УДК 616.921.5:616.015.8

Резистентность 1В подгенотипа вируса гепатита С к лекарственным препаратам прямого противовирусного действия в Республике Беларусь

Кабанькова А. Н.[1], Гасич Е. Л.[1], Гудель А. С.[1], Жаворонок С. В.[2], Еремин С. В.[2], Кончик Е. С.[1], Головчак Ю. В.[1]

[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», г. Минск, Республика Беларусь;
[2]Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Статья посвящена изучению мутаций в геноме вируса гепатита С, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к лекарственным средствам прямого противовирусного действия. Приведены данные собственных исследований. Изучены распространенность мутаций и их спектр у 36 пациентов, инфицированных 1bподгенотипомВГС с опытом и без опыта лечения ВГС-инфекции. Определен вклад мутаций к ингибиторам NS5A белка вируса у пациентов, получавших лечение препаратами прямого противовирусного действия, не достигших устойчивого вирусологического ответа.

Ключевые слова: вирус гепатита С, ингибиторы белка NS5A, мутации устойчивости, аминокислотные замены.

Введение. До недавнего времени терапия ВГС-инфекции была возможна только с использованием интерферонов. Уровень достижения устойчивого вирусологического ответа вариьровал от 40 до 70 % и зависел от генотипа вируса. В частности, эффективность лечения 1bподгенотипа ВГС доля которого в Республике Беларусь составляет около 60 % [1], не превышала 40–45 %. Помимо низкой эффективности, отмечался достаточно широкий спектр побочных эффектов и противопоказаний, необходимость стационарного лечения. Препараты интерфероновой терапии обладали опосредованным действием на вирус через активацию клеточных генов. В 2011 г. появились новые препараты, действующие непосредственно на разные циклы репликации вируса: ингибиторы протеазы NS3A, белка NS5A и полимеразы NS5B. При выборе схемы и продолжительности лечения необходимо учитывать генетический вариант вируса, стадию фиброза печени, опыт лечения в прошлом. Благодаря применению схем безинтерфероновой терапии, эффективность лечения пациентовс ВГС-инфекций увеличилась практически до 95 %. Однако в популяции могут присутствоватьустойчивые варианты вируса, способные реплицироваться в условиях действия ингибиторов. На фоне этого развивается лекарственная устойчивость, связанная с появлением мутаций в участках генома вируса, кодирующие белки NS3A, NS5A и NS5B. Белок NS5A важен для формирования репликативного комплекса ВГС [2]. Ингибиторы белка NS5A препятствуют формированию комплекса, тем самым останавливают процесс сборки вирусных частиц [3]. Устойчивые варианты вируса могут появляться как у пациентов с опытом лечения, так и без. Также немаловажным фактором, детерминирующим исход лечения, является наличие определенного субтипа ВГС. Известно, что ингибиторы NS5A обладают различным генетическим барьером по отношению к разным субтипам, характеризующим минимальное количество мутаций необходимых ВГС для приобретения устойчивости. Так для ВГС *1b* субтипа он ниже, чем для субтипа *1a* [4]. Определение субтипа и спектра мутаций в участке *NS5A* генома ВГС позволяет более точно и эффективно подбирать схему лечения, чтобы добиться полной элиминации вируса в организме пациента.

Цель работы — определение спектра и распространенности мутаций резистентности 1b подгенотипа ВГС к ингибиторам белка NS5A.

Материалы и методы. В исследование включено 36 образцов плазмы крови пациентов, инфицированных ВГС *1b* субтипа с опытом (n = 33, 91,67 ± 4,60 %) и без опыта лечения (n = 3, 8,33 ± 4,60 %) лекарственными средствами прямого противовирусного действия. Экстракцию нуклеиновых кислот проводили с использованием набора реагентов РИБО-преп производства ФБУН ЦНИИ Эпидемио-

Репозиторий БГМУ

логии и Роспотребнадзора. Выявление РНК ВГС количественным методом проводилось с использованием тест-системы «РеалБест РНК ВГС количественный» производства ЗАО «Вектор-Бест» (РФ). Для проведения реакции обратной транскрипции использовали набор реагентов *RevertAid RT ReverseTranscriptionKit* производства ThermoScientific (США). Амплификацию участка *core/E1* для определения субтипа ВГС и участка *NS5A* генома ВГС проводили методом «гнездовой» *in house* ПЦР согласно методу, изложенному в инструкции по применению [5].

Секвенирование амплифицированных фрагментов осуществляли на автоматическом генетическом анализаторе 3500 (AppliedBiosystems, США). Биоинформационный анализ последовательностей ДНК проводили с помощью программ SeqScape®Software v.3.0, BioEdit v.7.2.5, SeqA6. Для выравнивания генетических последовательностей использовали программу Clustal W. Генетические варианты ВГС определяли путем филогенетического анализа последовательностей с использованием программы PhyML v.3.0 (Phylogeneticmaximumlikelihood), «Mega 6» (деревья с корнем построены методом присоединения соседей — neighbor-joiningmethods). Референс-последовательности для построения филогенетического дерева были экспонированы из международной базы данных GenBank с помощью программы BLAST. Для визуализации построенного филогенетического дерева использовали программу FigTree v.1.4.2. Мутации устойчивости анализировали с помощью онлайн-сервера https://hcv.geno2pheno.org/.

Результаты и их обсуждение. Выполнено исследование образцов сыворотки/плазмы крови, полученных от 36 пациентов, проходивших и не проходивших курс лечения лекарственными средствами прямого противовирусного действия. Распределение по полу было следующим: среди 36 образцов сыворотки/плазмы крови 30 принадлежало пациентам мужского пола (83,33 ± 6,20 %) и 6 — женского пола (16,67 ± 6,20 %). Средний возраст женщин составил 48,65 ± 10,99 лет, средний возраст мужчин — 36,83 ± 10,75 лет. Из г. Минска было получено 24 образца сыворотки/плазмы крови (66,67 ± 7,90 %), из Витебской области — 4 (11,11 ± 5,20 %), из Минской и Могилевской областей — по 3 образца (8,33±4,60 %), из Гомельской — 1 образец (2,78 ± 2,70 %) и 1 образец (2,78 ± 2,70 %) был получен от пациента, проживающего на территории Украины.

Результаты определения вирусной нагрузки показали, что у пациентов она варьировала в пределах от $3{,}1 \cdot 47210^2$ МЕ/мл до $2{,}0 \cdot 10^7$ МЕ/мл. У 25 пациентов вирусная нагрузка находилась в диапазоне от 10^5 до 10^6 МЕ/мл (69,44 ± 7,70 %), у 9 — в пределах $10^2 – 10^4$ МЕ/мл (25,00 ± 7,20 %), и у 2 — выше 10^7 МЕ/мл (5,56±3,80 %).

Среди 33 пациентов, получавших лекарственные средства прямого противовирусного действия, 20 пациентов (60,61 ± 8,50 %) не достигли устойчивого вирусологического ответа, а у 13 пациентов (39,39 ± 8,50 %) через 3–6 месяцев после окончания лечения был отмечен рецидив заболевания. Ингибиторы NS5A белка принимали все пациенты, включенные в выборку, из них 19 (57,58 ± 8,60 %) пациентам был назначен даклатасвир, 14 (42,42 ± 8,60 %) — ледипасвир.

Результаты секвенирования и последующего анализа аминокислотной последовательности участка NS5A белка показали, в ряде образцов были выявлены клинические значимые мутации, которые значительно изменяют чувствительность ВГС. Для расчета применяется показатель IC_{50} или так называемая концентрация полумаксимального ингибирования. IC_{50}– это показательэффективности применения ингибиторов NS5A белка при ингибирующем взаимодействии *in vitro*. Он является количественным индикатором, который показывает, какую концентрацию лекарственного средства необходимо подобрать для подавления репликации на 50 % вируса дикого типа по сравнению с вирусом, содержащим мутации лекарственной устойчивости (ЛУ). Согласно принятой классификации, мутации подразделяются на 3 группы в зависимости от кратности изменения эффективной концентрации лекарственного средства: 1) слабые (IC50 вируса с ЛУ больше в 2–10 раз IC50 дикого варианта вируса); 2) средние (IC50 вируса с ЛУ больше в 11–100 раз IC50 дикого варианта вируса); 3) сильные(IC50 вируса с ЛУ больше в более чем 100 раз IC50 дикого варианта вируса [6]. В настоящее время в белке NS5A для *1b* подгенотипа ВГС выделют несколько мутаций, среди которых можно увидеть замены лейцина на метионин в 31-й позиции (L31M) и тирозина на гистидин в 93-й аминокислотной позиции (Y93H). Именно эти мутации ассоциируются с резистентностью вируса к ингибиторам NS5A белка и значительно снижают чувствительность ВГС к препаратам, входящим в схемы лечения.

В нашем исследовании определение чувствительности ВГС к ингибиторам NS5A белка выполнено путем секвенирования с последующим биоинформационным анализом полученной аминокислотной последовательности. Результаты выявления мутационной изменчивости (образец DA 473) представлены на рисунке 1.

Репозиторий БГМУ

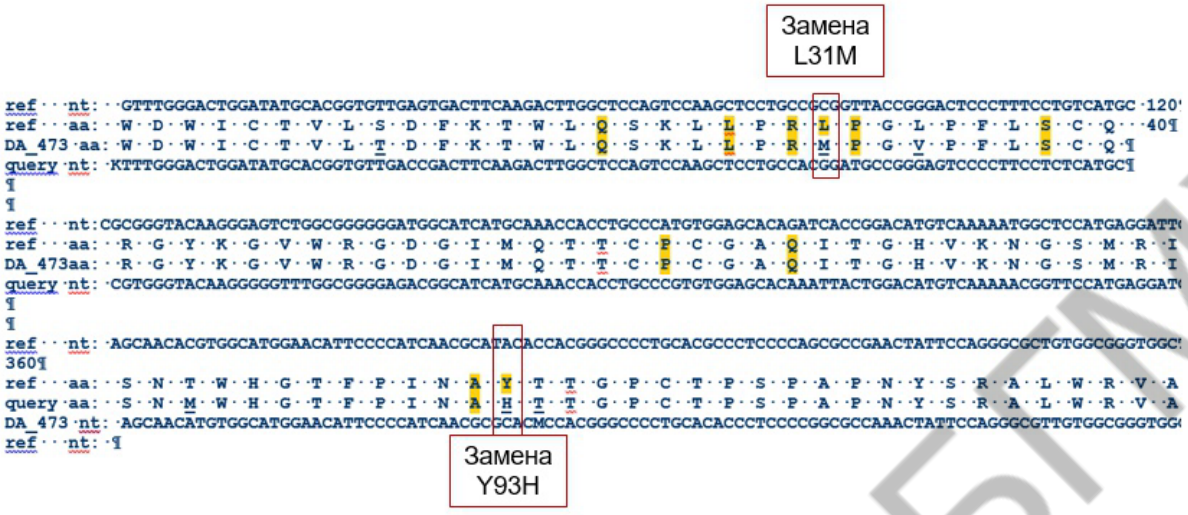

Рисунок 1 — Фрагмент анализа нуклеотидной последовательности образца DA 3473 1b подгенотипа по NS5A участку генома

В целом среди пациентов, которые не достигли устойчивого вирусологического ответа после прохождения курса ЛСППД, клинически значимые мутации были выявлены в 15 случаях (75,00 ± 9,70 %). У 5 (25,00 ± 9,70 %) пациентов мутаций обнаружено не было. В случае рецидива мутации устойчивости были отмечены у 9 пациентов (69,23 ± 12,80 %), в то же время у 4 (30,77 ± 12,80 %) пациентов мутации отсутствовали, несмотря на то что они принимали курс терапии данными лекарственными средствами ранее.

Как показали результаты исследований, достоверно чаще выявлялись ($p < 0{,}002$) мультирезистентные варианты вируса (таблице 1). Так, одновременная замена изолейцина на метионин в 31-й аминокислотной позиции (I31M) и тирозина на гистидин в 93-й аминокислотной позиции Y93H установлены в 8 случаях (25,00 ± 7,70 %). Единичные замены тирозина на гистидин в 93-й аминокислотной позиции Y93H и изолейцина на метионин в 31-й аминокислотной позиции (I31M) были выявлены у 3 (9,38 ± 5,20 %) и 2 (6,25 ± 4,30 %) пациентов соответственно. Аминокислотная замены аргинина на глутамин в позиции 30 (R30Q) в сочетании с заменами Y93H и I31M была выявлена у 5 пациентов (15,63 ± 6,40 %). В единичных случаях обнаружены такие аминокислотные замены, как I31M+P58A, I31M+Y93H+P58H, I31V, I31V+Y93H, Y93H+P58S, Y93H+P58S+Y31V, R30Q+I31M.

Таблица 1 — Варианты аминокислотных замен, выявленных в белке NS5АВГС у ВГС-инфицированных пациентов

№	Аминокислотные замены	Число пациентов с мутациями	
		абс. количество	$M \pm m$, %
1	I31M	2	6,25 ± 4,30
2	I31M+P58A	1	3,13 ± 3,10
3	I31M+Y93H	8	25,00 ± 7,70
4	I31M+Y93H+P58H	1	3,13 ± 3,10
5	I31V	1	3,13 ± 3,10
6	I31V+Y93H	1	3,13 ± 3,10
7	R30Q+I31M+Y93H	5	15,63 ± 6,40
8	Y93H	3	9,38 ± 5,20
9	Y93H+P58S	1	3,13 ± 3,10
10	Y93H+P58S+Y31V	1	3,13 ± 3,10
11	R30Q+I31M	1	3,13 ± 3,10

Появление феномена множественной резистентности приводит к изменениям мишеней NS5Абелка, вследствие чего становится невозможным ингибирование процесса сборки репликатив-

Репозиторий БГМУ

ного комплекса ВГС. Необходимо учесть, что мутации, возникающие на фоне приема одной из лекарственных средств группы, могут влиять на чувствительность и к другим препаратам этой группы. Это явление называется перекрестной резистентностью. Например, появление варианта I31M на фоне приема даклатасвира, вызывает устойчивость у ледипасвиру. Вариант Y93H вызывает высокий уровень устойчивости ко всем ингибиторам белка NS5A кроме пибрентасвира [4].

Анализ последовательностей вируса, полученных из образцов пациентов, впервые начинающих лечение ВГС-инфекции, показа отсутствие клинически значимых мутаций в NS5Aучастке генома ВГС. Это, вероятно, связано с отсутствием давления лекарственных средств на отбор вариантов с лекарственной устойчивостью.

Результаты исследований, выполненных в разных регионах мира, демонстрируют достаточно высокий уровень распространенности основных мутаций 1bподгенотипа ВГС, оказывающих влияние на лечение. Так, анализ нуклеотидных последовательностей, депонированных в международную базу данных GenBank показал, что 58,7 % последовательностей (854/1455) содержали по крайней мере один доминантный вариант лекарственной устойчивости, а самая высокая частота встречаемости таких мутаций была в Азии (74,1 %), Африке (71,9 %), Америке (53,5 %) и Европе (51,4 %)[7]. Если посмотреть на частоту встречаемости отдельных мутаций, то, например, в Италии мутация 93H, относящаяся по классификации к сильным мутациям (со кратностью изменения >100×) была установлена в 10,1 % (n = 455) случаев для 1bподгенотипа вируса [2].

Итак, в мире достаточно высокий уровень распространенности мутаций резистентности, которыеслужат одной из основных причин неудачи терапии ВГС-инфекции. Репликация вируса подавляется не полностью, поэтому формируется пул лекарственно устойчивых вариантов вируса, которые влияют как на выбор схемы лечения, так и его продолжительность.

Заключение. Таким образом, анализ данных, полученных при проведении тестировании лекарственной устойчивости ВГС к лекарственным средствам прямого противовирусного действия, позволил сделать следующие выводы:

1. Разработанный метод позволяет эффективно выявлять мутации лекарственной устойчивости ВГС к ингибиторам NS5A белка.

2. У пациентов без опыта лечения, включенных в исследование, не было выявлено предсуществующих лекарственно значимых мутаций в NS5A участке генома ВГС.

3. У пациентов, которые не достигли устойчивого вирусологического ответа или в случае развития рецидива, неэффективность лечения была связана с формированием множественной лекарственной устойчивости ВГС к препаратам прямого противовирусного действия, которая встречалась в 75,0 % случаев.

4. У пациентов с неэффективностью лечениянепрепаратами прямого противовирусного действия, содержащие препараты ингибиторов NS5A белка, необходимо тестирование на резистентность вируса с целью подбора персонализированной схемы лечения.

Литература

1. Гасич, Е. Л. Генетическое разнообразие вируса гепатита С в Республике Беларусь / Е. Л. Гасич, В. Ф. Еремин // Здравоохранение. — 2016. — № 10. — С. 24–28.

2. Prevalence of Single and Multiple Natural NS3, NS5A and NS5B Resistance-Associated Substitutions in Hepatitis C Virus Genotypes 1–4 in Italy [Electronic resource]. — Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5997636/. — Date of access: 28.10.2020.

3. Tsukiyama-Kohara, K. HepatitisCvirus: viralquasispeciesandgenotypes / K. Tsukiyama-Kohara, M. Kohara // J. Mol. Sci. — 2017. — Vol. 19, № 1. — P: e23. DOI: 10.3390/ijms19010023.P.

4. Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations / S. Nakamoto [et al.] // World J. Gastroenterol. — 2014. — Vol. 20, № 11. — С. 2902–2912.

5. Метод выявления мутаций резистентности 1bподгенотипа вируса гепатита с к лекарственным средствам прямого действия: инструкция по применению № 075-0519: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 22.05.2019 / разраб.: Е. Л. Гасич [и др.]. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2019. — 12 с.

6. Consideration of Viral Resistance for Optimization of Direct Antiviral Therapy of Hepatitis C Virus Genotype 1-Infected Patients / J. Dietz [et al.] // PLOS ONE. — 2015. — Vol. 10, № 8. — P. e0134395.

7. Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): mining the GenBank HCV genome data | Scientific Reports [Electronic resource]. — Mode of access: https://www.nature.com/articles/srep20310. — Date of access: 28.10.2020.

Репозиторий БГМУ

Resistance of hepatitis C virus subgenotype 1B to direct antiviral action drugs in the Republic of Belarus

Kabankova A. N.[1], Gasich E. L.[1], Gudel A. S.[1], Zhavoronok S. V.[2], Eremin S. V.[2], Kononchyk E. S.[1], Golovchak Yu. V.[1]

[1] State Institution «The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology», Minsk, Republic of Belarus;
[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The article is devoted to the study of mutations in the genome of the hepatitis C virus associated with drug resistance to drugs of direct antiviral action. The data of our own research are presented. The prevalence of mutations and their spectrum were studied in 36 patients infected with HCV subgenotype 1b with and without experience in the treatment of HCV infection. The contribution of mutations to inhibitors of the NS5A protein of the virus was determined in patients treated with direct antiviral drugs that did not achieve a sustained virological response.

Keywords: hepatitis C virus, NS5A protein inhibitors, resistance mutations, amino acid substitutions.

Поступила 16.11.2020

Репозиторий БГМУ