

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Давыденко В.С.¹, Останкова Ю.В.¹, Щемелев А.Н.¹, Тотолян А.А.^{1,2}

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РАЗВИТИЯ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ ПРИ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

¹ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, 197191, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия.

Для прогностической оценки развития гепатотоксичности у ВИЧ-инфицированных лиц при антиретровирусной терапии (АРТ), был разработан способ выявления делеционных «нулевых» гомо- и гетерозиготных полиморфных вариантов генов *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* методом ПЦР в режиме реального времени. В работе были использованы образцы цельной крови, полученные от 176 ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ, 112 лиц с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией, 400 ВИЧ-инфицированных лиц с низкой приверженностью терапии, 297 ВИЧ-инфицированных лиц на АРТ с гепатотоксическими проявлениями различной степени тяжести. В качестве контрольной группы обследовали 123 волонтера без ВИЧ, вирусных гепатитов и клинических проявлений хронических и/или острых заболеваний, включая гепатотоксические проявления. В ходе работы получали ДНК и проводили мультиплексную ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» фрагментов целевых генов *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* и эталонного гена *RPP30*. Относительное число копий целевых генов определяли с использованием метода ΔΔCT в сравнении с охарактеризованным образцом-калибратором, имеющим две копии каждой из целевых последовательностей, на основании чего делали выводы о наличии аллеля «дикого» типа или делеционного полиморфизма в гетеро- или гомозиготном состоянии для каждого анализируемого гена и потенциальной функциональной состоятельности соответствующих ферментов. Разработанный метод расширяет арсенал способов, предназначенных для оценки на доклиническом этапе генетической предрасположенности человека к развитию гепатотоксических побочных эффектов при лечении с использованием антиретровирусных препаратов и может быть использован для фундаментальных исследований, посвященных оценке значимости полиморфных вариантов генов хозяина для развития гепатотоксичности, прогрессирования ВИЧ-инфекции и ее осложнений.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция; антиретровирусная терапия; гепатотоксичность; полиморфизм; гены биотрансформации ксенобиотиков; *GSTT1*; *GSTM1*; *CYP2D6*; прогностический анализ; персонифицированная медицина

Для цитирования: Давыденко В.С., Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Тотолян А.А. Прогностическая оценка развития гепатотоксичности у ВИЧ-инфицированных лиц при антиретровирусной терапии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69(8): 402-410.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-402-410>

Для корреспонденции: Останкова Юлия Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. мол. иммунологии, зав. лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции; e-mail: shennal@yandex.ru

Финансирование. Отраслевая НИР «Изучение особенностей вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) при моно- и коинфекции и формирование иммунного ответа у иммунокомпетентных и иммунокомпрометированных лиц в различных условиях, до начала терапии, а также при наличии и отсутствии ответа на терапию и в зависимости от генетического полиморфизма генов хозяина»

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.05.2024
Принята к печати 14.06.2024
Опубликовано 01.08.2024

Davydenko V.S.¹, Ostankova Y.V.¹, Schemelev A.N.¹, Totolian A.A.^{1,2}

PROGNOSTIC ASSESSMENT OF HEPATOTOXICITY IN HIV-INFECTED INDIVIDUALS ON ANTIRETROVIRAL THERAPY

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

²First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, 197022, St. Petersburg, Russia.

For prognostic assessment of hepatotoxicity development in HIV-infected individuals on antiretroviral therapy (ART), we developed a method to detect deletion 'null' homo- and heterozygous polymorphic variants of *GSTM1*, *GSTT1*, and *CYP2D6* genes by real-time PCR. Whole blood samples obtained from 176 HIV-infected patients with virological ineffectiveness of ART, 112 persons with newly diagnosed HIV infection, 400 HIV-infected persons with low adherence to therapy, 297 HIV-infected persons on ART with hepatotoxic

manifestations of different severity were used. As a control group, 123 volunteers without HIV, viral hepatitis and clinical manifestations of chronic and/or acute diseases, including hepatotoxic manifestations, were examined. In the course of work, DNA was obtained and multiplex PCR with real-time hybridisation-fluorescence detection of fragments of target genes *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* and reference gene *RPP30* was performed. The relative number of copies of the target genes was determined using the $\Delta\Delta CT$ method in comparison with the characterised calibrator sample having two copies of each of the target sequences, on the basis of which conclusions were drawn about the presence of a wild-type allele or deletion polymorphism in the hetero- or homozygous state for each analysed gene and the potential functional status of the corresponding enzymes. The developed method expands the arsenal of methods designed to assess at the preclinical stage the human genetic predisposition to the development of hepatotoxic side effects during treatment with antiretroviral drugs and can be used for basic research to assess the significance of polymorphic variants of host genes for the development of hepatotoxicity, progression of HIV infection and its complications.

Key words: HIV infection; antiretroviral therapy; hepatotoxicity; polymorphism; xenobiotic biotransformation genes; *GSTT1*; *GSTM1*; *CYP2D6*; prognostic analysis; personalised medicine

For citation: Davydenko V.S., Ostankova Yu.V., Schemelev A.N., Totolian A.A. Prognostic assessment of hepatotoxicity in HIV-infected individuals on antiretroviral therapy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (8): 402-410 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-402-410>

For correspondence: Ostankova Yu.V., PhD senior researcher at the Laboratory of Molecular Immunology, Head at the Laboratory of Immunology and Virology HIV Infection; e-mail: shennal@yandex.ru

Information about authors:

Davydenko V.S., <https://orcid.org/0000-0003-0078-9681>;

Ostankova Yu.V., <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>;

Schemelev A.N., <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>;

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

Acknowledgment. Branch research work «Study of human immunodeficiency virus (HIV) features in mono- and coinfection and formation of immune response in immunocompetent and immunocompromised individuals under different conditions, before the start of therapy, as well as in the presence and absence of response to therapy and depending on the genetic polymorphism of host genes».

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

Received 06.05.2024

Accepted 12.06.2024

Published 01.08.2024

Введение. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), как и вызываемая им инфекция, остается важнейшей проблемой современного человечества. По данным на 2022 год в мире насчитывалось от 33,1 миллиона до 45,7 миллионов человек с диагнозом ВИЧ-инфекция, среди которых число новых случаев заражения составило около 1,3 миллиона [1]. В Российской Федерации за период 2022 года показатель заболеваемости ВИЧ-инфекции составил 43,29 случаев на 100 тысяч населения, однако в некоторых регионах заболеваемость гораздо выше [2]. Без лечения ВИЧ-инфекция постепенно ослабляет иммунную систему, делая людей очень восприимчивыми к развитию оппортунистических инфекций, что приводит к быстрой гибели [3]. Единственным способом лечения ВИЧ-инфекции на сегодняшний день является антиретровирусная терапия (АРТ), в рамках которой применяются различные схемы, включающие в себя комплекс антиретровирусных препаратов (АРП), действующих на разных стадиях жизненного цикла ВИЧ [4], что позволяет достичь уровня вирусной нагрузки ВИЧ в плазме ниже предела обнаружения (<20 копий/мл в зависимости от используемого анализа) [5]. Такое снижение является главной целью лечения, так как известно, что люди, которые придерживаются АРТ и достигают неопределяемой вирусной нагрузки, не передают вирус дальше [6]. Самым главным недостатком АРТ является возможность развития мутаций лекарственной устойчивости, приводящих к фармакорезистентности к тем или иным препаратам [7 - 9]. Это, в свою очередь, может приводить к инфицированию новых больных устойчивыми к лечению штаммами [10 - 12]. Для достижения вирусологической эффективности и устойчивого вирусоло-

гического ответа требуется высокая приверженность пациента к лечению [13, 14], так как при снижении концентрации препарата быстро появляются варианты вируса, обладающие мутациями фармакорезистентности. Недостаточное подавление вируса при длительном лечении почти наверняка приводит к развитию полной резистентности не только к используемому препарату, но и ко всей группе в целом. Таким образом, стратегии повышения приверженности к лечению являются неотъемлемыми компонентами достижения 90% сокращения числа новых случаев ВИЧ-инфицирования к 2030 году и, в перспективе, прекращению эпидемии ВИЧ [15].

Низкая приверженность АРТ зависит от многих факторов, в том числе, клинических: токсичность используемых лекарств, приводящая к побочным реакциям при приеме препаратов и, соответственно, плохой переносимости лечения из-за проявлений гепатотоксичности [16]. Гепатотоксичность представляет собой повреждение печени, вызванное чужеродными веществами (ксенобиотиками), в том числе лекарственными препаратами. Гепатотоксичность и ее выраженность зависят от токсического потенциала лекарственных препаратов, модифицируемых факторов риска и генетических особенностей пациента. Диагноз заболевания печени часто основывается на повышенных уровнях ферментов сыворотки, особенно аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаргатаминотрансферазы (АСТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ). Эти ферменты, участвующие в расщеплении аминокислот, служат индикаторами повреждения клеток печени, когда их уровень становится аномально высоким [17, 18]. В среднем, только у 25-30% ВИЧ-инфицированных лиц гепатотоксичность сопровождается клинически выраженными

симптомами, однако значимое поражение печени может привести к тяжелым последствиям и летальному исходу [19]. Это также является основной причиной изменения или прекращения АРТ, а также несоблюдения режима лечения, что, в конечном итоге, может привести к неудаче терапии [20]. Следует отметить, что понимание значимости гепатотоксичности при АРТ увеличивается с каждым годом по двум причинам. Во-первых, в связи с высокой распространенностью среди ВИЧ-инфицированных лиц хронических вирусных гепатитов В (ХГВ) и С (ХГС) [21, 22], так как у таких больных на фоне терапии чаще развиваются гепатотоксические эффекты [23]. Во-вторых, поскольку популяция ВИЧ-инфицированных пациентов стареет, а больные продолжают принимать АРТ, гепатотоксичность, вызванная ВИЧ, и метаболические нарушения, связанные с АРТ, все чаще встречаются в практике лечащих врачей и становятся серьезной проблемой общественного здравоохранения [24].

Белки семейства цитохромов (СУР) и семейства глутатион-S-трансфераз (GST) участвуют, соответственно, в первой и второй фазах двухэтапного процесса детоксикации ксенобиотиков, то есть широкого спектра токсинов окружающей среды, в том числе препаратов АРТ [25, 26]. При этом GST представляют собой ферменты фазы II метаболизма, предназначенные для детоксикации лекарств посредством специфичной конъюгации с глутатионом, наиболее известные из них, *GSTM1* и *GSTT1*, полиморфны у человека, делеция гена *GSTM1* может ухудшить способность человека к детоксикации некоторых канцерогенов, активных форм кислорода и некоторых лекарств, а делеция *GSTT1* снижает эффективность детоксикации лекарственных средств и их конъюгации с электрофильными и гидрофобными соединениями [27]. Цитохром P450 2D6 (CYP2D6) кодируется высокополиморфным геном *CYP2D6* и является ключевым ферментом реакции на лекарственные препараты, поскольку участвует в метаболизме практически 25% клинически назначаемых лекарств, в том числе метаболизирует антиретровирусные препараты

[28, 29]. Согласно литературным данным, определение нулевых/делеционных мутаций генов *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* у ВИЧ-инфицированных лиц даёт ценную прогностическую информацию в отношении возможного развития гепатотоксического эффекта при АРТ [25, 26]. Разработка сравнительно легко применимого в рутинной лабораторной диагностике метода определения таких полиморфных вариантов позволит выявлять пациентов с генетической предрасположенностью к развитию гепатотоксичности на фоне АРТ для углублённого обследования, своевременного назначения адекватной поддерживающей терапии, а также проведения комплекса профилактических мероприятий.

Цель нашей работы - разработать способ прогностической оценки развития гепатотоксичности у ВИЧ-инфицированных лиц при антиретровирусной терапии на основе определения делеционного полиморфизма генов биотрансформации ксенобиотиков *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* человека.

Материал и методы. В работе были использованы образцы цельной крови, полученные от 176 ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ, 112 образцов крови от лиц с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией, 400 ВИЧ-инфицированных лиц с низкой приверженностью к терапии, 297 ВИЧ-инфицированных лиц на АРТ с гепатотоксическими проявлениями различной степени тяжести. В качестве контрольной группы обследовали 123 волонтеров без ВИЧ, вирусных гепатитов и клинических проявлений хронических и/или острых заболеваний, включая гепатотоксические проявления.

Экстракцию тотального препарата ДНК/РНК проводили с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции производителя. Полученный образец использовали для мультиплексной постановки ПЦР участков генов *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* и эталонного нормировочного гена белковой субъединицы р30 рибонуклеазы Р (*RPP30*) при условиях, представленных в табл. 1.

Таблица 1

Параметры программы амплификации на планшетном амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США)

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин		1
2	95	10 с		5
	61	30 с		
	72	15 с		
3	95	10 с	JOE/HEX, FAM/Green, Cy5/Red, ROX/Orange	30
	60	30 с *		
	72	15 с		

Примечание. * – Детекция флуоресцентного сигнала.

Состав амплификационной смеси представлял собой буферный раствор, содержащий Трис-НСl рН 8,8 (при 25 °С), КСl, 6-7 мМ MgCl₂, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20, SupTaq ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами

(или 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы, или Hot-start Taq ДНК-полимеразы). Использовали разработанный в ходе исследований комплекс олигодезоксирибонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченых зондов (табл. 2).

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованные для амплификации фрагментов целевых генов биотрансформации ксенобиотиков *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* и эталонного гена *RPP30*

Праймер/Зонд	Нуклеотидная последовательность
GSTM1F	5'–CACCTGCATTCGTTTCATGTGAC–3'
GSTM1R	5'–AAGCAAGAGCAGAGAGGAGAC–3'
GSTM1zondFAM	5'–FAM-GCCATGAGCAGGCACAGTGAGTGC-RTQ1/BHQ1–3'
GSTT1F	5'–GTCCCAGAGCACCTCACC–3'
GSTT1R	5'–GTGTGCATCATTCTCATTGTGG–3'
GSTT1zondHEX	5'–HEX-CACCATCCCCACCCTGTCTTCCA-BHQ1–3'
CYP2D6*5F	5'–TGAGCCCATCTGGGAAACA–3'
CYP2D6*5R	5'–GGTGTCCCAGCAAAGTTCATG–3'
CYP2D6*5zondCy5	5'–Cy5-CAGTGCAGGGGCCGAGGGAG-RTQ2/BHQ2–3'
RPP30F	5'–TTTGGACCTGCGAGCG–3'
RPP30R	5'–GAGCGGCTGTCTCCACAAGT–3'
RPP30-zondROX	5'–ROX-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-RTQ2/BHQ2–3'

Полученные результаты регистрировали посредством гибридационно-флуоресцентной детекции в режиме «реального времени» с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР.

Параллельно с амплификацией анализируемых образцов проводили амплификацию контрольного образца, представляющего собой ранее охарактеризованный образец ДНК, в котором все три целевых гена дикого типа находятся в гомозиготном состоянии.

Анализировали кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам: по каналу для флуорофора JOE/HEX – сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента гена *GSTT1*, по каналу для флуорофора FAM/Green сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента гена *GSTM1*, по каналу для флуорофора Cy5/Red сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента гена *CYP2D6*, по каналу для флуорофора ROX/Orange сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента гена *RPP30*. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливали в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов. Результат амплификации по каналу считали положительным, если кривая однократно пересекалась с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, отрицательным в случае отсутствия пересечения кривой с пороговой линией (нет значения *Ct*), сомнительным во всех других случаях. Анализ *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6*

проводили с нормализацией на эталонный ген *RPP30*, относительное число копий целевых генов определяли с использованием метода $\Delta\Delta CT$ [30] в сравнении с охарактеризованным образцом-калибратором, имеющим две копии каждой из целевых последовательностей, на основании чего делали выводы о наличии аллеля дикого типа или делеционного полиморфизма в гетеро- или гомозиготном состоянии для каждого анализируемого гена и потенциальной функциональной состоятельности соответствующих ферментов.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ MS Excel, Prizm 5.0 (GraphPad Software Inc., <https://www.graphpad.com/support/prizm-5-updates/>). Для оценки достоверности различий численных данных, полученных при парных сравнениях, использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. В качестве порога достоверности отличий было определено значение вероятности $p < 0,05$.

Результаты. Согласно предложенному нами методу, полученный образец тотальной ДНК использовали для одновременной амплификации в одной емкости фрагментов целевых генов *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* и эталонного гена *RPP30* с использованием олигонуклеотидных праймеров и соответствующих им олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов, несущих на 5'-конце флуорофоры, а на 3'-конце не флуоресцентные тушители (см. табл.1). Основой для возникновения флуоресценции является амплификация целевых и эталонных фрагментов ДНК на специфических олигонуклеотидах. Для детекции накопления специфических продуктов ПЦР используются флуоресцентно меченые олигонуклеотидные зонды, что позволяет проводить одновременную регистрацию флуоресценции по четырем каналам амплификатора с функцией детекции флу-

оресценции в режиме реального времени.

На рис. 1 представлены кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продукта реакции в ходе амплификации всех анализируемых генов, вклю-

чая три целевых гена и один нормировочный, при «диком» генотипе, то есть, каждый целевой ген гомозиготен по «дикой» аллели, то есть, *GSTM1* *+/+* *GSTT1* *+/+* *CYP2D6* *+/+*.

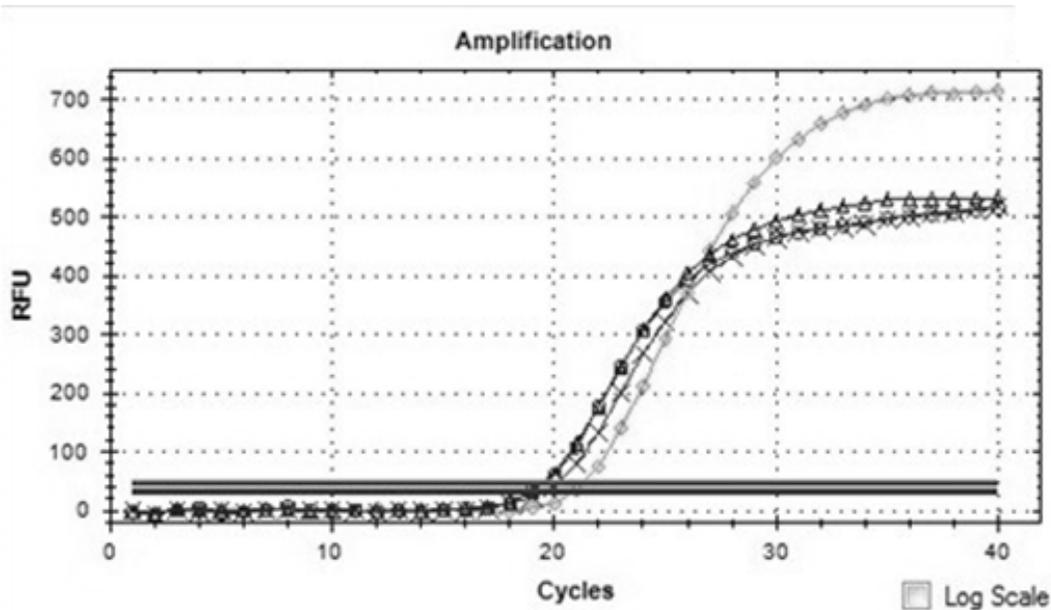


Рис. 1. Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации всех анализируемых генов при «диком» генотипе, включая целевые гены *GSTM1* (FAM – кружки), *GSTT1* (HEX – треугольники), *CYP2D6* (Cy5 – кресты) и эталонного гена *RPP30* (ROX – ромбы).

На рис. 2 представлены кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации анализируемых генов при «дикой» гомозиготе (*+/+*) по гену *GSTT1*, ге-

терозиготе (*+ / 0*) по гену *GSTM1* и гомозиготной делеционной мутации (*0 / 0*) гена *CYP2D6*, о чем свидетельствует отсутствие продукта его амплификации.

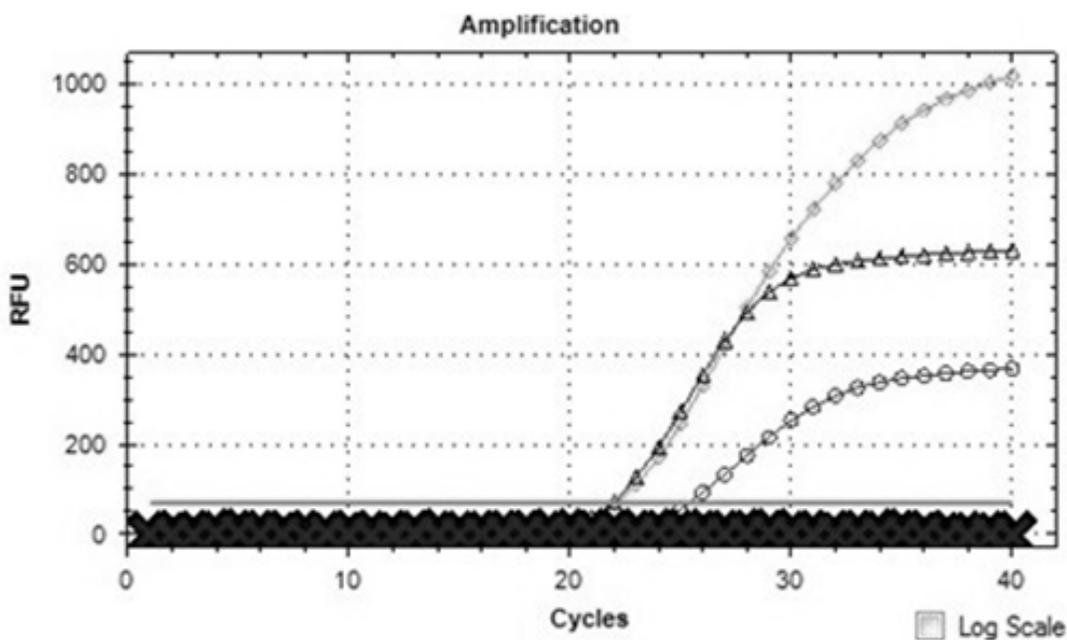


Рис. 2. Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации анализируемых генов. Обозначения: целевые гены *GSTM1* (FAM – кружки), *GSTT1* (HEX – треугольники), эталонный ген *RPP30* (ROX – ромбы).

На рис. 3 представлены кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации анализируемых генов при «дикий» гомозиготе (+/+) по гену *GSTT1*

и гомозиготном делеционном полиморфизме по генам *GSTM1* (0/0) и *CYP2D6* (0/0), что выражается в отсутствии флуоресценции соответствующих зондов.

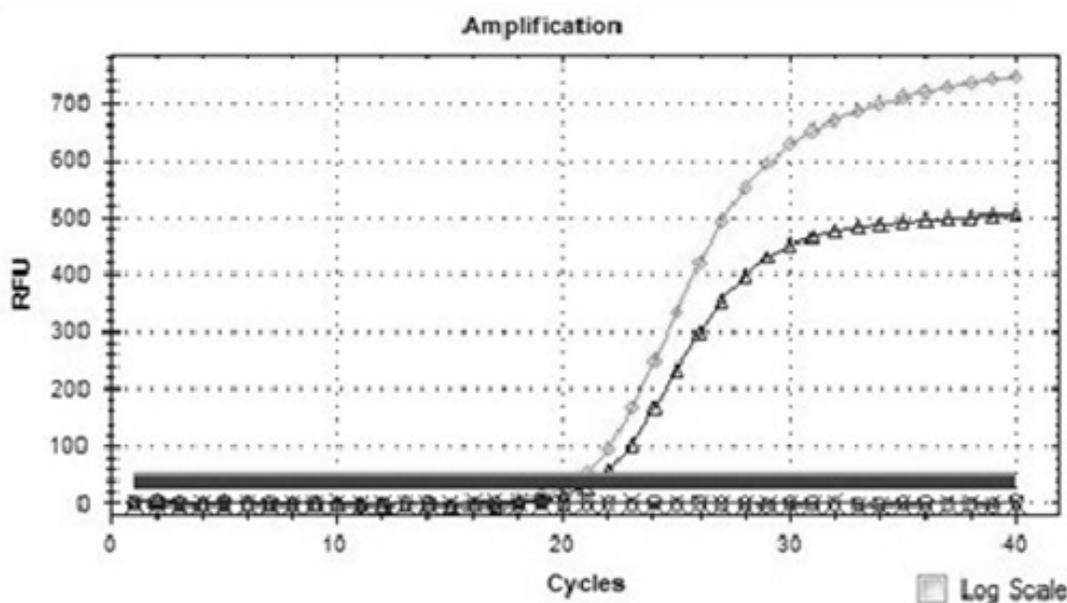


Рис. 3. Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации анализируемых генов. Обозначения: целевой ген *GSTT1* (HEX – треугольники), эталонный ген *RPP30* (ROX – ромбы).

В ходе апробации разработанного метода было показано, что частоты гомозиготных делеций *GSTM1* и *GSTT1* у ВИЧ-инфицированных лиц с вирусологической неэффективностью АРТ составили 41,47% и 44,88%, соответственно, сочетанный генотип *GSTM1* 0/0 + *GSTT1* 0/0 – 22,15% от группы. В контрольной группе сочетанный генотип *GSTM1* 0/0 + *GSTT1* 0/0 – 12,19% от группы. При анализе распределения генотипов: *GSTM1* 0/0 + *GSTT1* +/-, *GSTM1* +/- + *GSTT1* 0/0, *GSTM1* 0/0 + *GSTT1* 0/0, *GSTM1* +/- + *GSTT1* +/-, где «-» – любой вариант, выявлены достоверные отличия между контрольной группой и ВИЧ-инфицированными лицами с неэффективной АРТ - $\chi^2=18,103$, $df3$, $p=0,0004$. Распределение генотипов генов *GST* в группе пациентов с впервые выявленной инфекцией ВИЧ не отличалось от такового в контрольной группе. Показан риск неэффективности АРТ при сочетании генотипа *GSTM1* 0/0 + *GSTT1* 0/0 – $OR=2,05$, $p<0,05$. Риск вирусологической неэффективности АРТ при *GSTM1* 0/- *GSTT1* 0/- *CYP2D6* 0/- более чем в пять раз выше, чем у лиц с генотипом *GSTM1* +/- *GSTT1* +/- *CYP2D6* +/- – $OR=5,7$, $p<0,05$.

Большинство ВИЧ-инфицированных больных с низкой приверженностью к АРТ сообщали о гепатотоксических проявлениях лечения антиретровирусными препаратами. Среди 400 ВИЧ-инфицированных лиц с низкой приверженностью терапии у 332 человек, что составило 83% обследованных, был представлен по крайней мере один из целевых генов *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* с делеционной мутацией в гомозиготном состоянии. У 278

человек (69,5%) одновременно выявляли делеционную мутацию другого целевого гена в гомо- или гетерозиготном состоянии. У 161 (40,25%) ВИЧ-инфицированных больных с низкой приверженностью АРТ и гепатотоксическими проявлениями были выявлены сочетания генотипов *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/0, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/0, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/+, *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/+ в присутствии *CYP2D6* 0/0 или *CYP2D6* 0/+.

У 92,22% лиц с тяжелыми гепатотоксическими проявлениями выявляли следующие сочетания целевых генов: *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/0 *CYP2D6* 0/0, *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/0 *CYP2D6* 0/+, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/0 *CYP2D6* 0/0, *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/+ *CYP2D6* 0/0, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/0 *CYP2D6* 0/+, *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/+ *CYP2D6* 0/+. При оценке риска развития тяжелых гепатотоксических эффектов показано, что $OR=16,21$, $p<0,05$ при сочетании генотипа *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/0 *CYP2D6* 0/0.

В связи с вышесказанным, авторы считают, что выявление сочетания генотипов *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/0, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/0, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/+, *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/+ в присутствии *CYP2D6* 0/0 или *CYP2D6* 0/+ свидетельствует о наличии у обследуемых генетической предрасположенности к развитию гепатотоксического эффекта при антиретровирусной терапии.

Обсуждение. В эпоху высокоактивной АРТ почти половина смертей среди госпитализированных пациентов, инфицированных ВИЧ, связана с заболеваниями печени. Клинические проявления при этом могут варьировать от первично бессимптомных с умеренным повышением активности печеночных ферментов до

цирроза печени и печеночной недостаточности. В различных работах исследователи освещают эту проблему как гепатотоксичность, развившуюся вследствие действия непосредственно инфекции, побочного эффекта АРТ и нескольких причин сразу. Индивидуальная адаптация к антиретровирусным препаратам, воздействию окружающей среды, сформированная культурными нормами и генетической предрасположенностью, потенциально может модулировать риск и прогрессирование заболеваний печени среди ВИЧ-инфицированных лиц [23, 24], в связи с чем, методы, позволяющие выявить повышенный риск развития у пациента гепатотоксичности, становятся необходимостью.

Ранее Н.О. Singh и соавторы [26] предлагали способ определения делеционных мутаций генов *GSTM1* и *GSTT1* у ВИЧ-инфицированных лиц для определения риска развития гепатотоксичности при АРТ, кроме того известен «Набор реагентов для выявления генетических полиморфизмов в генах *GSTT1* и *GSTM1* человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле "АмплиСенс® *GSTT1/GSTM1*-EPh"). Однако, методы, выявляющие только гомозиготные нулевые генотипы очевидно ограничены так как не позволяют определить гетерозиготы *GSTM1* +/0 и *GSTT1* +/0, ферментативная активность которых присутствует, но имеет сравнительно более низкий уровень, чем при гомозиготах *GSTM1* +/+ и *GSTT1* +/+. Кроме того, ограничением является необходимость использования агарозного геля-электрофореза для детекции результатов. Известен способ определения мутаций гена *CYP2D6*, включая делеционную мутацию, методом ПЦР с последующим секвенированием [31], что позволяет выявить разнообразие мутаций указанного гена, но очевидным ограничением метода является сложность его применения в рамках рутинной лабораторной диагностики. Проблему отчасти решили в своей работе I. Girault и соавторы [32], предложившие выявлять «нулевые» аллели *GSTT1* и *GSTM1* методом ПЦР в реальном времени, однако этот способ имел ряд технических проблем. Во-первых, крайне неудачно были выбраны нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, что в одних случаях приводило к повышенной возможности отжига синтетических последовательностей самих на себя, а в других, из-за разницы GC-состава и, соответственно, различных оптимальных температур отжига, к разнице в эффективности ПЦР целевых и нормировочного гена. Во-вторых, выявление делеционных аллелей только генов II фазы биотрансформации ксенобиотиков, но отсутствие выявления делеционной мутации генов I фазы не позволяло оценить эффект суммарного влияния. Эти проблемы были успешно решены в рамках предложенного нами способа.

Необходимость разработки и внедрения предложенного нами способа для прогностической оценки предрасположенности к развитию гепатотоксичности при АРТ косвенно подтверждается тем, что наряду с повышенным риском распространенности вирусных гепатитов среди ВИЧ-инфицированных лиц, достоверно показано, что такая коинфекция существенно повышает риск развития тяжелой гепатотоксичности [23, 24]. К потенциальным механизмам повреждения печени у таких пациентов можно отнести усиление окислитель-

ного стресса печени, нарушение работы митохондрий, липотоксичность, аутоиммунные нарушения, цитотоксичность, накопление токсичных метаболитов, в том числе за счет нормальной/высокой активности ферментов I фазы биотрансформации и сниженной активности ферментов II фазы, системное воспаление, не исключено также влияние мутантных вариантов вируса гепатита В, которые могут способствовать тяжелой гепатотоксичности [24]. Таким образом, ВИЧ-инфицированные пациенты, получающие высокоактивную антиретровирусную терапию, тем более при наличии коинфекции, требуют пристального внимания и регулярного контроля функции печени [24].

Отдельно следует отметить, что в ходе апробации метода, помимо ассоциации «нулевых» аллелей генов *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* с развитием гепатотоксичности, было показано влияние сочетанных нулевых генотипов исследуемых генов на вирусологическую эффективность АРТ. Поскольку маловероятна прямая связь вирусологической неэффективности АРТ с делеционными полиморфными вариантами исследуемых генов, можно предположить, что ассоциация опосредована повышенной частотой низкой/умеренной приверженности среди лиц с указанными генотипами из-за проявлений гепатотоксичности, о которых пациенты не сообщали своевременно. Еще одним неожиданным результатом оказалось то, что наибольшее ОР развития гепатотоксичности показано при сочетании генотипов *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/0, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/0, *GSTM1* 0/+ *GSTT1* 0/+, *GSTM1* 0/0 *GSTT1* 0/+ с *CYP2D6* 0/0 или *CYP2D6* 0/+, в то время как логично было бы предположить наибольшую значимость при сочетании «нулевых» аллелей генов II фазы биотрансформации ксенобиотиков с «диким типом» гена I фазы. Вероятнее всего, это может быть связано с многочисленностью генов биотрансформации обеих фаз и тем, что какой-то/какие-то из генов I фазы играет более важную роль при активации ксенобиотиков из ряда АРП, чем *CYP2D6*, однако необходимы дальнейшие исследования этого направления.

Заключение. Разработанный метод прогностической оценки развития гепатотоксичности у ВИЧ-инфицированных лиц при антиретровирусной терапии на основе определения делеционного полиморфизма генов биотрансформации ксенобиотиков *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* человека расширяет арсенал способов, предназначенных для оценки на доклиническом этапе генетической предрасположенности человека к развитию гепатотоксических побочных эффектов при лечении с использованием антиретровирусных препаратов. Кроме того, представленный способ может быть использован для фундаментальных исследований, посвященных оценке значимости полиморфных вариантов хозяина для развития гепатотоксичности, прогрессирования ВИЧ-инфекции и ее осложнений.

ЛИТЕРАТУРА (Пп. 1, 3-6, 10, 11, 13-15, 17, 18, 20, 23-32 см. REFERENCES)

2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году: Государственный

- доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2023.
7. Останкова Ю. В., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Чурина М.А., Валутите Д.Э., Семенов А.В. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ у пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2019; 11(4): 65-72. DOI: 10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-90.
 8. Щемелев А.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э., Семенова Д.А. и др. Генетическое разнообразие и мутации лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в Ленинградской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022; 99(1): 28–37. DOI: 10.36233/0372-9311-216
 9. Щемелев А.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Найденова Е.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э. и др. Генетическое разнообразие вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в Калининградской области. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(4): 310-21. DOI: 10.36233/0507-4088-119.
 12. Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Валутите Д.Э., Серикова Е.Н., Зуева Е.Б., Семенов А.В. и др. Риск неэффективности терапии первой линии у пациентов с ВИЧ в СевероЗападном федеральном округе России. *Инфекция и иммунитет*. 2023; 13(2): 302-8. DOI: 10.15789/2220-7619-RAO-2122.
 16. Мусатов В.Б., Яковлев А.А., Чайка Н.А., Келли Д., Амирханян Ю.А. Основные причины и современные методы коррекции низкой приверженности к антиретровирусной терапии у трудных пациентов. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2018; 10(4): 37-56. DOI: 10.22328/2077-9828-2018-10-4-37-56.
 19. Журавлева М.В., Прокофьев А.Б., Подымова А.С., Бердникова Н.Г., Сереброва С.Ю., Демченкова Е.Ю. Контроль за нежелательными реакциями при проведении антиретровирусной терапии ВИЧ/СПИД при применении взаимозаменяемых лекарственных препаратов. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2017; 5(3): 126-32.
 21. Семёнов А.В., Останкова Ю. В., Серикова Е.Н., Зуева Е.Б., Тоголян Арег А. Оптимизация алгоритма диагностики маркеров хронического гепатита В у пациентов с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(9): 574-9. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-9-574-579.
 22. Останкова Ю.В., Валутите Д. Э., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Boubaly S., Balde T.A.L., Семенов А.В. Первичные мутации лекарственной устойчивости вируса гепатита С у пациентов с впервые выявленной ВИЧ инфекцией. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (3): 97-105. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-97-105.
 - 393(10189): 2428-38. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30418-0.
 7. Ostankova Yu.V., Shchemelev A.N., Zueva E.V., Churina M.A., Valutite D.E., Semenov A.V. HIV molecular epidemiology and pharmacoresistance in patients with antiretroviral therapy failure in Arkhangelsk district. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2019; 11(4): 79-90. DOI: 10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-90. (in Russian)
 8. Shchemelev A.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Semenova D.A. et al. Genetic diversity and drug resistance mutations of HIV-1 in Leningrad Region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022; 99(1): 28-37. DOI: 10.36233/0372-9311-216. (in Russian)
 9. Shchemelev A.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Naidenova E.V., Zueva E.B., Valutite D.E. et al. Genetic diversity of the human immunodeficiency virus (HIV-1) in the Kaliningrad region. *Voprosy Virusologii*. 2022; 67(4): 310-21. DOI: 10.36233/0507-4088-119. (in Russian)
 10. Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Semenov A.V., Totolian A.A. Detection of Patient HIV-1 Drug Resistance Mutations in Russia's Northwestern Federal District in Patients with Treatment Failure. *Diagnostics*. 2022; 12(8): 1821. DOI: 10.3390/diagnostics12081821.
 11. Shchemelev A.N., Boubaly S., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Semenov A.V., Totolian A.A. Prevalence of drug resistant HIV-1 forms in patients without any history of antiretroviral therapy in the Republic of Guinea. *J. Med. Virol*. 2022; 95: e28184. DOI: 10.1002/jmv.28184.
 12. Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Serikova E.N., Zueva E.B., Semenov A.V. et al. Risk assessment of firstline treatment failure in untreated HIV patients in Northwestern federal district of the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet*. 2023; 13(2): 302–8. DOI: 10.15789/2220-7619-RAO-2122. (in Russian)
 13. Rutledge S.E., Zhang J., Icard L.D., Jemmott J.B. Do syndemic conditions predict HIV medication adherence among urban African American men? *AIDS Care*. 2024; 36(6): 781-9. DOI: 10.1080/09540121.2024.2305149.
 14. Patel D., Beer L., Yuan X., Tie Y., Baugher A.R., Jeffries W.L. et al. Explaining racial and ethnic disparities in antiretroviral therapy adherence and viral suppression among U.S. men who have sex with men. *AIDS*. 2024; 38(7): 1073-80. DOI: 10.1097/QAD.0000000000003860.
 15. Dunn Navarra A.M., Gormley M., Liang E., Loughran C., Vorderstrasse A., Garcia D.R. Developing and testing a web-based platform for antiretroviral therapy (ART) adherence support among adolescents and young adults (AYA) living with HIV. *PEC Innov*. 2024; 4: 100263. DOI: 10.1016/j.pecinn.2024.100263.
 16. Musatov V.B., Yakovlev A.A., Chaika N.A., Kelly J., Amirhanyan Yu.A. Main reasons and current methods of correction of poor adherence to antiretroviral treatment in difficult patients. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2018; 10(4): 37-56. DOI: 10.22328/2077-9828-2018-10-4-37-56. (in Russian)
 17. Ayelagbe O.G., Akerele O.P., Onuegbu A.J., Oparinde D.P. Drug hepatotoxicity in HIV patients on highly active antiretroviral therapy [HAART] in Southwest Nigeria. *IOSR J. Dent. Med. Sci. (IOSR-JDMS)*. 2014; 13(5): 67–70. DOI: 10.9790/0853-13566770.
 18. Achila O.O., Abrhaley F., Kesete Y., Tesfaldet F., Alazar F., Fisschaye L. et al. Dyslipidemia and associated risk factors among HIV/AIDS patients on HAART in Asmara, Eritrea. *PLoS One*. 2022; 17(7): e0270838. DOI: 10.1371/journal.pone.0270838.
 19. Zhuravleva M.V., Prokofiev A.B., Podymova A.S., Berdnikova N.G., Serebrova S.Yu., Demchenkova E.Yu. Control of adverse drug reactions in HIV/AIDS antiretroviral treatment with interchangeable medicines. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2017; 5(3):126-32. (in Russian)
 20. Gebremicael G., Tola H.H., Gebreegziachew A., Kassa D. Incidence of Hepatotoxicity and Factors Associated During Highly Active Antiretroviral Therapy in People Living with HIV in Ethiopia: A Prospective Cohort Study. *HIV AIDS (Auckl)*. 2021; 13: 329-36. DOI: 10.2147/HIV.S283076.
 21. Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Zueva E.B., Totolian A.A. Optimization of the algorithm diagnosis chronic hepatitis B markers in patients with newly diagnosed HIV infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(9): 574-9. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-9-574-579. (in Russian)
 22. Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Zueva E.B., Serikova E.N.,

REFERENCES

1. The path that ends AIDS: UNAIDS Global AIDS Update 2023. Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS; 2023. https://thepath.unaids.org/wp-content/themes/unaids2023/assets/files/2023_report.pdf (Accessed: 18.03.2024).
2. On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2022: State Report. Moscow: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere prav potrebiteley I blagopoluchiya cheloveka; 2023. (in Russian)
3. Wondifraw Baynes H., Tegene B., Gebremichael M., Birhane G., Kedir W., Biadgo B. Assessment of the effect of antiretroviral therapy on renal and liver functions among HIV-infected patients: a retrospective study. *HIV/AIDS Res. Palliat. Care*. 2017; 9: 1–7. DOI: 10.2147/HIV.S120979.
4. Richman D.D., Margolis D.M., Delaney M., Greene W.C., Hazuda D., Pomerantz R.J. The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science*. 2009; 323(5919): 1304-7. DOI: 10.1126/science.1165706.
5. HIV.gov Guidelines for the use of antiretroviral agents in adults and adolescents with HIV. 2023. <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/hiv-clinical-guidelines-adult-and-adolescent-arv/virologic-failure?view=full> (Accessed: 15.04.2024).
6. Rodger A.J., Cambiano V., Bruun T., Vernazza P., Collins S., Degen O. et al. Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples with the HIV-positive PARTNER taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study. *Lancet*. 2019;

- Shchemelev A.N., Boumbaly S. et al. Primary HCV Drug Resistance Mutations in Patients with Newly Diagnosed HIV Infection. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (3): 97-105. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-97-105. (in Russian)
23. Kwofie T.B., Adigbli D., Osei-Yeboah J., Ativi E., Lokpo S.Y. Hepatitis B and C infections in HIV-1 patients on combination antiretroviral therapy (cART) in Ghana: implications for immunologic recovery, clinical response to treatment, and hepatotoxicity. *Heliyon*. 2021; 7(6): e07172. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07172.
24. Darge T., Babusha A., Chilo D., Dukessa A., Teferi S. Predictors of severe hepatotoxicity among retroviral infected adults on HAART regimen in Ilubabor Zone, Southwest Ethiopia. *Sci Rep*. 2024; 14(1): 8473. DOI: 10.1038/s41598-024-57900-7.
25. Nefic H. The Genetic Variation of CYP2D6 Gene in the Bosnian Population. *Med. Arch*. 2018; 72(6): 396-400. DOI: 10.5455/med-arch.2018.72.396-400.
26. Singh H.O., Lata S., Angadi M., Bapat S., Pawar J., Nema V. et al. Impact of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 gene polymorphism and risk of ARV-associated hepatotoxicity in HIV-infected individuals and its modulation. *Pharmacogenomics J*. 2017; 17(1): 53-60. DOI: 10.1038/tpj.2015.88.
27. Chanhom N., Jittikoon J., Wattanapokayakit S., Mahasirimongkol S., Charoenyingwattana A., Udomsinprasert W. et al. The Association of HLA-B*35 and GSTT1 Genotypes and Hepatotoxicity in Thai People Living with HIV. *J Pers Med*. 2022; 12(6): 940. DOI: 10.3390/jpm12060940.
28. Singh H., Lata S., Gangakhedkar R.R. Prevalence of CYP2D6*4 1934G/A polymorphism in Western Indian HIV patients. *APMIS*. 2018; 126(11): 842-51. DOI: 10.1111/apm.12893.
29. Twesigomwe D., Drögemöller B.I., Wright G.E.B., Adebamowo C., Agongo G., Boua P.R. et al. Characterization of CYP2D6 Pharmacogenetic Variation in Sub-Saharan African Populations. *Clin. Pharmacol. Ther*. 2023; 113(3): 643-59. DOI: 10.1002/cpt.2749.
30. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
31. Kim E.Y., Lee S.S., Jung H.J., Jung H.E., Yeo C.W., Shon J.H. et al. Robust CYP2D6 genotype assay including copy number variation using multiplex single-base extension for Asian populations. *Clin. Chim. Acta*. 2010; 411(23-24): 2043-8. DOI: 10.1016/j.cca.2010.08.042.
32. Girault I., Lidereau R., Biche I. Trimodal GSTT1 and GSTM1 genotyping assay by real-time PCR. *Int. J. Biol. Markers*. 2005; 20(2): 81-6. DOI: 10.5301/JBM.2008.2569.