

МЕЖГЕНОТИПНЫЕ РЕКОМБИНАНТЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА С — ПРИРОДНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИРУСА К ДЕЙСТВИЮ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

О.В. Калинина¹, К.Р. Дудина², А.Н. Козина², А.В. Дмитриев³, М.Г. Исагулянц⁴, О.О. Знойко²

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБУ «Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава России, Москва, Россия

Калинина Ольга Викторовна — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора; *Дудина Кристина Рубеновна* — доктор медицинских наук, доцент, кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» (МГМСУ им. А.И. Евдокимова) Минздрава России; *Козина Анастасия Николаевна* — студентка, кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова; *Дмитриев Александр Валентинович* — доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН; *Исагулянц Мария Георгиевна* — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава РФ; *Знойко Ольга Олеговна* — доктор медицинских наук, профессор, кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

Контактная информация: ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, ул. Мира, д. 14, Санкт-Петербург, Россия, 197101. Тел.: +7(812)233–21–49. E-mail: olgakalinina@mail.ru (Калинина Ольга Викторовна).

Резюме

В работе представлены данные об организации генома межгенотипных рекомбинантов вируса гепатита С, описаны отличительные особенности генетических детерминант, потенциально вовлеченных в формирование резистентности к действию интерферона, обобщены результаты лечения пациентов, инфицированных рекомбинантными формами вируса гепатита С.

Ключевые слова: межгенотипные рекомбинанты вируса гепатита С, геном, противовирусная терапия.

HEPATITIS C VIRUS INTERGENOTYPIC RECOMBINANTS: THE NATURAL MODEL FOR STUDYING MOLECULAR GENETIC DETERMINANTS OF VIRAL RESISTANCE TO ANTIVIRAL DRUGS

O.V. Kalinina¹, K.R. Dudina², A.N. Kozina², A.V. Dmitriev³, M.G. Isaguliantz⁴, O.O. Znoiko²

¹ Saint-Petersburg Pasteur Epidemiology and Microbiology Research Institute, Saint-Petersburg, Russia

² Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

³ Research Institute of Experimental Medicine of the NorthWest Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Saint-Petersburg, Russia

⁴ Ivanovskiy Research Institute of Virology, Moscow, Russia

Corresponding author: Saint-Petersburg Pasteur Epidemiology and Microbiology Research Institute, 14 Mira st., Saint-Petersburg, Russia, 197101. Тел.: +7(812)233–21–49. E-mail: olgakalinina@mail.ru (Olga V. Kalinina — Doctor of Biology Sciences, Leading Researcher of Research Laboratory of molecular biology of Saint-Petersburg Pasteur Epidemiology and Microbiology Research Institute).

Abstract

Review presents the current data on the genome organization of the hepatitis C virus intergenotypic recombinants, the peculiarities of genetic determinants potentially involved in the interferon resistant phenotype, summarizes the antiviral therapy outcomes for patients infected by hepatitis C virus recombinants.

Keywords: Hepatitis C virus intergenotypic recombinants, genome, antiviral therapy.

Статья поступила в редакцию 19.05.14 и принята к печати 28.05.14.

Введение

Вирус гепатита С (ВГС) был открыт в 1989 г и по организации генома, который представлен (+)-цепью РНК длиной около 9600 нуклеотидов, отнесен к семейству Flaviviridae, род Heparivirus [1]. Открытая рамка считывания (ORF) кодирует полипротеин (3011–3033 аминокислотных остатков), расщепляющийся в результате посттрансляционного процессинга вирусными и клеточными протеазами на 10 белков: core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4b, NS5A, NS5B (Рис. 1). На 5'- и 3'-концах ORF ограничена короткими нетранслируемыми участками 5'UTR и 3'UTR, содержащими ключевые последовательности и структурные элементы, необходимые для репликации вирусного генома и инициации трансляции полипротеина [2].

Сегодня в мире более 150 млн. человек (около 3 % населения планеты) инфицировано ВГС, и ежегодно более 350 тыс. человек умирает от болезней печени, ассоциированных с вирусным гепатитом С (ГС) [3]. За последнее десятилетие число зарегистрированных больных хроническим гепатитом С (ХГС) в Российской Федерации увеличилось вдвое и достигло показателя 40,9‰ [4]. Вирус гепатита С является одним из наиболее динамично эволюционирующих патогенов вирусной природы, что позволяет ему успешно адаптироваться к действию факторов иммунной защиты организма человека, способствуя значительной частоте хронизации заболевания (70 %). Высокая генетическая вариабельность ВГС не только затрудняет разработку эффективных методов специфической профилактики, но и способствует быстрому формированию вариантов вируса, устойчивых к действию противовирусных препаратов.

Длительное время полагали, что единственным фактором, обуславливающим генетическое разнообразие вируса, является высокая частота синонимических и несинонимических мутаций. Другой фундаментальный механизм изменчиво-

сти — рекомбинацию — не принимали во внимание, считая, что природные рекомбинанты ВГС если и образуются, то являются нежизнеспособными [5]. В 2002 г. был идентифицирован первый межгенотипный рекомбинантный вариант ВГС RF2k/1b [6; 7], успешно распространяющийся в популяции, что явилось доказательством явления рекомбинации в эволюции вируса. В 2005 г. рекомбинантная форма RF2k/1b была включена в классификацию ВГС как отдельная номенклатурная единица. Современная классификация ВГС 2014 г. включает 7 генотипов, более 88 субтипов, а также 9 межгенотипных рекомбинантных форм [8].

Гено- и субтипы ВГС являются одним из основных факторов, влияющих на выбор схемы лечения и исход терапии. В настоящее время показано, что наиболее вероятно достижение устойчивого вирусологического ответа (УВО) на противовирусную терапию (ПВТ) у больных ХГС, инфицированных не 1 генотипом ВГС [9]. Не вызывает сомнений значимая роль вирусных генетических детерминант, влияющих на ответ на ПВТ. Поскольку межгенотипные рекомбинанты обладают специфическими характеристиками, они представляют собой, с одной стороны, уникальные природные модели для изучения значения генетических детерминант, расположенных на протяжении всего генома, а с другой — серьезную проблему при выборе тактики лечения и прогнозировании ответа на проводимую терапию.

Структурно-функциональная организация генома межгенотипных природных рекомбинантов ВГС

Все девять известных природных межгенотипных рекомбинантов ВГС образовались в результате гомологичной рекомбинации, при которой структура генома образующейся дочерней РНК полностью соответствует родительским геномам. На протяжении всего генома рекомбинантных изо-

Таблица 1

РАСПОЛОЖЕНИЕ САЙТА РЕКОМБИНАЦИИ МЕЖГЕНОТИПНЫХ ПРИРОДНЫХ РЕКОМБИНАНТОВ ВГС

Номенклатурное название	Родительский генотип с 5'UTR области до сайта рекомбинации	Область сайта рекомбинации *	Родительский генотип от сайта рекомбинации к 3'UTR области
RF2k/1b	2k	NS2 (3175/3176 н.о.)	1b
RF2i/6p	2i	NS2/NS3 соединение (3405–3464 н.о.)	6p
RF2b/1b_1	2b	NS2/NS3 соединение (3399/3400 н.о.)	1b
RF2/5	2	NS2/NS3 соединение	5
RF2b/6w	2b	NS2/NS3 соединение (3429 н.о.)	6w
RF2b/1a	2b	NS/NS3 соединение (3405–3416 н.о.)	1a
RF2b/1b_2	2b	NS3 (3443/3444 н.о.)	1b
RF2b/1b_3	2b	NS2 (3300–3303 н.о.)	1b
RF2b/1b_4	2b	NS2 (3300–3303 н.о.)	1b

Примечание: * — область сайта указана в авторской интерпретации.

Таблица 2

СОСТАВ ПОЛИПРОТЕИНА РЕКОМБИНАНТНЫХ И РЕФЕРЕНСНЫХ ИЗОЛЯТОВ ВГС

Область полипротеина	Количество аминокислотных остатков				
	Субтип 2aC-J6	Субтип 2k vat-96	RF2k/1b N687	RF2b/1b DQ364460	Субтип 1b k1-s2
ORF	3033	3033	3014	3014	3010
CORE	191	191	191	191	191
E1	192	192	192	192	192
E2	367	367	367	367	363
p7	63	63	63	63	63
NS2	217	217	217	217	217
NS3	631	631	631	631	631
NS4A	54	54	54	54	54
NS4B	261	261	261	261	261
NS5A	466	466	447	447	447
NS5B	591	591	591	591	591

лятов не выявлено никаких инсерций или делеций. Характерными особенностями всех рекомбинантов являются наличие единственного сайта рекомбинации, расположение которого варьирует в пределах NS2 и NS2/NS3 областей, и принадлежность 5'UTR области до сайта рекомбинации к генотипу 2 (Табл. 1) [7, 10–16]. ORF природных рекомбинантов кодирует полипротеин со стандартным для ВГС порядком расположения белков (Табл. 2). На 5'- и 3'- концах ORF так же, как и у нерекомбинантных изолятов, расположены нетранслируемые области: 5'UTR и 3'UTR.

5'UTR область генома ВГС имеет сложную вторичную структуру и содержит внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) [2, 17]. В эксперимен-

тах *in vitro* на четырех клеточных культурах ВНК-21, HeLa-T4M, HuH7 и HepG2 было показано, что, несмотря на высокую консервативность первичной (гомология нуклеотидных последовательностей 5'UTR области между генотипами колеблется в пределах 92–98 %, тогда как между изолятами одного генотипа достигает 98–99 %) и вторичной структур 5'UTR области, эффективность IRES трансляции генома субтипа 2b наиболее высока по сравнению с субтипами 1a, 1b, 3a, 4a, 5a и 6a и превышает таковую у субтипа 6a в три раза. При этом эффективность IRES трансляции у субтипов 1a, 1b, 3a, 4a и 5a различается незначительно [18]. Таким образом, возможно, принадлежность 5'UTR области рекомбинантных вариантов к генотипу 2

обеспечивает им селективное преимущество, связанное с повышением эффективности IRES трансляции у генотипа 2.

3'UTR область генома ВГС состоит из трех участков: варибельного (27–70 н.о.); polyU/UC участка, размер которого коррелирует со способностью вирусной РНК к репликации; высококонсервативного X-РНК (98 н.о.) участка, который имеет сложную вторичную структуру и принимает участие в инициации репликации, стабилизации и упаковке вирусного генома [19].

Структурные белки

Первая треть генома ВГС кодирует структурные белки: капсидный белок (core) и два гликопротеиновых белка оболочки (E1 и E2). У рекомбинантов эти белки получены от генотипа 2.

Основной функцией core-белка (21–23 кДа) независимо от генотипа является формирование нуклеокапсида, инициация упаковки генома и сборки оболочки вириона. Помимо участия в морфогенезе вируса core-белок взаимодействует с различными клеточными регуляторными белками и некоторыми структурными элементами клетки: с белком p53, с сигнальным комплексом TNF-R1-TRADD-TRAF2 и рецептором фактора некроза опухолей TNF-R1, с p38 MAPK (митоген-активирующая протеинкиназа); усиливает действие STAT3 (активатор транскрипции), ингибирует активность каспазы-3; взаимодействует с микротрубочками клетки и влияет на скорость их полимеризации, что свидетельствует в пользу его участия в транспорте вирусной частицы как при проникновении в клетку, так и при сборке вириона [20–23]. Core-белок, ассоциированный с поверхностью липидных капелек, «подтягивает» неструктурные вирусные белки и репликативные комплексы к липидным капелькам-ассоциированным мембранам, что является необходимым для продукции инфекционных вирионов [24]. Посредством взаимодействия с липидными капельками и вследствие положительной регуляции биосинтеза жирных кислот в клетке core-белок играет значительную роль в развитии стеатоза у больных ХГС; посредством взаимодействия с SOCS-1 (супрессор сигнального цитокина) или инактивации опухолевого супрессора белка промиелоцитарного лейкоза (tumor suppressor PML) он может стимулировать развитие первичного рака печени [25].

На участке генома, соответствующем core-белку, располагается короткая альтернативная рамка считывания, кодирующая короткоживущий белок F (17 кДа) [26]. Предполагают, что данный белок играет роль в морфогенезе вируса и патогенезе развития гепатокарциномы, поскольку антитела к этому белку выявляются более чем у 50 % больных ХГС

с первичным раком печени и только у 25 % больных ХГС [27].

Гликопротеины оболочки E1 (31 кДа) и E2 (70 кДа) являются трансмембранными белками I типа с эктодоменами на N-конце и гидрофобными якорными доменами на C-конце, основная функция которых — проникновение вириона в клетку [2]. В белке E2 имеются три гиперварибельных участка (HVR), мутации в которых, особенно в HVR1, способствуют персистенции вируса, обеспечивая непрерывное формирование новых антигенных вариантов. Нековалентные гетеродимеры E1/E2 принимают участие в связывании с лектиновыми рецепторами C-типа (DC-SIGN и L-SIGN), расположенными на поверхности дендритных, эндотелиальных и Т-клеток, которые захватывают вирусные частицы и способствуют их транспорту к гепатоцитам через эндотелий [28]. Установлена способность белков E1 и E2 связываться с трансмембранными белками claudin-1 (CLDN-1) и occludin (OCLN), которые способствуют образованию плотных контактов между мембранами эпителиальных клеток, блокируя и контролируя свободное перемещение макромолекул, жидкостей и ионов [29, 30]. Белок E2 взаимодействует с трансмембранными рецепторами — тетраспанином CD81 и липопротеиновым скавенджер-рецептором класса В типа I (SR-BI), который обеспечивает селективный «захват» гепатоцитом холестерина эфира от липопротеинов высокой плотности, содержащих аполипопротеин А [31, 32].

В экспериментах *in vitro* было показано, что белок E2 имеет консервативный участок из 12 а.о. (PePHD домен), аминокислотный состав которого (только субтипа 1b) полностью гомологичен сайту фосфорилирования рибосомального фактора инициации транскрипции eIF2 α , в результате чего белок E2 субтипа 1b может блокировать каталитическую функцию протеинкиназы R (PKR) [33]. Поскольку белок E2 (367 аа) рекомбинантных вариантов принадлежит к генотипу 2, аминокислотный состав его PePHD домена отличается как минимум по двум (E652Q и L668H) из 12 позиций от такового изолятов субтипа 1b и, соответственно, не имея родства к PKR, не может блокировать функцию PKR (Рис. 2).

Неструктурные белки

Две трети генома ВГС кодируют неструктурные белки: p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B (Рис.1). Сразу за структурными белками на полипротеине располагается небольшой гидрофобный белок p7, от способности которого создавать ионные каналы в липидных мембранах зависит процесс сборки вирионов ВГС, что делает данный белок

важной мишенью для разработки новых противовирусных препаратов [34].

Белок NS2 (23 кДа) и аминоконцевой домен белка NS3 образуют цинк-зависимую металло-автопротеазу, обеспечивающую протеолитический процессинг NS2/NS3 [2]. Следует отметить, что именно в этой области располагается сайт рекомбинации у всех межгенотипных рекомбинантов ВГС (Табл. 1). У рекомбинанта ВГС RF2k/1b, успешно распространяющегося в популяции, точка рекомбинации картирована в кодоне Val/Ile (949), расположенном сразу перед консервативным участком Tyr-Asp/Asn-His-Leu (950–953), который включает гистидин (His952), ассоциированный с энзиматической активностью NS2-NS3 протеазы [6, 7]. Наличие этого консервативного участка в области сайта рекомбинации могло не только способствовать рекомбинационным событиям, но и обусловить появление «жизнеспособного» рекомбинантного варианта. После создания клеточной

модели Nuh7.5, эффективно экспрессирующей инфекционные вирионы JFH1 субтипа 2a (HCVcc), предположение о роли сайта рекомбинации в формировании жизнеспособного «потомства» было подтверждено в экспериментах *in vitro* [35]. Жизнеспособными в клеточной модели оказались только химеры 1a/2a, имевшие сайт рекомбинации внутри NS2 области или между NS2 и NS3 областями, тогда как потомство химеры с сайтом рекомбинации между p7 и NS2 генами так же, как и в более ранних экспериментах, было нежизнеспособно.

Белок NS3 (70 кДа) — многофункциональный белок: N-концевой домен является сериновой протеазой, которая обеспечивает процессинг NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A, NS5A/NS5B; C-концевой домен — хеликазой с нуклеозидтрифосфатазной/РНК-хеликазной активностью [2, 36]. Небольшой белок NS4A (8 кДа) играет роль ко-фактора сериновой протеазы NS3, существенно повышая ее эффективность [36]. Комплекс NS3-NS4A влияет

Рисунок 1. Организация генома ВГС (приведена по Lindenbach and Rice, 2005). Структурные гены (Structural) показаны темным прямоугольником, неструктурные гены (Nonstructural) — светлым. Альтернативная рамка считывания, кодирующая F-белок, указана небольшим темным прямоугольником. Сайты расщепления полипротеина клеточной сигнальной пептидазой указаны темными кругами, клеточной сигнальной пептид-пептидазой — светлым кругом, вирусными протеазами NS2-3 и NS3/4A — стрелками

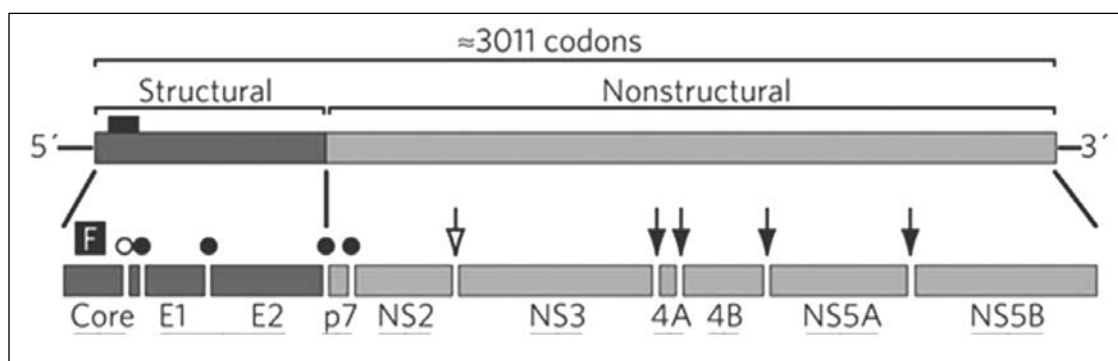


Рисунок 2. Аминокислотный состав RePHD области E2 белка рекомбинантных и референсных изолятов ВГС выделен пунктирной линией. Номера изолятов и их принадлежность к субтипам ВГС указаны справа. RF обозначает рекомбинантный вариант RF2k/1b

																				B																																																											
658										668										678										688																																																	
R	G	E	R	C	D	L	E	D	R	D	R	S	E	L	S	P	L	L	S	T	T	E	W	Q	T	L	P	C	S	F	T	T	L	P	A	L	S	T																																									
.....																																																																															
																																								HC-J4	1b																																						
																																										k1-s2	1b																																				
																																										589	1b																																				
																																										687	RF																																				
																																										674	RF																																				
																																										747	RF																																				
																																										796	RF																																				
																																										M21	RF																																				
																																										Vat96	2k																																				
																																										HCJ6	2a																																				
																																										CB	3a																																				
																																										NZL1	3a																																				
.....																																																																															

на клеточную защиту, ингибируя RIG-I (retinoic acid inducible gene) и TLR3 (Toll-like receptor 3) — сигнальные пути активации интерферонов IFN- α и IFN- β — посредством расщепления двух клеточных белков, MAVS (mitochondria-associated anti-viral signaling protein) и TRIF (Toll/interleukin-1 receptor domain containing adaptor inducing IFN- β), а также на ряд других клеточных функций [37]. В связи с этим NS3 представляет собой одну из наиболее привлекательных мишеней для антивирусной терапии.

Функция трансмембранного белка NS4B (27 кДа) изучена недостаточно. Установлено, что С-концевые элементы белка NS4B индуцируют на основе эндоплазматического ретикула (ЭР) формирование мембранной сети, богатой холестерином, необходимой для образования эффективного репликативного комплекса ВГС [36]. Белок NS4B также способен активировать различные клеточные белки, регулирующие жизненный цикл и онкогенную трансформацию клетки: Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), MMP-2 (matrix metalloproteinase-2), клеточные сигнальные каскады STAT3 (signal transducer and activators of transcription3) и семейство протеинкиназ C; супрессировать RIG-I опосредованную продукцию IFN- β посредством прямого взаимодействия с STING (stimulator of interferon genes) [38, 39].

Белок NS5A (56–58 кДа) — цинксодержащий фосфопротеин с цитоплазматической локализацией в ЭР, входит в состав репликативного комплекса ВГС и обеспечивает «платформу» для вовлечения белков, необходимых для репликации вирусной РНК [36]. В белке NS5A выделяют три домена, разделенных low complexity sequences (LCSs). Домен I обладает РНК-связывающей активностью. Домен II содержит PKR-связывающий участок (сайт ингибирования интерферон-индуцируемой протеинкиназы R). Полагают, что посредством этого сайта NS5A белок взаимодействует с каталитическим доменом протеинкиназы R, ингибируя ее активность [40]. В PKR-связывающем участке выделяют ISDR область (INF- α sensitivity determining region), мутации в которой, как показано в ряде исследований, ассоциированы с резистентностью изолятов ВГС только субтипа 1b к действию интерферона (Рис. 3) [40, 41]. Домен III включает вариабельную область V3, также участвующую в формировании резистентности изолятов ВГС субтипа 1b к интерферону [42, 43]. Недавно в качестве значимого маркера резистентности к комбинированной противовирусной терапии идентифицирована аминокислота в положении 2300, расположенная между ISDR/PKR-связывающим и V3-вариабельным доменами: наличие пролина (P) ассоциировалось с чувствительностью изолятов

ВГС к комбинированной терапии, тогда как наличие серина (S) — с резистентностью [43].

Белок NS5B (68 кДа) — РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp) с характерной для односубъединичных полимераз пространственной структурой «правой руки», способная инициировать синтез РНК как по праймер-зависимому, так и по праймер-независимому механизму [44–46]. На активность RdRp влияют как вирусные NS3 и NS5A, так и некоторые клеточные белки (кофакторы), вовлекаемые в репликацию генома, например, циклофилин А и В [47].

Отличительные особенности генетических детерминант устойчивости к интерферону межгенотипных рекомбинантных форм ВГС на примере RF2k/1b и RF2b/1b

Отличительной особенностью рекомбинантов RF2k/1b и RF2b/1b является принадлежность всех структурных генов к субтипам 2k и 2b соответственно, а большинства неструктурных — к наиболее «агрессивному» субтипу 1b. Можно предположить, что, с одной стороны, при определенных условиях 5'UTR область и структурные белки генотипа 2, которые отличаются как по качественному, так и количественному составу от таковых генотипов 1 и 3, обеспечивают селективное преимущество рекомбинантам для более эффективного взаимодействия вириона с поверхностью клетки-хозяина и начала трансляции полипротеина после распаковки вирусной РНК. С другой стороны, некоторые неструктурные белки ВГС субтипа 1b способствуют более эффективной репликации вируса внутри клетки, а также более успешно контролируют клеточный ответ на вирусное вторжение.

По крайней мере, два белковых домена, расположенные в структурном белке E2 (PePHD — участок гомологии сайта фосфорилирования PKR-eIF2 α) и в неструктурном белке NS5A (PKR-связывающий домен, включающий ISDR область (INF- α sensitivity determining region)) изолятов ВГС субтипа 1b, как было описано выше, играют роль в формировании устойчивости вируса к действию интерферона посредством непрямого взаимодействия с протеинкиназой R (PKR) [33, 40–41]. Однако до сих пор существуют противоречивые данные о реальном вкладе данных областей в формирование ответа на терапию интерфероном [42]. Поскольку все структурные гены природных рекомбинантов RF2k/1b и RF_2b/1b принадлежат к генотипу 2, то их PePHD домен в белке E2 не имеет сродства к PKR и, следовательно, не может участвовать в формировании резистентности ВГС к интерферону. В тоже время, белок NS5A рекомбинантных вариантов RF2k/1b и RF_2b/1b принадлежит к наиболее «агрессивно-

му» субтипу 1b. Аминокислотный профиль ISDR области белка NS5A рекомбинантов RF2k/1b, выделенных во всех регионах, и RF2b/1b, выделенных в Японии, полностью идентичен таковому у изолята HC-J4 субтипа 1b «дикого» типа, ассоциированного с устойчивостью к действию интерферона и, следовательно, может потенциально влиять на ответ при проведении интерферон-терапии (Рис. 3).

Таким образом, рекомбинанты ВГС обладают только одной из двух вышеперечисленных генетических детерминант, потенциально вовлеченных в формирование устойчивости к действию интерферона. Такая фенотипическая особенность рекомбинантов поможет оценить значение этих детерминант в естественных условиях при проведении терапии интерфероном.

Влияние рекомбинантных вариантов ВГС RF2k/1b и RF2b/1b на эффективность противовирусной терапии

К настоящему времени трем пациентам (N1764 и N1763 из Москвы, M21 во Франции), инфицированным природным рекомбинантом RF2k/1b, проведена по стандартной схеме ПБТ (монотерапия ИФН либо в комбинации с рибавирином) [48, 49]. Только у пациентки N1764 с коротким периодом инфицирования до начала ПБТ (через год после острого

гепатита С начато лечение) зарегистрирован УВО на монотерапию ИФН. На протяжении пяти лет после завершения 48-недельного курса монотерапии ИФН пациентка ежегодно проходила динамическое обследование, по результатам которого продолжал регистрироваться УВО.

Пациенту N1763 в связи с отсутствием раннего вирусологического ответа на монотерапию ИФН с 16-й недели была назначена комбинированная терапия стандартным ИФН с рибавирином. Однако в течение 8 недель по-прежнему отсутствовал вирусологический ответ на фоне биохимической ремиссии, которая наступила еще в первые 12 недель лечения. Более того, вирусная нагрузка стала возрастать, т.е. увеличилась эффективность репликации вирусного генома (Рис. 4). У пациента M21 после окончания 24-недельного курса комбинированной терапии пегилированным ИФН в комбинации с рибавирином, через три месяца был впервые идентифицирован рекомбинантный вариант вируса, хотя до начала терапии у пациента был выделен только изолят ВГС субтипа 3a. Проведенное по данному факту эпидемиологическое расследование исключило возможное реинфицирование пациента после окончания терапии [49]. Фактически данный пациент был инфицирован обоими вариантами ВГС. Вероятно, высокая вирусная нагрузка субтипа 3a

Рисунок 3. Аминокислотный состав ISDR/PKR-связывающего домена белка NS5A рекомбинантных и референсных изолятов. ISDR домен отмечен красным цветом

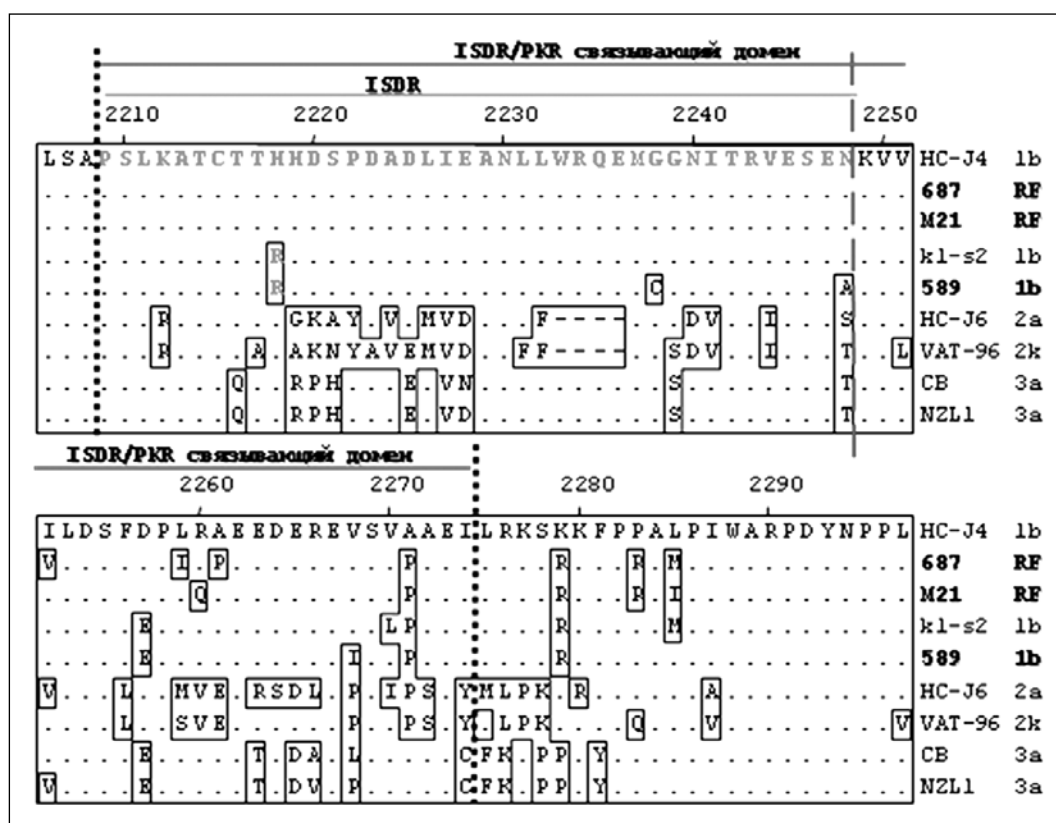
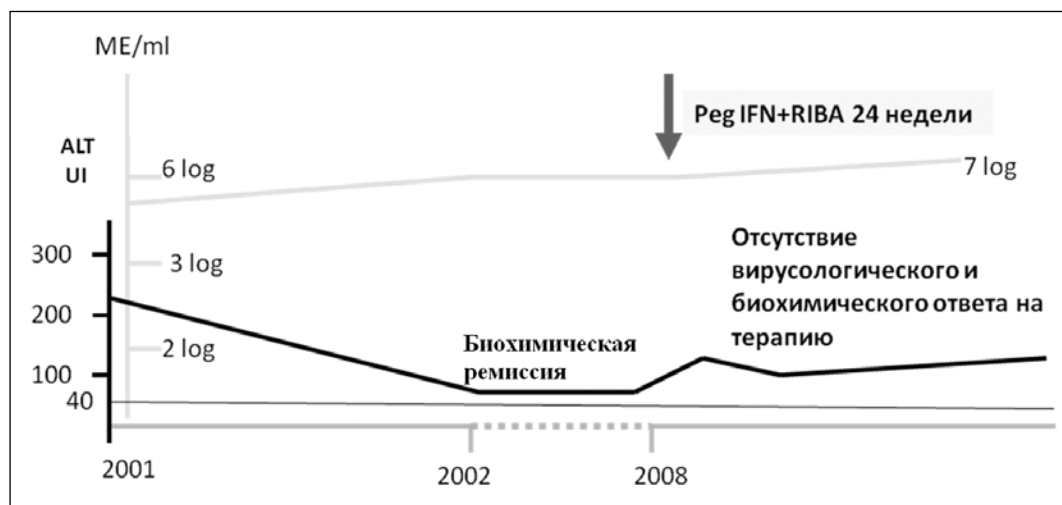


Рисунок 4. Уровень вирусной нагрузки и АЛТ у пациента N1763, инфицированного рекомбинантом ВГС RF2k/1b, на протяжении всего периода наблюдения. Вертикальная стрелка указывает начало повторной противовирусной терапии



до начала терапии не позволяла идентифицировать два варианта вируса.

Наличие устойчивого вирусологического ответа у пациентки N1764 можно объяснить совокупностью благоприятных факторов, влияющих на эффективность ПБТ, в числе которых решающими, вероятнее всего, были небольшая продолжительность заболевания, а также пол (женщины лучше отвечают на противовирусную терапию, чем мужчины) [9]. Отсутствие вирусологического ответа у пациентов N1763 и M21 свидетельствует в пользу того, что наличие аминокислотного профиля ISDR области гена NS5A «дикого» субтипа 1b является важным фактором для формирования резистентности к действию интерферона, тогда как наличие в E2 белке РePHD домена, способного взаимодействовать с PKR, не является фактором, обуславливающим такую резистентность в естественных условиях. В пользу этого свидетельствует тот факт, что два межгенотипных варианта RF2b/1b, имеющие аминокислотный профиль ISDR области гена NS5A «дикого» субтипа 1b и отсутствие в E2 белке РePHD домена, способного взаимодействовать с PKR, были выделены от двух не связанных эпидемиологически пациентов, у которых, как и в случае пациента N1763, при отсутствии стойкого вирусологического ответа на проводимую комплексную противовирусную терапию наблюдалось увеличение вирусной нагрузки на протяжении всего периода наблюдения (14–18 лет) [16].

Заключение

Как структурные, так и неструктурные белки ВГС в зависимости от генотипа способны взаимодействовать с различными клеточными белками, позитивно или негативно влияя на их функции. Изуче-

ние биологических свойств рекомбинантных вариантов ВГС, имеющих структурные и неструктурные белки различных генотипов, позволит лучше понять, какие молекулы и молекулярно-генетические механизмы вовлечены в процесс взаимодействия вируса с клетками «хозяина» при формировании персистенции, резистентности к используемым противовирусным препаратам, ускользании от надзора иммунной системы хозяина.

Данные результатов противовирусной терапии указывают на необходимость детального изучения влияния рекомбинантных вариантов ВГС на эффективность противовирусной терапии и исход заболевания.

Благодарности

Работа выполнена в рамках гранта Российского Научного Фонда (приоритетное направление деятельности РНФ «Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований отдельными научными группами», соглашение № 14–15–00546).

Литература

1. Choo Q.L., Richman K.H., Han J.H. et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1991. — Vol. 88, № 6. — P. 2451–2455.
2. Lindenbach B.D., Rice C.M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function // Nature. — 2005. — Vol. 436, № 7053. — P. 933–938.
3. World Health Organization. Hepatitis C. Fact sheet. — 2012. — № 164. / [Электронный ресурс]. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
4. Вирусные гепатиты в Российской Федерации / под ред. Онищенко Г.Г., Жебуна А.Б. — СПб: НИИЭМ им. Пастера, 2010 — 204 с.

5. *Simmonds P.* Viral heterogeneity of the hepatitis C virus // *J. Hepatol.* — 1999. — Vol. 31, Suppl. 1. — P. 54–60.
6. *Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., Magnus L.O.* A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg // *J. Virol.* — 2002. — Vol. 76, № 8. — P. 4034–4043.
7. *Kalinina O., Norder H., Magnus L.O.* Full-Length Open Reading Frame of a Recombinant hepatitis C Virus Strain from St. Petersburg: Proposed mechanism for its formation // *J. Gen. Virol.* — 2004. — Vol. 85, № 7. — P. 1853–1857.
8. *Smith D.B., Bukh J., Kuiken C. et al.* Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment WEB resource // *Hepatology.* — 2014. — Vol. 59, № 1. — P. 318–327.
9. *Ющук Н.Д., Климова Е.А., Знойко О.О. и др.* Протокол диагностики и лечения больных вирусными гепатитами В и С // *Росс. Журнал. Гас. Гепат. Колопрокт.* — 2010. — Vol. 20, № 6. — С. 4–60.
10. *Bhattacharya D., Accola M.A., Ansari I.H. et al.* Naturally occurring genotype 2b/1a hepatitis C virus in the United States // *Virol. J.* — 2011. — Vol. 8, № 458. / [Электронный ресурс]. doi:10.1186/1743-422X-8-458
11. *Lee Y.M., Lin H.J., Chen Y.J. et al.* Molecular epidemiology of HCV genotypes among injection drug users in Taiwan: Full-length sequences of two new subtype 6w strains and a recombinant form 2b/6w // *J. Med. Virol.* — 2009. — Vol. 82, № 1. — P. 57–68.
12. *Legrand-Abravanel F., Claudinon J., Nicot F. et al.* New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus // *J. Virol.* — 2007. — Vol. 81, № 8. — P. 4357–4362.
13. *Noppornpanth S., Lien T.X., Poovorawan Y. et al.* Identification of a Naturally Occurring Recombinant Genotype 2/6 Hepatitis C Virus // *J. Virol.* — 2006. — Vol. 80, № 15. — P. 7569–7577.
14. *Kageyama S., Agdamag D.M., Alesna E.T. et al.* A natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines // *J. Med. Virol.* — 2006. — Vol. 78, № 11. — P. 1423–1428.
15. *Yokoyama K., Takahashi M., Nishizawa T. et al.* Identification and characterization of a natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant hepatitis C virus in Japan // *Arch. Virol. J.* — 2011. — Vol. 156. — P. 1591–1601.
16. *Hoshino H., Hino K., Miyakawa H., Takahashi K.* Inter-genotypic recombinant hepatitis C virus strains in Japan noted by discrepancies between immunoassay and sequencing // *J. Med. Virol.* — 2012. — Vol. 1024. — P. 1018–1024.
17. *Spahn C.M., Kieft J.S., Grassucci R.A. et al.* Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit // *Science.* — 2001. — Vol. 291, № 5510. — 1959–1962.
18. *Collier A.J., Tang S., Elliott R.M.* Translation efficiencies of the 5' untranslated region from representatives of the six major genotypes of hepatitis C virus using a novel bicistronic reporter assay system // *J. Gen. Virol.* — 1998. Vol. 79, № 10. — P. 2359–2366.
19. *Kolykhalov A.A., Mihalik K., Feinstone S.M., Rice C.M.* Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo // *J. Virol.* — 2000. — Vol. 74, № 4. — P. 2046–2051.
20. *Lu W., Lo S.Y., Chen M. et al.* Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein // *Virology.* — 1999. — Vol. 264, № 1. — P. 134–141.
21. *Yoshida T., Hanada T., Tokuhisa T. et al.* Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation // *J. Exp. Med.* — 2002. — Vol. 196, № 5. — P. 641–653.
22. *Tsutsumi T., Suzuki T., Moriya K. et al.* Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38 MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice // *Hepatology.* — 2003. — Vol. 38, № 4. — P. 820–828.
23. *Roohvand F., Maillard P., Lavergne J.P. et al.* Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein // *J. Biol. Chem.* — 2009. — Vol. 284, № 20. — P. 13778–13791.
24. *Miyazawa Y., Atsuzawa K., Usuda N. et al.* The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production // *Nat. Cell Biol.* — 2007. — Vol. 9, № 9. — P. 1089–1097.
25. *Miyoshi H., Fujie H., Shintani Y. et al.* Hepatitis C virus core protein exerts an inhibitory effect on suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 gene expression // *J. Hepatol.* — 2005. — Vol. 43, № 5. — P. 757–763.
26. *Vassilaki N., Mavromara P.* Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame // *J. Biol. Chem.* — 2003. — Vol. 278, № 42. — P. 40503–40513.
27. *Dalagiorou G., Vassilaki N., Foka P. et al.* High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma // *J. Gen. Virol.* — 2011. — Vol. 92, № 6. — P. 1343–1351.
28. *Cormier E., Durso R.J., Tsamis F. et al.* L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101, № 39. — P. 14067–14072.
29. *Evans M.J., von Hahn T., Tscherne D.M. et al.* Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry // *Nature.* — 2007. — Vol. 446, № 7137. — P. 801–805.
30. *Ploss A., Evans M.J., Gaysinskaya V.A. et al.* Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells // *Nature.* — 2009. — Vol. 457, № 7231. — P. 882–886.
31. *Pileri P., Uematsu Y., Campagnoli S. et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81 // *Science.* — 1998. — Vol. 282, № 5390. — P. 938–941.
32. *Heo T.H., Lee S.M., Bartosch B. et al.* Hepatitis C virus E2 links soluble human CD81 and SR-B1 protein // *Virus Res.* — 2006. — Vol. 121, № 1. — P. 58–64.
33. *Taylor D.R., Shi S.T., Romano P.R. et al.* Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein // *Science.* — 1999. — Vol. 285, № 5424. — P. 107–110.

34. *Steinmann E., Pietschmann T.* Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy // *Viruses*. — 2010. — Vol. 2, № 9. — P. 2078–2095.

35. *Yi M., Ma Y., Yates J., Lemon S.M.* Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus // *J. Virol.* — 2007. — Vol. 81, № 2. — P. 629–638.

36. *Moradpour D., Penin F., Rice C.M.* Replication of hepatitis C virus // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2007. — Vol. 5, № 6. — P. 453–463.

37. *Meylan E., Curran J., Hofmann K. et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus // *Nature*. — 2005. — Vol. 437, № 7062. — P. 1167–1172.

38. *Li Y., Zhang Q., Liu Y. et al.* Hepatitis C virus activates Bcl-2 and MMP-2 expression through multiple cellular signaling pathways // *J. Virol.* — 2012. — Vol. 86, № 23. — P. 12531–12543.

39. *Nitta S., Sakamoto N., Nakagawa M. et al.* Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity // *Hepatology*. — 2013. — Vol. 57, № 1. — P. 46–58.

40. *Gale M.Jr., Blakely C.M., Kwieciszewski B. et al.* Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus non-structural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation // *Mol. Cell Biol.* — 1998. — Vol. 18, № 9. — P. 5208–5218.

41. *Enomoto N., Sakuma I., Asahina Y. et al.* Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection // *New Eng. J. Med.* — 1996. — Vol. 334, № 2. — P. 77–81.

42. *Kumthip K., Pantip C., Chusri P. et al.* Correlation between mutations in the core and NS5A genes of hepatitis C virus genotypes 1a, 1b, 3a, 3b, 6f and the response to pegylated interferon and ribavirin combination therapy // *J. Viral. Hepat.* — 2011. — Vol. 18, № 4. — P. 117–125.

43. *Bouzgarrou N., Hassen E., Mahfoudh W. et al.* NS5A (ISDR-V3) region genetic variability of Tunisian HCV-1b strains: Correlation with the response to the combined interferon/ribavirin therapy // *J. Med. Virol.* — 2009. — Vol. 81, № 12. — P. 2021–2028.

44. *Bressanelli S., Tomei L., Roussel A. et al.* Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus // *PNAS*. — 1999. — Vol. 96, № 23. — P. 13034–13039.

45. *Luo G., Hamatake R.K., Mathis D.M. et al.* De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus // *J. Virol.* — 2000. — Vol. 74, № 2. — P. 851–863.

46. *Ranjith-Kumar C.T., Gutshall L., Kim M.J. et al.* Requirements for de novo initiation of RNA synthesis by recombinant flaviviral RNA-dependent RNA polymerases // *J. Virol.* — 2002. — Vol. 76, № 24. — P. 12526–12536.

47. *Watashi K., Ishii N., Hijikata M. et al.* Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase // *Mol. Cell*. — 2005. — Vol. 19, № 1. — P. 111–122.

48. *Знойко О.О.* Клинико-патогенетические особенности естественного течения вирусного гепатита

С и оптимизация лабораторно-диагностических критериев исходов заболевания: автореф. дис. докт. мед. наук. — М., 2007. — 44 с.

49. *Morel V., Descamps V., François C. et al.* Emergence of a genomic variant of the recombinant 2k/1b strain during a mixed hepatitis C infection: a case report // *J. Clin. Virol.* — 2010. — Vol. 47, № 4. — P. 382–386.