

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Останкова Ю. В.¹, Семенов А. В.^{1,2,3}, Тотолян Арег А.^{1,2}

МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ КОЛЬЦЕВОЙ КОВАЛЕНТНО-ЗАМКНУТОЙ ДНК ВГВ В ПУНКЦИОННЫХ БИОПТАТАХ ПЕЧЕНИ

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 197191, Санкт-Петербург, Россия;

² ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И. П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия;

³ ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава РФ, 191015, Санкт-Петербург, Россия

Цель - проанализировать метод количественного определения кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени и оценить его значимость при идентификации HBsAg-негативного вирусного гепатита В.

В работе были использованы образцы биопсийного материала ткани печени 128 больных, проживающих на территории Санкт-Петербурга, в различных регионах РФ, а также в Республике Узбекистан.

Для количественного анализа кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в биопсийном материале на базе методики выявления ккз ДНК ВГВ Pollicino T. и др. был разработан метод, основанный на ПЦР с детекцией в режиме реального времени с использованием TaqMan зондов для целевого фрагмента и для эндогенного референсного гена.

При количественной оценке ккз ДНК ВГВ в ткани печени 18 больных ХВГВ умеренной активности с положительным результатом ПЦР ДНК ВГВ и 16 неактивных носителей HBsAg, содержание ккз ДНК ВГВ достоверно отличалось между группами ($p < 0,034$) и в пересчете на 1 копию гена β -глобина у больных ХВГВ умеренной активности составило $1,71 \pm 1,32$ копий/кл, а у неактивных носителей HBsAg $0,15 \pm 0,14$ копий/кл. В группе больных с выраженным фиброзом и циррозом печени количество ккз ДНК ВГВ в ткани печени у пациентов с ХВГВ составило в среднем $2,5 \pm 0,4$ копии/клетку, у пациентов с ХВГВ + Д в среднем $0,7 \pm 0,25$ копий/клетку, у пациентов с коинфекцией ВГС + ВГВ $0,45 \pm 0,07$ копий/клетку, у пациентов с предварительным диагнозом ХВГС в среднем $0,12 \pm 0,04$ копий/клетку, у пациентов с криптогенным гепатитом $0,2 \pm 0,05$ копий/клетку. Показано значимое отличие между группой больных ХВГВ с выраженным фиброзом и циррозом печени со всеми группами пациентов, кроме группы из 18 больных ХВГВ умеренной активности. Значения t -критерия Стьюдента при сравнении с остальными группами составили соответственно: для пациентов с предварительным диагнозом ХВГС $t = 5,92$ $p < 0,05$ $f = 19$, пациентов с криптогенным гепатитом $t = 5,71$ $p < 0,05$ $f = 18$, с «неактивным носительством HBsAg» $t = 5,55$ $p < 0,05$ $f = 29$, с коинфекциями ВГС + ВГВ $t = 5,05$ $p < 0,05$ $f = 15$ и ХВГВ + Д $t = 3,82$ $p < 0,05$ $f = 17$.

Метод количественной оценки кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени позволяет идентифицировать HBsAg-негативную форму хронического вирусного гепатита В, а также отражает активность репликации вируса, что, в свою очередь, дает возможность предполагать дальнейшее прогрессирование заболевания и оценивать эффективности противовирусной терапии.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит В, скрытый гепатит В, кольцевая ковалентно-замкнутая ДНК ВГВ.

Для цитирования: Останкова Ю. В., Семенов А. В., Тотолян Арег А. Метод количественной оценки кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (9):565-570

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-565-570>

Ostankova Yu. V.¹, Semenov A. V.^{1,2,3}, Totolian Areg A.^{1,2}

THE QUANTITATIVE DETERMINATION METHOD OF COVALENTLY CLOSED CIRCULAR DNA HBV IN PUNCTURE BIOPSY SPECIMENS OF THE LIVER

¹Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197191, Saint Petersburg, Russia;

²Saint-Petersburg State Medical University n.a. acad. I. P. Pavlov, 197022, Saint Petersburg, Russia;

³North-West State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, 191015, Saint Petersburg, Russia

To analyze the method HBV covalent-closed circular DNA quantitative determination in liver puncture biopsies and evaluate its significance in identifying HBsAg-negative viral hepatitis B. In this work, samples of liver tissue biopsy material were used from 128 patients living in St. Petersburg, in various regions of the Russian Federation, as well as in the Republic of Uzbekistan. For quantitative analysis of HBV covalently closed circular DNA in a biopsy material a method was developed based on real-time PCR using TaqMan probes for the target fragment and for the endogenous reference gene, based on the detecting ccc HBV DNA method of Pollicino T. et al.

When quantifying ccc DNA HBV in liver tissue of 18 moderately HBV activity with HBV DNA PCR positive results patients and 16 inactive HBsAg carriers, the ccc DNA HBV content was significantly different between groups ($p < 0.034$) and in terms 1 copy of the β -globin gene among moderate activity HBV patients amounted to 1.71 ± 1.32 copies/cell, and for inactive HBsAg carriers 0.15 ± 0.14 copies/cell. In the group of patients with severe liver fibrosis and cirrhosis, the amount of ccc DNA HBV in liver tissue in

patients with HBV averaged 2.5 ± 0.4 copies/cell, in patients with HBV + D on average 0.7 ± 0.25 copies/cell, in patients with HCV + HBV co-infection 0.45 ± 0.07 copies/cell, in patients with a preliminary diagnosis of chronic hepatitis C hepatitis, on average 0.12 ± 0.04 copies/cell, in patients with cryptogenic hepatitis 0.2 ± 0.05 copies/cell. A significant difference was shown between the group of patients with chronic hepatitis B with marked fibrosis and cirrhosis of the liver with other patients groups, except for the group of 18 moderate activity chronic hepatitis B patients. The values of Student's t-test when compared with other groups were respectively: for patients with a HCV preliminary diagnosis $t=5,92$ $p<0,05$ $f=19$, patients with cryptogenic hepatitis $t=5,71$ $p<0,05$ $f=18$, with «inactive HBsAg carriage» $t=5,55$ $p<0,05$ $f=29$, with HCV + HBV co-infection $t=5,05$ $p<0,05$ $f=15$ and HBV + D co-infection $t=3,82$ $p<0,05$ $f=17$.

The covalently closed circular DNA HBV quantitative assessment method in liver puncture biopsies allows identifying HBsAg-negative chronic viral hepatitis B forms and also reflects the virus replication activity, which, in turn, makes it possible to assume further disease progression and evaluate the antiviral therapy effectiveness.

Key words: chronic hepatitis B, occult hepatitis B, covalently closed circular DNA HBV.

For citation: Ostankova Yu. V., Semenov A. V., Totolian Areg A. The quantitative determination method of covalently closed circular DNA HBV in puncture biopsy specimens of the liver. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (9): 565-570 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-565-570>

For correspondence: Ostankova Yu. V., PhD researcher at the Laboratory of Molecular Immunology; e-mail: shenna1@yandex.ru

Information about authors:

Ostankova Yu. V. <http://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Semenov A. V. <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Totolian Areg A. <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Received 25.05.2019
Accepted 25.06.2019

Введение. Согласно ВОЗ количество инфицированных вирусом гепатита В в мире составляет почти 2 млрд человек, у более чем 240 миллионов из них развивается хронический вирусный гепатит В (ХВГВ) - диффузно-воспалительное заболевание, связанное с персистенцией вируса гепатита В. Ежегодно умирают 686 000 человек, инфицированных вирусом гепатита В, в том числе от цирроза и рака печени в результате осложнения хронической инфекции [1].

Согласно классификации Европейской ассоциации изучения печени (European Association for the Study of the Liver, EASL), естественное течение ХВГВ проходит 5 стадий, при этом для хронической инфекции характерно устойчивое присутствие HBsAg в течение не менее 6 месяцев (при наличии или отсутствии сопутствующего HBeAg) за исключением HBsAg-негативной (скрытой) формы течения заболевания [2].

Особый интерес (и наибольшие трудности) с точки зрения клинической лабораторной диагностики представляет собой пятая стадия развития ХВГВ – скрытый гепатит В (СкГВ). Консенсусной группой экспертов на совещании в г. Таормина (Испания) в 2008 г. дано следующее определение скрытому гепатиту В: это стадия ХВГВ, при которой в ткани печени выявляется ДНК ВГВ при неопределяемом уровне HBsAg в сыворотке периферической крови, вне зависимости от того, выявляется или нет ДНК ВГВ методом ПЦР в периферической крови [3].

В абсолютном большинстве случаев, при СкГВ вирус генетически не отличается от вируса, вызывающего HBsAg-позитивную форму ХГВ [4]. Таким образом, очевидно, что основную роль в иммунопатогенезе СкГВ играет не генетическая структура вируса, а эпигенетическое регулирование, опосредованное иммунным ответом организма. При этом следует отметить, что более часто встречается серопозитивный СкГВ, ассоциированный с образованием антител к основным белкам ВГВ (HBeAg и HBsAg) против core- и S-антигенов, соответствен-

но), однако в 20% случаев обнаружение ДНК ВГВ в ткани печени не сопровождается обнаружением каких-либо маркеров инфицирования ВГВ [5, 6].

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 некодирующих областей ограничивает формирование жизнеспособных мутаций ВГВ. Во-вторых, 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) [7, 8]. Контроль достигается за счет того, что только успешно транскрибируемые и обработанные геномы, т.е. частично двунитевые ДНК упаковываются в секретируемый вирусный капсид.

Репликация ВГВ протекает через стадию обратной транскрипции прегеномной РНК (пгРНК). Основной стадией этого процесса является связывание белка Р со шпилькой на 5'-конце пгРНК, которая функционально является сигналом энкапсидации (ε). 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. Последовательность, содержащая ε, на пгРНК находится и на 5'- и на 3'-конце. Хотя для репликации необходима одна копия, функции второй неизвестны. Кроме энкапсидации пгРНК, ε активно участвует в инициации синтеза вирусной ДНК. 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. Затем комплекс полимеразы с праймером переносится к комплементарной области 3'-DR1. После этого праймер достраивается до полноразмерной минус-цепи ДНК и, благодаря РНКазной активности все того же белка Р, РНК-матрица деградировывает. Остается лишь короткая последовательность на 5'-конце пРНК, размером 15-18 нуклеотидов (DR1), которая переносится к комплементарному участку DR2 для синтеза плюс-цепи ДНК. Рост плюс-цепи ДНК прекращается при достижении 5'-конца минус-цепи и синтез ведется с 3'-конца минус-цепи. Таким образом, образуется кольцевая частично двухцепочечная ДНК. Фактически ккзДНК 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. Линейная форма ДНК ВГВ также участвует в негомологичной рекомбинации с клеточной ДНК, в результате существуют различные формы интегрированной вирусной ДНК [9-11].

Развитие СкГВ обусловлено подавлением внутриядерной транскрипции субгеномных РНК ВГВ с матрицы кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ (ккзДНК), способной становиться матрицей для субгеномных и регеномных копий РНК, на основе которых синтезируется вирусный геном и вирусные белки [12]. Причем подавление это может быть обусловлено целым рядом не до конца изученных факторов, в том числе генетическими особенностями самого вируса и/или его хозяина. При этом ккзДНК в ядре гепатоцита находится в виде минихромосомы, где НК связана с гистоновыми и гистонподобными белками, а транскрипционная активность регулируется по эукариотическому механизму [13] и способна существовать долгое время. В большинстве случаев, репликация вируса и экспрессия генов могут быть подавлены настолько, что вирусная нагрузка в периферической крови больного крайне низка, вплоть до невозможности выявить ДНК ВГВ стандартными методами, но элиминации вируса при подавлении репликации не происходит. Сохранение ккзДНК в виде минихромосомы остается ключевым фактором, ответственным за невозможность полной элиминации вируса и за рецидивы вирусной репликации после прекращения противовирусной терапии [14, 15].

Значительным представляется тот факт, что даже после нескольких лет сероконверсии у реконвалесцентов острого гепатита В, сопровождающейся появлением «маркеров выздоровления» (HBsAg-, HBsIgG+, HBcorIgG+, HBcorIgM-, HBeAg-, HBeAg+, ДНК ВГВ-), методом проточной цитометрии определяется активный ответ CD4+ и CD8+-клеток против антигенов. Возможная причина этого феномена может заключаться в продолжающемся внутрипеченочном синтезе минимальных количеств антигенов ВГВ во время HBsAg-негативной стадии инфекции, которые невозможно определить современными методами лабораторной диагностики, но которых достаточно для поддержания ВГВ-специфического Т-клеточного ответа [16]. Кроме того по некоторым данным высокий уровень ккз ДНК в тканях печени являются фактором риска рецидива ВГВ, несмотря на профилактическую терапию [17].

Целью нашей работы являлся анализ метода количественного определения кольцевой ковалентно-замкнутой

ДНК ВГВ в функциональных биоптатах печени и оценка его значимости при идентификации HBsAg-негативного вирусного гепатита В.

Материал и методы. В работе были использованы образцы биопсийного материала ткани печени 128 больных, проживающих на территории Санкт-Петербурга, в различных регионах РФ, а также в Республике Узбекистан. В обследуемой группе были представлены 16 пациентов с первичным диагнозом «неактивное носительство HBsAg»; 18 пациентов с ХВГВ умеренной активности; 29 больных ХВГВ в фазе иммунного контроля; 26 больных ХВГВ в фазе реактивации; 17 пациентов с ХВГВ с выраженным фиброзом и циррозом печени; 6 пациентов с ХВГВ с сопутствующими инфекциями с выраженным фиброзом и циррозом печени, в том числе 4 пациента с ХВГВ + Д, в крови которых выявлена РНК ВГД и/или антитела к ВГД при отрицательной ДНК ВГВ и 2 пациента с коинфекцией ВГС + ВГВ с выявленными в крови антителами к ВГС и HBsAg; 16 пациентов с выраженным фиброзом и циррозом печени иной этиологии, в том числе 11 больных с первичным диагнозом ХВГС и 5 с гепатитом неясной этиологии.

Выявление кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ проводили согласно методике Т. Pollicino Т. и соавт. [18] методом гнездовой ПЦР с использованием последовательно пар праймеров fp23/rp24 HBV и fp25b/rp26b HBV.

Для количественного анализа ккз ДНК ВГВ в биопсийном материале был разработан метод, основанный на ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием TaqMan зондов для целевого фрагмента и для эндогенного референсного гена. При этом использовали следующий состав амплификационной смеси: 15 пМ каждого олигопраймера, 1,0 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 6,7 мМ MgCl₂, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-НСl, (рН 8,8), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% (v/v) твин 20), глицерин и DMSO в количестве 5% и 10% от конечного объема, соответственно, 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл.

Последовательности использованных олигонуклеотидов приведены в таблице.

Результаты и обсуждение. Хотя современные противовирусные препараты способны качественно подавлять репликацию ВГВ и способствовать снижению риска развития различных осложнений заболевания печени, ведутся активные поиски по разработке терапевтического курса, конечной целью которого будет полная элиминация ккз ДНК ВГВ для предотвращения возможной реактивации вируса [19].

В связи с вышесказанным введение в практическую лабораторную диагностику метода выявления и количественной оценки ккз ДНК ВГВ в функциональных биоптатах печени как способа идентификации заболевания и оценки репликации вируса имеет большое значение для обнаружения СкГВ и для определения стратегии лечения пациентов с ХВГВ.

Для количественной оценки ккз ДНК ВГВ в функциональных биоптатах печени был разработан метод, основанный на ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на базе методики, предложенной Т. Pollicino с соавт. [18] для выявления ккз ДНК ВГВ.

Выделенную из образцов ДНК для удаления одноцепочечных НК и расщепления частично-кольцевой геномной ДНК ВГВ предварительно обрабатывали эн-

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованные для анализа ккз ДНК ВГВ

Праймер	Нуклеотидная последовательность
fr23 HBV	5'- CTGAATCCTGCGGACGACCC-3'
rp24 HBV	5'- CCCAAGGCACAGCTTGGAGG-3'
fr25b HBV	5'- GTCTGTGCCTTCTCATCTGCC-3'
rp26b HBV	5'- AGAGATGATTAGGCAGAGGTG-3'
TaqManHBV	5'- ROX-TGTGCACTTCGCTTCACTCTGC-BHQ2-3'
fr GAPDH	5'- ATCTCCAGGAGTGAGCGAG-3'
rp GAPDH	5'- GACTCCACGACGTACTCAGC-3'
TaqManGAPDH	5'- FAM-TCCAAAATCAAGTGGGGCGATG-BHQ1-3'
fr β-глобин	5'- GTGCATCTGACTCCTGAGGA - 3'
rp β-глобин	5'- GCTTGTACAGTGCAGCTC-3'
TaqManβ-глобин	5'- FAM - AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG-BHQ1-3'
fr β-актин	5'- ACTGTGCCCATCTACGAGG-3'
rp β-актин	5'-CAGGCAGCTCGTAGCTCTT-3'
TaqManβ-актин	5'-FAM-CGGGAAATCGTGCCTGAC- BHQ1-3'

донуклеазой MungBean («Сибэнзим») из расчета 1 ед. фермента на 1 мкг ДНК, согласно протоколу производителя, после чего положительный сигнал регистрировался только от ккз ДНК ВГВ. В ходе работ использовали различные дополнительные компоненты «присадки» для амплификации, в том числе DMSO и глицерин, способствующие увеличению эффективности ПЦР и препятствующие образованию вторичных структур за счет стабилизации Taq ДНК-полимеразы и влияния на температуру отжига праймеров. Введение эмпирически подобранного количества DMSO и глицерина в амплификационную смесь привело к стабильной регистрации сигнала с парой праймеров fr25/rp26 HBV без предварительного этапа гнездовой ПЦР с внешними праймерами. Для оценки специфичности праймеров проводили прямое секвенирование соответствующих фрагментов. Для количественного анализа помимо данной пары праймеров использовали зонд TaqManHBV (см. таблицу). Уровень ккз ДНК ВГВ нормировали на количество ДНК референсного гена. В качестве референсных генов были опробованы β-глобин, β-актин и глициральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GAPDH). Для количественной стандартизации амплификации с олигонуклеотидами для ВГВ использовали образцы ДНК ВГВ, предварительно охарактеризованные с помощью набора «АмплиСенс HBV – Монитор – FRT» для количественной амплификации. Для количественной стандартизации амплификации с праймерами генов β-глобина, β-актина и GAPDH использовали предварительно количественно охарактеризованные лейкоцитарные взвеси, полученные из образцов периферической крови. Для каждого образца реакцию проводили в трех параллелях, далее усредняли значение St для них. Анализ результатов проводился по методу относительного подсчета (метод дельта St) с нормализацией по эндогенному референс-гену. Несмотря на сходные после пересчета количественные результаты при использовании всех референсных генов, в основной работе было решено использовать в качестве эндогенного контроля β-глобин, для которого была показана лучшая эффективность реакции. Для оценки эффективности реакции для каждого гена делали серию разведений образца. Эффективность реакции автоматически рассчитывалась прибором. Во всех случаях при использовании олигонуклеотидов для целевого фрагмента и для β-глобина E=2, что подтверждает

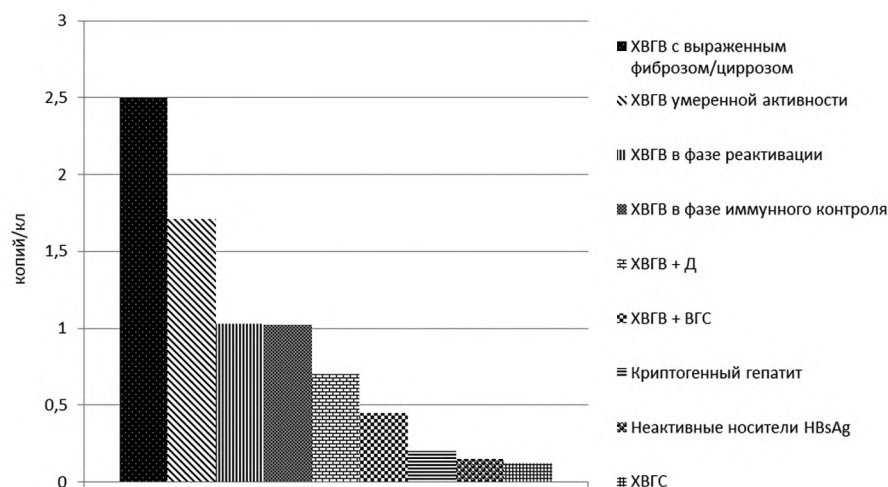
специфичность данных реакций без образования побочных продуктов или димеров праймеров. Отсутствие побочных продуктов также было подтверждено анализом кривых плавления для данных ПЦР продуктов. Подбор условий и выполнение исследования проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad). Разработанный метод обладает высокой специфичностью и позволяет проводить количественную оценку ккз ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени.

При количественной оценке ккз ДНК ВГВ в ткани печени 18 больных ХВГВ умеренной активности с положительным результатом ПЦР ДНК ВГВ и 16 неактивных носителей HBsAg, содержание ккз ДНК ВГВ достоверно отличалось между группами ($p < 0,034$) и в пересчете на 1 копию гена β-глобина у больных ХВГВ умеренной активности составило $1,71 \pm 1,32$

копий/кл, а у неактивных носителей HBsAg $0,15 \pm 0,14$ копий/кл. У пациентов с ХВГВ в фазах иммунного контроля и реактивации содержание ккз ДНК ВГВ составило $1,02 \pm 0,01$ копий/клетку и $1,03 \pm 0,03$ копий/клетку, соответственно, при этом достоверных отличий между фазами естественного течения ХВГВ не обнаружено ($p = 0,72$). В группе больных с выраженным фиброзом и циррозом печени количество ккз ДНК ВГВ в ткани печени у пациентов с ХВГВ составило в среднем $2,5 \pm 0,4$ копии/клетку, у пациентов с ХВГВ + Д в среднем $0,7 \pm 0,25$ копий/клетку, у пациентов с коинфекцией ВГС + ВГВ $0,45 \pm 0,07$ копий/клетку, у пациентов с предварительным диагнозом ХВГС в среднем $0,12 \pm 0,04$ копий/клетку, у пациентов с криптогенным гепатитом $0,2 \pm 0,05$ копии/клетку (см. рисунок).

При расчете t-критерия Стьюдента при сравнении средних величин показано значимое отличие между группой больных ХВГВ с выраженным фиброзом и циррозом печени со всеми группами пациентов, кроме группы из 18 больных ХВГВ умеренной активности. Значения t-критерия Стьюдента при сравнении с остальными группами составили соответственно: для пациентов с предварительным диагнозом ХВГС $t = 5,92$ $p < 0,05$ $f = 19$, пациентов с криптогенным гепатитом $t = 5,71$ $p < 0,05$ $f = 18$, с «неактивным носительством HBsAg» $t = 5,55$ $p < 0,05$ $f = 29$, с коинфекциями ВГС + ВГВ $t = 5,05$ $p < 0,05$ $f = 15$ и ХВГВ + Д $t = 3,82$ $p < 0,05$ $f = 17$.

Среди пациентов, обследованных на уровень ккз ДНК ВГВ в печени, были выбраны четыре группы больных (пациенты с ХВГВ умеренной активности, больные с «неактивным носительством HBsAg», больные в ХВГВ в фазе иммунного контроля и фазе реактивации), у которых проводили количественную оценку HBsAg и ДНК ВГВ в периферической крови. У «неактивных носителей HBsAg» уровень HBsAg был, как и ожидалось, наиболее низким (940 ± 259 МЕ/мл, $p < 0,05$), достоверно отличающимся от других групп по возрастной: ХВГВ умеренной активности, ХВГВ в фазе иммунного контроля и ХВГВ в фазе реактивации - 2559 ± 982 МЕ/мл, 6117 ± 2562 МЕ/мл, 35979 ± 6177 МЕ/мл, соответственно. При измерении вирусной нагрузки результаты были схожими – то есть 540 ± 230 МЕ/мл у больных ХВГВ умеренной активности, 4171 ± 2330 МЕ/мл у больных в фазе иммунного контроля и 1936190 ± 873741 МЕ/мл у больных в фазе реактивации. Вирусная нагрузка, состав-



Количественная оценка содержания кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени.

вившая в среднем 540 ± 230 МЕ/мл у пациентов с ХВГВ умеренной активности при значительно более высоком уровне у больных с фиброзом и циррозом печени и при отсутствии ДНК ВГВ у неактивных носителей с низким уровнем HBsAg в крови, согласуется с данными, указывающими на тесную зависимость между уровнями HBsAg и ДНК HBV, предполагающую высокую виремия у пациентов с высоким уровнем HBsAg. Несмотря на очевидную тенденцию отражения различия в степени инфицированности гепатоцитов ВГВ в количественном содержании HBsAg и ДНК ВГВ в периферической крови, только для больных в фазе иммунного контроля показана прямая корреляция между количественным содержанием HBsAg в сыворотке крови и уровнем ккз ДНК ВГВ (количество копий на клетку) в ткани печени ($r=0,53$, $p=0,03$), а также репликативной активностью ДНК ВГВ ($r=0,79$, $p=0,0001$) [20].

Корреляция высоких уровней HBsAg и ДНК ВГВ на ранних стадиях ХВГВ, а также диссоциация после сероконверсии HBeAg, свидетельствует о различии элементов управления, отвечающих за репликацию ВГВ и за продукцию HBsAg. Следует отметить, что ранее были показаны различия между уровнем ккз ДНК ВГВ в клетках печени у больных в фазе иммунной толерантности и фазе иммунного клиренса [21], однако при низком содержании ккз ДНК ВГВ в клетках печени должен понижаться синтез специфических вирусных белков, что совпадает с полученными результатами по количественному определению HBsAg и соответствует данным из литературных источников. Отсутствие достоверной корреляции между уровнем ккз ДНК ВГВ в тканях печени и морфологическими характеристиками ХВГВ может быть связано с малым объемом выборки, тем не менее, значительно более высокий уровень содержания ккз ДНК ВГВ в гепатоцитах у больных с выраженным фиброзом и циррозом печени по сравнению с больными в фазах иммунного контроля и реактивации также может служить подтверждением значимости оценки репликативной активности в гепатоцитах для оценки развития патологий печени.

Для четырех изолятов (два HBsAg-положительных изолята из группы пациентов с ХВГВ с выраженным фиброзом/циррозом и группы с неактивным носитель-

ством HBsAg, а также два HBsAg-негативных из группы с криптогенным гепатитом и с диагнозом ХВГС) провели секвенирование полных геномов вируса. Все четыре изолята относились к ВГВ субгенотипа D2, при этом мы не выявили каких-либо мутаций вакцинного избегания, мутаций лекарственной устойчивости или иных, которые могли бы стать причиной низкой репликативной активности вируса. Нуклеотидные последовательности полных геномов данных изолятов ВГВ депонированы в международную базу данных GenBank под номерами MK956106-MK956109.

По всей видимости, полученные нами и другими исследователями данные означают, что на уровень ккз ДНК ВГВ существенное влияние оказывает не столько сам вирус в зависимости от его генетических особенностей, сколько различные факторы хозяина [22-24], а отсутствие корреляции соответствующих показателей у больных ХВГВ в фазе реактивации может являться следствием снижения иммунной резистентности [12]. Например, на активность репликации и регуляцию транскрипции ккз ДНК ВГВ могут оказывать различные факторы транскрипции, корепрессоры, коактиваторы, модифицирующие хроматин ферменты клетки хозяина, а также может влиять положение нуклеосом и модификация гистонов, связанных с минихромосомами, которые образуют молекулы ккз ДНК ВГВ в ядрах инфицированных гепатоцитов [25-27]. Так, сообщают об участии в биогенезе ккз ДНК ВГВ фактора репарации тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы-2 [28]. Еще одной причиной может быть такой эпигенетический фактор как метилирование. Недавние исследования показали, что три главных островка CpG, которые содержит ккз ДНК ВГВ подвергаются метилированию в различной степени: островок I CpG метилируется редко, метилирование островка II CpG уменьшает транскрипционную активность ккз ДНК, и в целом метилирование островков II и III связано с низкой вирусной нагрузкой [29-31].

Заключение. Метод количественной оценки кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени позволяет идентифицировать HBsAg-негативную форму хронического вирусного гепатита В, а также отражает активность репликации вируса, что, в

свою очередь, дает возможность предполагать дальнейшее прогрессирование заболевания и оценивать эффективности антивирусной терапии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-14, 16-19, 21-23, 25-30
см. REFERENCES)

6. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Буркитбаев Ж.Л., Савчук Т.Н., Тотолян Арег А. Результаты генотипирования вируса гепатита В у HBsAg-негативных доноров крови в г. Астана, Казахстан. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(4): 383-92.
15. Цинзерлинг В.А., Эсауленко Е.В., Карев В.Е., Бубочкин А.Б., Сухорук А.А., Шибаева Е.О. Клинико-морфологические сопоставления при оккультном гепатите В. *Архив патологии*. 2017; 79(6): 8-13.
20. Габдрахманов И.А., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Козлов К.В., Жданов К.В., Гусев Д.А. и др. Взаимосвязи вирусологических и морфологических показателей в фазах иммунного контроля и реактивации у больных хроническим гепатитом В. *Журнал инфектологии*. 2015; 7(4): 37-43.
24. Бацких С.Н., Винницкая Е.В., Сбикина Е.С., Борунова Ж.В., Филиппов С.А., Сандлер Ю.Г. Латентная форма гепатита В у больной с циррозом печени и первичным билиарным холангитом. *Доктор.Ру*. 2018; 7 (151): 30-4.
31. Костюшев Д.С., Зуева А.П., Брезгин С.А., Липатников А.Д., Волчкова Е.В., Малеев В.В. и др. Роль днк-метилтрансфераз в жизненном цикле вируса гепатита В и патогенезе хронического гепатита В. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(1): 19-29.

REFERENCES

1. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. *Lancet*. 2015; 385(9963): 117–71.
2. Gish R.G., Given B.D., Lai C.L., Locarnini S.A., Lau J.Y., Lewis D.L. Chronic hepatitis B: virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. *Antiviral research*. 2015; 121: 47-58.
3. Raimondo G., Allain J. P., Brunetto M. R., Buendia M. A., Chen D. S., Colombo M. et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol*. 2008; 49: 652–7.
4. Pollicino T., Raffa G., Costantino L., Lisa A., Campello C., Squadrito G. et al. Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2007; 45: 277–85.
5. Torbenson M., Thomas D.L. Occult hepatitis B. *Lancet Infect. Dis*. 2002; 2: 479–86.
6. Ostanokva Yu. V., Semenov A. V., Burkitbayev Z.K., Savchuk T. N., Totolian Areg A. Results of genotyping hepatitis virus B in HBsAg-negative blood donors in Astana, Kazakhstan. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017; 7(4): 383-92. (in Russian)
7. Buti M., Rodriguez-Frias F., Jardi R., Esteban R. Hepatitis B virus genome variability and disease progression: the impact of pre-core mutants and HBV genotypes. *J. Clin. Virol*. 2005; 34(1): S79–S82.
8. Lin C.-L., Kao J.-H. Hepatitis B Virus Genotypes and Variants. Cold Spring Harb. *Perspect. Med*. 2015; 5(5): a021436–a021436.
9. Cullen B.R. Nuclear RNA export pathways. *Mol. Cell. Biol*. 2000; 20(12): 4181–7.
10. Huang Z.M., Yen T. S. Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Mol. Cell. Biol*. 1995; 15(7): 3864–9.
11. Smith G.J., Donello J. E., Lück R., Steger G., Hope T. J. The hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element contains two conserved RNA stem-loops which are required for function. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26(21): 4818–27.
12. Guo J.T., Guo H. Metabolism and function of hepatitis B virus cccDNA: Implications for the development of cccDNA-targeting antiviral therapeutics. *Antiviral research*. 2015; 122: 91–100.
13. Raffa G., Maimone S., Cargnel A., Santantonio T., Antonucci G., Massari M. et al. Analysis of occult hepatitis B virus infection in

- liver tissue of HIV patients with chronic hepatitis C. *AIDS*. 2007; 21: 2171–5.
14. Dandri M., Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut*. 2012; 61(1): i6–i17.
15. Tsinslerling V.A., Esaulenko E.V., Karev V.E., Bubochkin A.B., Sukhoruk A.A., Shibaeva E.O. Clinical and morphological correlations in occult hepatitis B. *Arkhiv patologii*. 2017; 79(6): 8-13. (in Russian)
16. Penna A., Artini M., Cavalli A., Levrero M., Bertolotti A., Pilli M. et al. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J. Clin. Invest*. 1996; 98: 1185–94.
17. Song G.W., Ahn C.S., Lee S.G., Hwang S., Kim K.H., Moon D.B. et al. Correlation between risk of hepatitis B virus recurrence and tissue expression of covalently closed circular DNA in living donor liver transplant recipients treated with high-dose hepatitis B immunoglobulin. *Transplant Proc*. 2014; 46(10): 3548-53.
18. Pollicino T., Squadrito G., Cerenzia G., Cacciola I., Raffa G., Craxi A. et al. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology*. 2004; 126(1): 102-10.
19. Gane E.J. Future anti-HBV strategies. *Liver Int*. 2017; 37 (Sup.1): 40-4.
20. Gabdrakhmanov I.A., Semenov A.V., Ostanokva Y.V., Kozlov K.V., Zhdanov K.V., Gusev D.A., Sukachev V.S., Shakhmanov D.M., Zhabrov S.S., Peremyshlenko A.S., Bulankov Y.I., Ivanov A.M., Totolian A.A. Virological and morphological relationships in the phases of the immune control and reactivation in patients with chronic hepatitis B. *Zhurnal infektologii*. 2015;7(4): 37-43. (in Russian)
21. Li W., Zhao J., Zou Z., Liu Y., Li B., Sun Y. et al. Analysis of hepatitis B virus intrahepatic covalently closed circular DNA and serum viral markers in treatment-naive patients with acute and chronic HBV infection. *PLoS One*. 2014; 9(2): e89046.
22. Levrero M., Pollicino T., Petersen J., Belloni L., Raimondo G., Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J. Hepatol*. 2009; 51: 581–92.
23. Wang Q., Fiel M.I., Luan W., Blank S., Kadri H., Kim K.W. et al. Impact of intrahepatic hepatitis B DNA and covalently closed circular DNA on survival after hepatectomy in HBV-associated hepatocellular carcinoma patients. *Ann. Surg. Oncol*. 2013; 20(12): 3761-70.
24. Batskikh S. N., Vinnitskaya E. V., Sbikina E. S., Borunova Zh. V., Filippov S. A., Sandler Y. G. Occult Hepatitis B in patients with hepatic cirrhosis and primary biliary cholangitis. *Doctor.Ru*. 2018; 7 (151): 30-4. (in Russian)
25. Liu F., Campagna M., Qi Y., Zhao X., Guo F., Xu C. et al. Alpha-interferon suppresses hepadnavirus transcription by altering epigenetic modification of cccDNA minichromosomes. *PLoS pathogens*. 2013; 9(9): 3613.
26. Pollicino T., Belloni L., Raffa G., Pediconi N., Squadrito G., Raimondo G. et al. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology*. 2006; 130(3): 823–37.
27. Shi L., Li S., Shen F., Li H., Qian S., Lee D.H. et al. Characterization of nucleosome positioning in hepadnaviral covalently closed circular DNA minichromosomes. *Journal of virology*. 2012; 86(18): 10059–69.
28. Königer C., Wingert I., Marsmann M., Rösler C., Beck J., Nassal M. Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(40): E4244–53.
29. Kim J.W., Lee S.H., Park Y.S., Hwang J.H., Jeong S.H., Kim N. et al. Replicative activity of hepatitis B virus is negatively associated with methylation of covalently closed circular DNA in advanced hepatitis B virus infection. *Intervirology*. 2011; 54(6): 316–25.
30. Zhang Y., Li C., Zhang Y., Zhu H., Kang Y., Liu H. et al. Comparative analysis of CpG islands among BFB genotypes. *PLoS one*. 2013; 8(2): 56711.
31. Kostyushev D. S., Zueva A.P., Brezgin S.A., Lipatnikov A.D., Volchkova E.V., Maleyev V.V., Chulanov V.P. The role of DNA-methyltransferases in the life cycle of hepatitis B virus and pathogenesis of chronic hepatitis B. *Voprosy virusologii*. 2018; 63(1): 19-29. (in Russian)

Поступила 25.05.19

Принята к печати 25.06.19