

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Останкова Ю. В.¹, Семёнов А. В.^{1,2,3}, Зуева Е.Б.¹, Ногойбаева К.А.⁴, Касымбекова К.Т.⁴, Тобокалова С.Т.⁴, Тотолян Арег А.^{1,2}

РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МУТАЦИЙ ВИРУСА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ В

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

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

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

⁴Киргизский государственный медицинский институт переподготовки и повышения квалификации, 720040, Бишкек, Кыргызская Республика

Проанализирована распространённость клинически значимых мутаций вируса у больных хроническим вирусным гепатитом В из Кыргызской Республики. Использованы образцы плазмы крови 64 больных с верифицированным хроническим вирусным гепатитом В, полученные от коренных жителей Кыргызстана. Проведена асимметричная ПЦР с протяжёнными олигонуклеотидами и дальнейшим использованием продукта амплификации первой реакции в новой ПЦР с одной из пар внутренних (гнездовых) перекрывающихся праймеров, совместно фланкирующих полный геном ВГВ, с последующим секвенированием. На основании филогенетического анализа 64 изолятов ВГВ, полученных от пациентов из Кыргызской Республики показано, что в обследованной группе присутствует только вирус генотипа D, преобладал ВГВ субгенотипа D₁ (68,75%) по сравнению с ВГВ субгенотипа D₂ (18,75%) и субгенотипа D₃ (12,5%). Для всех субгенотипов очевидны несколько независимых источников инфицирования, выделяются субкластеры, включающие изоляты из Кыргызстана, Казахстана, Узбекистана, субкластеры, включающие изоляты только из Кыргызстана, имеющие меньшее сходство с ранее депонированными в международную базу данных изолятами, что, вероятно, свидетельствует о независимой гомологичной эволюции ВГВ в регионе.

Клинически значимые мутации выявлены у 26,5% пациентов. В том числе 12,5% с escape-мутациями, препятствующими выявлению вируса и/или позволяющими вирусу реплицироваться, несмотря на вакцину (122K, 128V, 133I, 134N). Ещё 12,5% изолятов характеризуются мутациями, независимо ассоциированными с развитием цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы, в том числе делециями протяжённостью 21, 24, 27 нуклеотидов в Pre-S2 регионе и мутацией S11F в PreCore регионе. В одном случае обнаружены необычные мутации 236S и 250P в позициях, описанных как сайты лекарственной устойчивости P-области, связанные с развитием резистентности к адефовиру, тенофовиру, энтекавиру.

Анализ генетической структуры вируса гепатита В, раннее выявление мутаций вируса у больных ХВГВ могут способствовать правильному выбору стратегии вакцинации, противовирусной и иммуносупрессивной терапии, прогнозированию клинического течения и прогрессирования заболевания.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит В; мутации лекарственной устойчивости; мутации вакцинного бегства; делеции Pre-S; прогностические маркеры; гепатоцеллюлярная карцинома.

Для цитирования: Останкова Ю. В., Семёнов А. В., Зуева Е. Б., Ногойбаева К. А., Касымбекова К. Т., Тобокалова С. Т., Тотолян Арег А. Распространённость клинически значимых мутаций вируса у больных хроническим вирусным гепатитом В. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (1): 61-66 DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-61-66>

Ostankova Yu. V.¹, Semenov A. V.^{1,2,3}, Zueva E.B.¹, Nogoybaeva K.A.⁴, Kasymbekova K.T.⁴, Tobokalova S.T.⁴, Totolian Areg A.^{1,2}

THE PREVALENCE CLINICALLY SIGNIFICANT VIRUS MUTATIONS AMONG PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS B

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;

⁴Kyrgyz State Medical Institute of Retraining and Skill, 720040, Bishkek, Kyrgyz Republic

The prevalence of clinically significant virus mutations in patients with chronic viral hepatitis B from the Kyrgyz Republic was analyzed. Blood plasma samples of 64 patients with verified chronic viral hepatitis B obtained from Kyrgyzstan indigenous people were used in the work. Asymmetric PCR was carried out with extended oligonucleotides and the first reaction amplification product was further used in a new PCR with one of the nested pairs overlapping primers that flanked the entire HBV genome together, followed by sequencing. Based on the phylogenetic analysis of 64 HBV isolates obtained from patients from the Kyrgyz Republic, it was shown that only the genotype D virus was present in the examined group, the HBV subgenotype D1 (68.75%) prevailed compared with the HBV subgenotype D2 (18.75%) and subgenotype D3 (12.5%). For all subgenotypes, several independent infection sources are obvious, subclusters that include isolates from Kyrgyzstan, Kazakhstan and Uzbekistan are distinguished, as well as subclusters that include isolates only from Kyrgyzstan, which are less similar to isolates previously deposited in the international database, which probably indicates an independent HBV homologous evolution in the region.

Clinically significant mutations were identified in 26.5% of patients. Including 12.5% with escape mutations that prevent the virus detection and / or allow the virus to replicate despite the vaccine (122K, 128V, 133I, 134N). Another 12.5% of the isolates are characterized by mutations that are independently associated with the liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma development,

including 21, 24, 27 nucleotides deletions in the Pre-S2 region and the S11F mutation in the PreCore region. In one case, unusual 236S and 250P mutations were found in the positions described as drug resistance sites of the P region associated with the resistance development to adefovir, tenofovir, and entecavir.

The hepatitis B virus genetic structure analysis, early virus mutations detection in patients with chronic hepatitis B virus can help to choose the right vaccination strategy, antiviral and immunosuppressive therapy, as well as predict the clinical course and disease progression.

Key words: chronic hepatitis B; drug resistance mutations; vaccine escape mutations; Pre-S deletions; prognostic markers; hepatocellular carcinoma.

For citation: Ostankova Yu. V., Semenov A. V., Zueva E.B., Nogoybaeva K.A., Kasymbekova K.T., Tobokalova S.T., Totolian Areg A. The prevalence clinically significant virus mutations among patients with chronic viral hepatitis B. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (1): 61-66 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-61-66>

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>

Zueva E. B. <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>

Kasymbekova K. T. <https://orcid.org/0000-0002-4383-350X>

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

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 06.12.2019

Accepted 16.12.2019

Введение. Седьмой по значимости причиной смертности в мире являются гепатотропные вирусы, способные вызывать как острые, так и хронические заболевания [1]. Более 47% смертей, причиной которых становятся вирусные гепатиты, связаны с вирусом гепатита В (ВГВ) [2]. Более чем у 240 млн человек, инфицированных вирусом гепатита В развивается хронический вирусный гепатит В (ХВГВ), представляющий собой диффузно-воспалительное заболевание, связанное с персистенцией ВГВ [3].

Клинические проявления ХВГВ многообразны и зависят от биологических свойств вируса и его взаимодействия с иммунной системой хозяина. Длительность заболевания, уровень вирусной нагрузки и его изменения с течением времени, мутации вируса, экологические и генетические факторы, этническая принадлежность и пол пациента могут влиять на течение заболевания [4].

Генетическая эволюция ВГВ определяется двумя важными особенностями жизненного цикла вируса. Во-первых, высокая генетическая стабильность ВГВ достигается за счёт чрезвычайно эффективного использования короткого генома. Наличие перекрывающихся рамок считывания, многочисленных регуляторных, репликативных, морфогенетических элементов, 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), которые могут появляться во всех четырёх генах из-за спонтанных ошибок вирусной полимеразы или вследствие давления со стороны иммунной системы хозяина, или из-за экзогенных факторов, включая иммунизацию или лечение противовирусными препаратами [5, 6].

Способы лечения ВГВ продемонстрировали способность задерживать прогрессирование заболевания при использовании препаратов прямого противовирусного действия, однако многие пациенты не могут достичь цели лечения, что связано с мутациями лекарственной

устойчивостью как после длительного применения терапии, так и у терапевтически-наивных больных за счёт инфицирования фармакорезистентными штаммами.

Ряд мутаций в регионе Pre-S1/Pre-S2/S ведут к ускользанию вируса от нейтрализующих антител и способствуют инфицированию вакцинированных людей [7]. В том числе такие мутации, как D144A, Q129R, G145R, отвечающие не только за развитие лекарственной устойчивости вируса, но и способные снижать связывание с анти-НВ_s при вакцинации против гепатита В, минуя нейтрализующую активность этих антител. Происходит это за счёт изменений аминокислотных остатков в области детерминанты а поверхностного антигена способных определять конформационные изменения, которые могут позволить репликацию мутантных вирусов у вакцинированных людей (мутации вакцинного ускользания). Такие вирусы могут быть не обнаружены с помощью современных диагностических тест-систем, что представляет потенциальную угрозу безопасности гемотрансфузий. Выявляют варианты ВГВ с мутациями вакцинного ускользания по всей нуклеотидной последовательности детерминанты, потенциально способные уклониться от нейтрализующих анти-НВ_s [8]. Мутации вакцинного ускользания могут возникать и без отбора, вызванного вакцинацией или терапией анти-ВГВ иммуноглобулином, а только за счёт факторов хозяина. В мире с возрастающей обеспокоенностью обсуждают растущую распространённость ВГВ с мутациями вакцинного ускользания с момента запуска программ универсальной вакцинации и возможность того, что эти мутантные вирусы могут использовать преимущества вируса дикого типа в преодолении иммунитета вакцинированных людей. Вызывает серьёзную обеспокоенность: заменят ли они вирус дикого типа и помешают ли программам вакцинации.

Согласно данным литературы, некоторые мутации ВГВ могут служить прогностическими маркерами развития гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), являющейся второй ведущей причиной смертности от рака и одной из самых распространённых злокачественных

опухолей, особенно широко представленной в некоторых районах Азии и Африки [9]. Повышенный риск развития ГЦК показан у носителей ВГВ с мутациями региона PreCore (PC) G1896A и промотора базального ядра A1762T, G1764A, при наличии делеций в Pre-S области вируса [10].

Вышеуказанное свидетельствует о недостаточности выявления и генотипирования ВГВ, необходимо внедрять в рутинную лабораторную диагностику идентификацию различных мутаций вируса, способных служить прогностическими маркерами развития заболевания.

Цель работы - выявление клинически значимых мутаций вируса у больных ХВГВ из Киргизской Республики.

Материал и методы. Исследование одобрено комитетом по этике ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург). Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. В работе использована плазма крови 64 больных с верифицированным ХВГВ, полученная от коренных жителей Киргизской Республики.

Экстракцию ДНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции. Для получения нуклеотидной последовательности полных геномов вируса проводили асимметричную ПЦР с использованием протяжённых олигонуклеотидов, на втором этапе проводили ПЦР с использованием продукта амплификации первой реакции и одной из пар внутренних (гнездовых) перекрывающихся праймеров, совместно фланкирующих полный геном ВГВ, как показано ранее [11]. Для ПЦР использован следующий состав амплификационной смеси: 3-30 пМ каждого олигопраймера, 0,6-1,0 мМ каждого дезоксинуклеотида, 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), 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объёма 30 мкл. Амплификацию в общем виде проводили при следующих условиях: после денатурации при 95°С в течение 5 мин устанавливали 30-40 циклов амплификации в режиме: 95°С – 20-40 с, 55-65°С – 20-30 с, 72°С – 30-90 с; финальная элонгация при 72°С – 5 мин. Качество ПЦР определяли визуально в 2% агарозном геле (120 В, 40 мин; 1хTBE), окрашенном бромистым этидием.

Секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США) на прямых и обратных праймерах в трёх повторах. Анализ продуктов секвенирующей реакции проводили с использованием генетического анализатора ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США).

Первичный анализ полученных в ходе секвенирования фрагментов осуществлён с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проведено в программе MEGA 7.0, используя алгоритм ClustalW [12]. Для построения филогенетических деревьев и последующего филогенетического анализа рассматривали расстояния между последовательностями методом присоединения соседей, позволяющим оптимизацию дерева в соответствии с критерием «сбалансированной минимальной эволюции» (Neighbor-joining), для оценки достоверности по-

строенных деревьев проведён бутстреп (bootstrap) для 1000 повторов.

Для выявления возможной рекомбинации изолятов выполнен анализ с использованием инструмента генотипирования NCBI [13] и программного обеспечения RDP4 [14].

Результаты и обсуждение. Для всех исследуемых образцов получены нуклеотидные последовательности полного генома вируса удовлетворительного качества, пригодные для дальнейшего анализа. Для всех образцов определены генотип и субгенотип вируса.

На основании филогенетического анализа 64 изолятов ВГВ, полученных от пациентов из Киргизской Республики показано, что в обследованной группе присутствует только вирус генотипа D. При этом преобладал ВГВ субгенотипа D₁ (68,75%) по сравнению с ВГВ субгенотипа D₂ (18,75%) и субгенотипа D₃ (12,5%). При анализе нуклеотидных последовательностей полных геномов ВГВ на рекомбинации с использованием инструментов генотипирования NCBI и программы RDP4 рекомбинации не выявлены. При анализе последовательностей изолятов процент нуклеотидной идентичности субгенотипов D₁, D₂, D₃ составил 98,4±1,06%, 99,2±0,4%, 98,3±0,7%, соответственно. Филогенетические отношения между исследованными изолятами и референсными последовательностями представлены на рис. 1.

Уровень заболеваемости ХВГВ в Кыргызстане составляет 23 на 100 тыс. человек, наблюдается рост заболеваемости ВГВ (до 71 на 100 тыс. человек в Иссык-Кульской области) [15]. По другим данным распространённость ВГВ в Киргизской Республике составляет 10,3% [16]. Отмечается рост заболеваемости ХВГВ, доминирующими путями передачи ВГВ в стране являются парентеральный и бытовой (60,9%) с частым формированием семейных очагов (23,8%) [17]. Существует несколько факторов, способствующих формированию семейных очагов: очень низкий уровень вакцинации против ВГВ среди взрослого населения, отсутствие ревакцинации подростков и должного внимания к носителям ВГВ. За счёт этого от 2 до 6 членов семьи могут быть вовлечены в инфекционный процесс в семейном очаге, что требует углублённого обследования жителей республики для раннего выявления пациентов с ХВГВ и усиления профилактических мероприятий [18]. По всей видимости, это является одной из причин широкой распространённости заболеваемости ХВГВ среди детей (причём распространённость коинфекции ХВГВ + ХВГД выше, чем ХВГВ), несмотря на то, что дети до 15 лет охвачены вакцинацией против ВГВ [19]. Хотя оценка распространённости ХВГВ в Киргизской Республике представлена в данных литературы, информации о распределении генотипов/субгенотипов и характеристике генетической структуры вируса в регионе найти не удалось.

Обращает внимание сравнительно высокая для данного географического региона встречаемость ВГВ субгенотипа D₂. В более раннем исследовании мы сообщали о следующем распределении субгенотипов ВГВ среди жителей Киргизской республики: ВГВ D₁ 73,34%, ВГВ D₂ 3,33%, D₃ 23,33% [20]. В настоящей работе очевидно сравнительное увеличение доли субгенотипа D₂ и уменьшение доли D₃, однако достоверных отличий не выявлено (p=0,07). При этом среди штаммов ВГВ D₂ выделяется субкластер (KYR33-KYR35, KYR38-KYR43) с нуклеотидной идентичностью 99,4±0,5%, изоляты

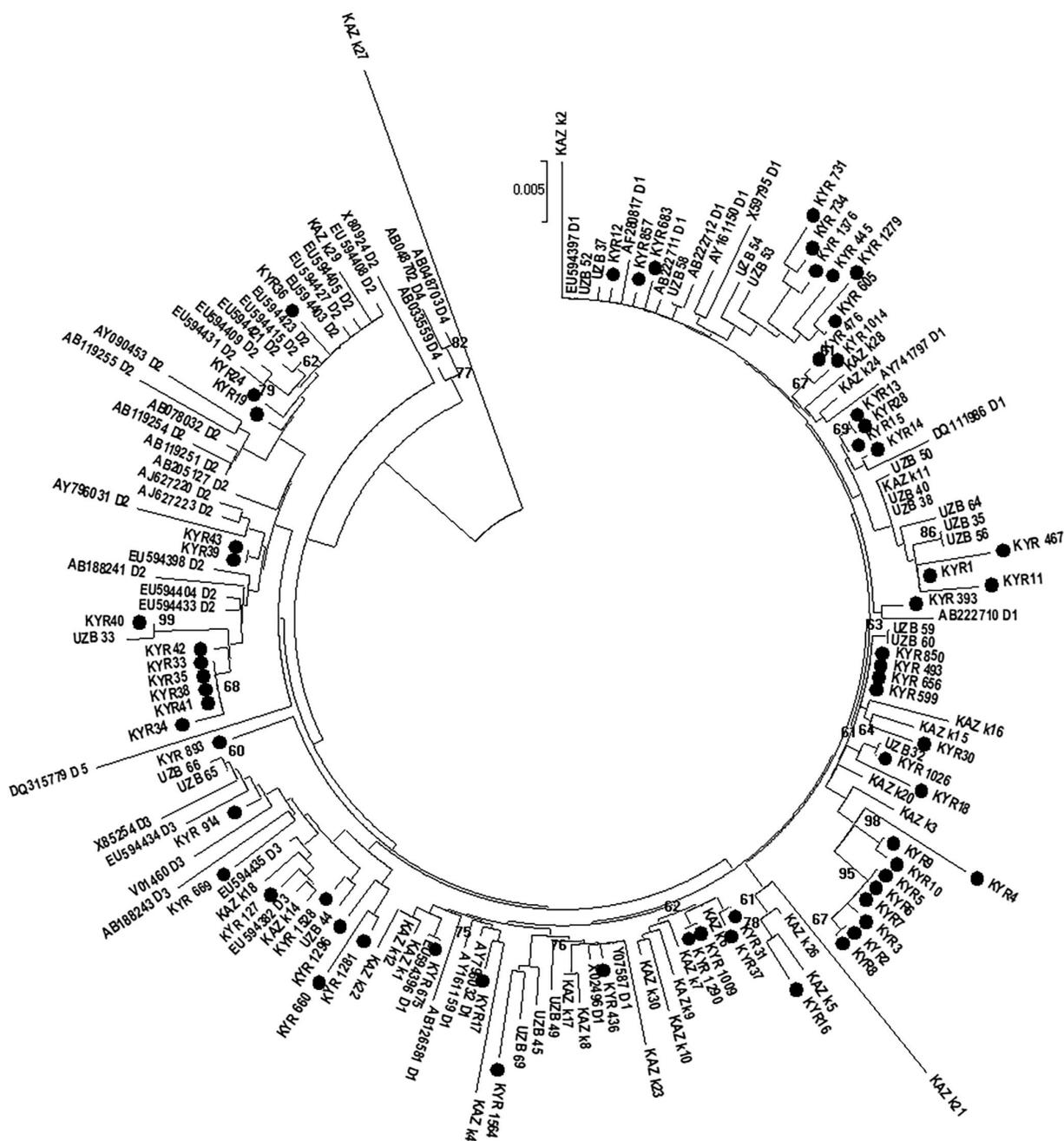


Рис. 1. Филогенетическое дерево исследованных изолятов ВГВ, выделенных от пациентов с ХВГВ, проживающих на территории Киргизской Республики, в сравнении со штаммами ВГВ, описанными нами ранее в странах Средней Азии, а также с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями генотипа D. Референсные последовательности обозначены кодами GenBank с указанием субгенотипа. Кружками обозначены образцы, исследованные в настоящей работе. Даны значения bootstrap $\geq 60\%$.

которого имеют высокое сходство с геновариантами ВГВ, широко распространёнными по всей территории РФ. Главную роль в кластеризации играет не столько географическая общность, сколько пути передачи инфекции, особенно когда речь идёт о распространении нехарактерного для региона геноварианта вируса после внедрения. По всей видимости, в данном случае имел место однократный завоз распространившегося позднее штамма.

Ветвь, соответствующая ВГВ D₃ разделилась на под-кластеры. Предполагаем, что один из них связан с заражением посредством употребления инъекционных наркотических веществ. Пациенты из данной группы социально обеспеченные женщины, что, казалось бы, противоречит предположению о заражении в среде потребителей инъекционных наркотиков. По некоторым данным в настоящее время возраст большего числа употребляющих наркотики в Кыргызстане составляет около

HBV D1	A	C	A	A	G	A	T	C	C	C	A	G	A	G	T	G	A	G	A	G	G	C	C	T	G	T	A	T	T	T	C	C	T	G	C	T	G																
KYR2	G	C	A	A	A	A	T	C	C	C	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G											
KYR3	G	C	A	A	G	A	T	C	C	C	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G									
KYR5	G	C	A	A	G	A	T	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G								
KYR6	G	C	A	A	G	A	T	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G							
KYR7	G	C	A	A	G	A	T	C	C	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G					
KYR8	G	C	A	A	A	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G				
KYR9	G	C	A	A	G	A	T	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G		
KYR10	G	C	A	A	G	A	T	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G

Рис. 2. Представлены нуклеотидные последовательности фрагмента Pre-S региона с делециями различной протяженности, выявленными в изолятах ВГВ обследованной группы, в сравнении с ВГВ субгенотипа D1 дикого типа.

30-45 лет, что соответствует среднему возрасту пациентов в группе, большинство из них дети обеспеченных родителей, инфицированные на рубеже XX-XXI веков, когда употребление инъекционных наркотиков получило широкое распространение в странах бывшего СССР. Смертность женщин среди употребляющих инъекционные наркотики значительно выше, чем мужчин [21].

Характерный для региона ВГВ субгенотип D₁, очевидно, имеет несколько независимых источников инфицирования. Выделяются субкластеры, включающие изоляты из Казахстана, Кыргызстана, Узбекистана. Субкластер, для которого, несмотря на разные географические регионы, очевиден общий инфекционный предок (процент нуклеотидной идентичности 99,6±0,3%) включает изоляты KYR31, KYR37, KYR1009, KYR1290, KAZk6, KAZk7, KAZk9, KAZk10, KAZk30. Сходство изолятов с описанными в международной базе данных образцами из разных стран является, по всей видимости, подтверждением многочисленных независимых завозов вируса в страны Средней Азии, в том числе в ходе крупных миграционных волн. Определяются субкластеры, включающие изоляты только из одной страны и имеющие меньшее сходство с ранее депонированными в международную базу данных изолятами, что, вероятно, свидетельствует о независимой гомологичной эволюции ВГВ в регионе.

Клинически значимые мутации выявлены у 17 пациентов, что составило 26,5%.

При анализе нуклеотидных последовательностей участка гена *Pol* генома ВГВ, ответственного за развитие лекарственной устойчивости вируса, не выявлены мутации фармакорезистентности, однако у одного больного в двух позициях, описанных в литературе как сайты лекарственной устойчивости Р-области, связанные с развитием резистентности к адефовиру, тенофовиру, энтекавиру, обнаружены необычные мутации – 236S и 250P.

В обследуемой группе выявлены 8 случаев (12,5%) с эскаре-мутациями, влияющими на одну или несколько функций, в том числе мутации, препятствующие выявлению вируса (R122K, M133I, 134N), мутации, ограничивающие возможность терапии (IG) – M133I, мутации, позволяющие вирусу реплицироваться, несмотря на вакцину – 128V, M133I, 134N. Сходный уровень распространённости эскаре-мутантов показан среди больных ХВГВ в Иордании (18,9%), Иране (14%) [22, 23].

Обращают внимание 8 штаммов (12,5%), сформировавших субкластер ВГВ субгенотипа D₁ (изоляты KYR2, KYR3, KYR5-KYR10), существенно отличающийся от

остальной группы. Нуклеотидная идентичность внутри кластера составляет 99,25±0,46%. Данные изоляты характеризуются делециями, протяжённостью 21, 24, 27 нуклеотидов в Pre-S2 регионе, представленными на рис. 2. Нуклеотидные последовательности полных геномов ВГВ с делециями в регионе Pre-S депонированы в международную базу данных GeneBank под номерами MN780900-MN780907.

Pre-S-область ВГВ расположена на 5'-конце открытых рамок считывания поверхностного гена и состоит из доменов Pre-S1 и Pre-S2. Pre-S-область содержит стартовые кодоны для экспрессии больших и средних поверхностных антигенов HBV (LHBs и MHBs соответственно) и промотор для экспрессии небольших поверхностных антигенов ВГВ (SHBs). Делеции Pre-S1 и Pre-S2 способны вызывать накопление белков LHBs и вирусных частиц в эндоплазматической сети (ER) и впоследствии вызывать стресс ER и окислительное повреждение ДНК гепатоцитов, инфицированных ВГВ, которые могут участвовать в гепатокарциногенезе. LHBs и укороченный MHBs признаны активаторами транскрипции, которые могут инициировать передачу сигналов Ras / Raf-1 / ERK и запускать иной онкогенный механизм. Всё это, как и выявление связанных с ГЦК делеций Pre-S у больных по меньшей мере за 10 лет до развития ГЦК, причём среди пациентов, у которых в дальнейшем развилась ГЦК, достоверно чаще, чем у пациентов без неё [24], позволило предположить канцерогенную роль Pre-S-делеций и возможность их потенциального применения в прогнозировании риска ГЦК.

У двух пациентов помимо делеций выявлена в Pre-Core регионе мутация S11F, независимо ассоциированная с развитием цирроза печени и ГЦК.

17 пациентов из обследуемой группы больных ХВГВ должны находиться под пристальным контролем лечащих врачей, так как в одной подгруппе больных возможно отсутствие ответа на терапию, в другой подгруппе высока вероятность развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы.

Заключение. Высокий уровень распространённости ХВГВ в Киргизской Республике свидетельствует о недостаточности диагностических и профилактических мер в регионе. Полученные данные о представленности клинически значимых мутациях вируса свидетельствуют о необходимости проведения высокочувствительной молекулярной диагностики гепатита В в связи с необходимостью правильного выбора стратегии вакцинации, противовирусной, иммуносупрессивной терапии. Анализ генетической структуры ВГВ, раннее выявление

мутаций вируса у больных ХВГВ могут способствовать прогнозированию клинического течения и прогрессирования заболевания.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-10, 16, 18, 21-24
см. REFERENCES)

11. Останкова Ю. В., Семёнов А. В., Тотолян Арег А. Выявление вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (10): 635-40.
12. Ногойбаева К. А., Тобокалова С. Т., Касымбекова К. Т., Заирова Г. М. Динамика заболеваемости хроническим гепатитом В в форме моноинфекции и в сочетании с гепатитом D в Кыргызской Республике за период 2010-2012 гг. *Казанский медицинский журнал*. 2014; 95 (6): 921-4.
13. Тобокалова С.Т., Бекенова Д.С., Заирова Г.М., Нурматов З.Ш., Назарбаева Ж.Н., Айтиева Ж.Т. Эпидемиологические особенности острого и хронического гепатитов В в Кыргызской Республике за 20-летний период (1997-2017 гг.). *Казанский медицинский журнал*. 2018; 99(6): 986-93.
14. Ногойбаева К.А., Касымбекова К.Т., Тобокалова С.Т., Мурзаева А.Т. Заболеваемость детей хроническими вирусными гепатитами В и D, 2010-2013гг., Кыргызстан. *Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева*. 2015; 4: 139-41.
15. Семёнов А. В., Останкова Ю. В., Ногойбаева К.А., Касымбекова К.Т., Лаврентьева И. Н., Тобокалова С. Т., Тотолян Арег А. Особенности молекулярной эпидемиологии сочетанной инфекции ВГВ/ВД в Кыргызстане. *Инфекция и Иммунология*. 2016; 6(2): 141-50.

REFERENCES

1. Van Nguyen D., Van Nguyen C., Bonsall D., Ngo T.T., Carrique-Mas J., Pham A.H. et al. Detection and Characterization of Homologues of Human Hepatitis Viruses and Pegviruses in Rodents and Bats in Vietnam. *Viruses*. 2018; 10(3): E102.
2. Dong Hyun Sinn, Eun Ju Cho, Ji Hoon Kim, Do Young Kim, Yoon Jun Kim, Moon Seok Choi. Current status and strategies for viral hepatitis control in Korea. *Clin. Mol. Hepatol*. 2017; 23(3): 189-95.
3. Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>>. Accessed 2019.07.08.
4. Baumert T. F., Thimme R., von Weizsäcker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol*. 2007; 13: 82-90.
5. 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.
6. Lin C.-L., Kao J.-H. Hepatitis B Virus Genotypes and Variants. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2015; 5(5): a021436-a021436.
7. Chakravarty R., Neogi M., Roychowdhury S., Panda C.K. Presence of hepatitis B surface antigen mutant G145R DNA in the peripheral blood leukocytes of the family members of an asymptomatic carrier and evidence of its horizontal transmission. *Virus Res*. 2002; 90: 133-41.
8. Tao J., Zhang W., Yue H., Zhu G., Wu W., Gong W., Fang H., He G., Hu X., Zhao H., Liu A. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Shenzhen, China, 2015-2018. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 13948.

9. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015; 65(2): 87-108.
10. Chen B.F., Liu C.J., Jow G.M., Chen P.J., Kao J.H., Chen D.S. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology*. 2006; 130(4): 1153-68.
11. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Totolian Areg A. Hepatitis B virus identification in a blood plasma at a low viral load. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (10): 635-40. (in Russian)
12. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molec. Biology and Evolution*. 2016; 33(7): 1870-4.
13. Rozanov M., Plikat U., Chappey C., Kochergin A., Tatusova T. A web-based genotyping resource for viral sequences. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32(Web Server issue): W654-9.
14. Martin D.P., Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol*. 2015; 1(1): vev003.
15. Nogoibaeva K.A., Tobokalova S.T., Kasymbekova K.T., Zairova G.M. Rends for incidence of chronic hepatitis B mono-infection and chronic hepatitis B+D co-infection in the Kyrgyz Republic for the period of 2010-2012. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2014; 95 (6): 921-4. (in Russian)
16. Kmet Lunaček N., Poljak M., Matičič M. Distribution of hepatitis B virus genotypes in Europe and clinical implications: a review. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2018; 27(3): 141-6.
17. Tobokalova S.T., Bekenova D.S., Zairova G.M., Nurmatov Z.Sh., Nazarbaeva Zh.N., Aytieva Zh.T. Epidemiological features of acute and chronic hepatitis B in the Kyrgyz Republic over the 20-year period (1997-2017). *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 99(6): 986-93. (in Russian)
18. Tobokalova S., Zairova G., Nogoibaeva K., Bekenova D. Clinical and epidemiological characteristics of family foci of chronic hepatitis B. *The Collection of Scholarly Papers*. London. 2016; 234-9.
19. Nogoibaeva K.A., Kasymbekova K.T., Tobokalova S.T., Murzaeva A.T. Children's chronic viral hepatitis morbidity in A and D, 2010-2013, Kyrgyzstan. *Vestnik KGMA im. I.K. Akhunbayeva*. 2015; 4: 139-41.
20. Semenov A.V., Ostankova Julia V., Nogoibaeva K.A., Kasymbekova K.T., Lavrentieva I.N., Tobokalova S.T., Totolian Areg A. Molecular epidemiology features of HBV/HDV co-infection in Kyrgyzstan. *In-fektsiya i immunitet*. 2016; 6(2): 141-50. (in Russian)
21. Zabransky T., Mravcik V., Talu A., Jasaitis E. Post-Soviet Central Asia: a summary of the drug situation. *Int. J. Drug Policy*. 2014; 25(6): 1186-94.
22. Ababneh N.A., Sallam M., Kaddomi D., Attili A.M., Bsisu I., Khamees N., Khatib A., Mahafzah A. Patterns of hepatitis B virus S gene escape mutants and reverse transcriptase mutations among genotype D isolates in Jordan. *Peer J*. 2019; 7:e6583.
23. Moradi A., Zhand S., Ghaemi A., Javid N., Tabarraei A. Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype D in Golestan Province-Iran. *Virus Genes*. 2012; 44(3): 382-7.
24. Zhang A.Y., Lai C.L., Huang F.Y., Seto W.K., Fung J., Wong D.K., Yuen M.F. Evolutionary Changes of Hepatitis B Virus Pre-S Mutations Prior to Development of Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2015; 10(9): e0139478.

Поступила 06.12.19

Принята к печати 16.12.19