % для Российской Федерации и Республики Польша соответственно [6].

Список цитированных источников

1. Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire / P. T. Illing [et al.] // *Nature*. — 2012. — Vol. 486, № 7404. — P. 554–558.
2. Human Leukocyte Antigen Class I-Restricted Activation of CD8+ T Cells Provides the Immunogenetic Basis of a Systemic Drug Hypersensitivity / D. Chessman [et al.] // *Immunity*. — 2008. — Vol. 28, № 6. — P. 822–832.
3. GlaxoSmithKline. ZIAGEN. Highlights of Prescribing Information [Electronic resource] / GlaxoSmithKline. — Режим доступа: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/020977s017,020978s0201bl.pdf. — Дата доступа: 15.03.2023.
4. Illing, P. T. The role of HLA genes in pharmacogenomics: unravelling HLA associated adverse drug reactions / P. T. Illing, A. W. Purcell, J. McCluskey // *Immunogenetics*. — 2017. — Vol. 69, № 8. — P. 617–630.
5. An epidemiologic study to determine the prevalence of the HLA-B*5701 allele among HIV-positive patients in Europe / C. Orkin [et al.] // *Pharmacogenet Genomics*. — 2010. — Vol. 20, № 5. — P. 307–314.
6. Influence of HLA-B*5701 on 20 year survival rate among patients living with HIV / B. J. Aksak-Was [et al.] // *PLOS ONE*. — 2021. — Vol. 16, № 8. — P. e0255834.
7. Инструкция по применению «Метод выявления аллеля 57:01 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA-B*57:01)»: утв. М-вом здравоохран. Респ. Беларусь 10.06.2022, № 024-1221. — Минск: Респ. научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, 2022. — 9 с.

HLA-B*57:01 allele prevalence in patients with HIV-1 in the Republic of Belarus (2018–2023)

Bunas A. S., Gasich E. L., Bulda K. Y, Kosko A. D.

*Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology,
Minsk, Republic of Belarus*

The presence of the HLA-B*57:01 allele in patients with HIV infection is associated with a high risk of developing a hypersensitivity reaction to the HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitor abacavir. Routine testing for the presence this allele can reduce the incidence of a hypersensitivity reaction. The aim of this study was to determine the prevalence of the HLA-B*57:01 allele among patients with HIV infection in the Republic of Belarus for the period 2018–2023. The prevalence of this allele in the Republic of Belarus was 6.7 %. 39.1 % of patients in whom the HLA-B*57:01 allele was detected were taking abacavir as one of the first-line antiretroviral therapy drugs.

Keywords: HLA-B*57, hypersensitivity reaction, abacavir, HIV infection.

Поступила 19.06.2023