

1-2/2006

СУЧАСНІ ІНФЕКЦІЇ

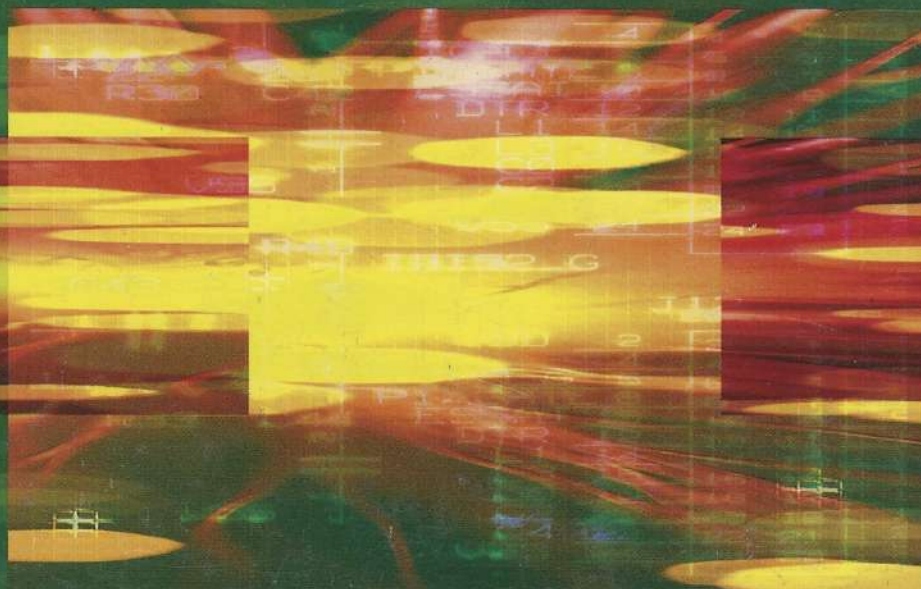
На допомогу практичному лікарю

МОЗ повідомляє

Оригінальні дослідження

Випадки з практики

Огляди, лекції



УДК: 616.36-002-002: 615.371

НЕКОТОРЫЕ МУТАЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ ПРОБЛЕМЫ ВАКЦИНАЦИИ

О.А. ГОЛУБОВСКАЯ

*Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца,
кафедра инфекционных болезней*

*ключевые слова:
гепатит В, мутации,
вакцинация*

Вст *упление*. В настоящее время во всем мире насчитывается 350 млн людей, инфицированных вирусом гепатита В (ВГВ). У 5-10% взрослых после перенесенной инфекции развивается хронический вирусный гепатит В (ХВГВ). От одного до двух миллионов человек ежегодно умирает от осложнений, вызванных этим вирусом. Распространенность вируса по земному шару неоднородна. Высокий уровень инфицированности характерен для популяций Азиатско-Тихоокеанского региона и стран Центральной Африки. В случае прогрессирования хронического вирусного гепатита В частота развития первичной гепатоцеллюлярной карциномы, цирроза печени и связанных с ним тяжелых осложнений достигает 80%. Дети, рожденные HbeAg-положительными женщинами, имеют 90% вероятность перинатального инфицирования. Как и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), ВГВ передается парентеральным, половым путем и вертикальным путем. При этом вирус гепатита В в 100 раз более контагиозен, чем ВИЧ.

Все вышесказанное диктует актуальность поисков эффективной профилактики

этого заболевания, прежде всего специфической путем вакцинации.

Первые попытки создать вакцину против гепатита В были предприняты после наблюдения, сделанного Кругманом с соавторами в 1971 году, когда было выявлено, что кровь хронических носителей, подогретая в течение 1 минуты до 100 градусов защищает от инфицирования. По этому принципу в 1982 году во Франции были созданы первые плазменные вакцины, приготовленные из плазмы носителей ВГВ. В настоящее время распространенность этих вакцин невелика в связи с высоким риском передачи с вакцинами других патогенных агентов, обладающих инфекционными свойствами (вирусов, вирионов, прионов).

В настоящее время созданы генно-инженерные вакцины на основании рекомбинантной ДНК, когда в генетический материал обычных пекарских дрожжей вводится ген вируса гепатита В, отвечающий за продукцию HbsAg. Преимуществом таких вакцин является полное отсутствие клеток крови в цикле производства, низкое содержание балластных веществ и стабильное, точно измеряемое количество активного компонента (HbsAg). Эффективность этих вакцин, оценивая по результатам образования антител к HbsAg (антиHbs), довольно высока. Однако, так ли

безопасно проведение массовых обязательных вакцинаций (вакцина против гепатита В введена в календарь прививок Украины), насколько они эффективны и насколько оправдана их масштабность (особенно в регионах с невысоким уровнем инфицированности, к которому относится и наша страна), к каким последствиям это может привести в дальнейшем?

Чтобы попытаться ответить на эти вопросы, необходимо вспомнить структуру вируса гепатита В и его основные свойства. Вирус гепатита В относится к гепаднавирусам и состоит из генома и 2-х оболочек — HbsAg (поверхностного) и HbcAg (сердцевинного). Геном вируса гепатита В представляет собой кольцевую частично двухцепочечную молекулу ДНК размером приблизительно в 3200 пар оснований. В его составе имеется 4 частично перекрывающихся так называемых открытых рамки считывания (ОРС), кодирующие синтез антигенов оболочки (pre S/S), белков сердцевинины (или нуклеокапсида вируса (pre-core/core)), маркер синтеза ДНК-полимеразы и синтез протеина Х. ОРС pre S/S кодирует синтез поверхностных протеинов. ОРС считывания pre-core/core транслируется в pre-core полипептид, который в дальнейшем модифицируется в растворимый белок — HBeAg (е-антиген вируса гепатита В), и нуклеокапсидный белок — HbcAg. Именно на этих уровнях происходит большинство изменений. На сегодняшний день уже описано множество мутаций, затрагивающие вирусные белки, что заставляет задуматься о том, будут ли вакцины эффективны в будущем, во-первых, и, во-вторых, к каким последствиям может привести наша жажда к искоренению тех или иных заболеваний в глобальном масштабе.

Что же такое мутации? На языке генетики "мутант" (mutate — изменяться) — это ген, или хромосома, организм или популяция, отличающиеся от дикого типа каким-либо признаком (мутацией). В свою очередь, мутация — это относительно постоянное, наследуемое изменение генетического материала. Мутации могут приводить к синтезу дефектного, неактивного белка или к потере способности продуцировать ранее

синтезируемые белки. Они могут возникать спонтанно или под воздействием внешних мутагенов. В целом, разные генетические варианты, сосуществующие в клетке или организме, называются "квазивидами". Возникновение мутантов вируса в организме человека является сложным процессом и представляет собой попытку вируса противостоять иммунологической атаке организма (в том числе и вакцинированной) для того, чтобы выжить. Количество и распространенность некоторых мутантов ВГВ в сыворотке больных с ХВГВ постоянно изменяется. Неравномерно их и географическое распределение. Наиболее часто они распространены в тех регионах, где постоянно высокий уровень инфицированности ВГВ. Кстати, первые массовые вакцинации были одобрены и проведены именно в этих частях света, и здесь же появились через несколько лет первые сообщения о возникновении мутантных штаммов вируса.

Первичные точечные мутации предоставляют возможность вирусу выйти из-под иммунологического контроля. Но последующие генерации мутантов отбираются как результат летальных иммунных реакций против первой генерации, т.е. выживает сильнейший. Таким образом, со временем антигенная структура вируса становится все запутанней и сложней, следовательно, иммунной системе хозяина становится все трудней и трудней "отлавливать" вирус и избавляться от него посредством иммунологических реакций.

ВГВ оказался более подвержен мутациям, чем предполагалось ранее. Это связано с тем, что во время его репликации происходит обратная транскрипция РНК пре-генома, а этот процесс, как известно, не защищен от ошибок в результате отсутствия возможности проверки считывания информации. Мутантные штаммы были идентифицированы у пациентов с различным течением гепатита (острым, фульминантным, хроническим). Все мутации сгруппированы в 3 группы, но на формирование поствакцинального иммунитета влияют мутации, затрагивающие локусы preS/S гена. Мутантные штаммы в организме одного и того же индивидуума могут сосуществовать с диким типом вируса. В

этом случае различные матрицы ДНК дополняют друг друга. Впервые о существовании мутантов ВГВ (HBV) предположили, когда у больных хроническим гепатитом В обнаруживалась ДНК вируса, но не было обнаружено серологических маркеров активной или перенесенной инфекции, а именно отсутствовал HbsAg или анти-HBs соответственно. В результате длительной персистенции HBV-инфекции в организме мутации могут накапливаться и приводить к клинически выраженным последствиям. Высокая репликативная активность вируса (высвобождение до 10¹¹ вирусных частиц в день), а также иммунный и терапевтический прессинг в этом отношении играют решающую роль. Некоторые мутации могут приводить к серьезным последствиям на различных уровнях. Снижение вирусного клиренса под действием иммунных механизмов или антивирусной терапии носит название "иммунного бегства" или "терапевтического бегства" соответственно. Мутации генов оболочки приводят к снижению или полному отсутствию детекции (обнаружения) вируса тестами, базирующимися на использовании антител к дикому типу вируса ("диагностического бегства") или не распознаванию нейтрализующими антителами, индуцированными вакцинацией ("вакцинозное бегство"). Рассмотрим механизмы некоторых наиболее часто встречающихся мутаций, связанных с пре-S и S-геном и влияющих на формирование иммунитета против ВГВ.

Мутанты пре-S и S-гена. Эти мутанты представляют особый интерес, т.к. они влияют на иммуногенность HBsAg, особенно α-детерминанты (против которой вырабатываются нейтрализующие антитела), и являются причиной возникновения так называемых "мутантов вакцинного бегства" и мутантов "иммунного бегства".

Поиск этих мутантов начался после того, как появились сообщения о пациентах, либо HbsAg-негативных/анти Hbs-позитивных, либо анти Hbs-позитивных, либо не имеющих маркеров HBV инфекции и содержащих ДНК вируса в крови. На сегодняшний день зарегистрировано огромное количество мутантов, которые не распознаются тест-системами, содержащими

HbsAg-тест. Повышенный интерес к мутантам S-гена появился после идентификации мутантов так называемого "вакцинозного бегства" у детей, рожденных HbeAg-позитивными женщинами и, несмотря на полный курс активно-пассивной профилактики, заболевших гепатитом В. Интересно, что HbsAg и анти Hbs циркулировали у этих детей одновременно (одномоментная циркуляция в организме человека этих маркеров является косвенным доказательством наличия у него преS/S мутантов). HbsAg-мутанты "вакцинозного бегства" чаще всего существуют в виде составной части вирусных квазивидов. Наиболее часто встречаемой мутацией такого типа является замена глицина на аргинин в 145 положении Hbs4 региона. Этот мутант был обнаружен при проведении исследований в Сингапуре, Италии, Японии, Тайване, Индонезии и Брунее. В США при обследовании детей, рожденных HBV-носительницами, было обнаружено значительное количество случаев приобретенной хронической инфекции, несмотря на проведенную полную пассивно-активную иммунизацию. У 23% таких детей была обнаружена замена одной или более аминокислот α-детерминанты, чаще всего в положении 142-145. Такие вновь образованные штаммы способны как к горизонтальному, так и к вертикальному распространению, а также к размножению.

Введение с профилактической целью противовирусного иммуноглобулина (HBIG) также может привести к возникновению мутаций. Известно, что при трансплантации печени у больных с тяжелыми последствиями гепатита В возможно реинфицирование трансплантата, что может привести к гибели больного. Когда для предупреждения реинфекции донорского органа после трансплантации вводится HBIG, создаются оптимальные условия для индукции мутаций. Особенностью этих мутантов является то, что они возникают в присутствии больших титров антител, небольшого количества вируса и большого числа неинфицированных гепатоцитов. Иммунный прессинг, оказываемый и моноклональными антителами и HBIG, приводит к селекции "мутантов бегства". Такие

мутации чаще всего наблюдаются в области, окружающей 145 кодон, и включают точечную мутацию G145R, которая также часто встречается у HbsAg-вакцинированных людей. Понятно, что одновременное введение HBsAg и HbsAg приводит к усиленной селекции мутаций "вакцинного бегства". На определенном этапе исследования возник вопрос, появляются ли эти штаммы *de novo* (в результате внешнего воздействия, например, вакцинации), или они происходят спонтанно из вариантов, получающих селективное преимущество перед диким типом. Было показано присутствие G145R и в природных штаммах вируса. На основе анализа 2001 сыворотки вирусносителей (либо лиц без клинических проявлений болезни) в районе Сингапура присутствие HBsAg мутантов выявлено у 0,8% участников исследования. В целом было обнаружено 16 новых мутантов, ни одно из обнаруженных изменений не затрагивало эпитопный кластер (139-147 аминокислоты) α -детерминанты, которая регулярно подвергается мутациям после проведения вакцинации против гепатита В или введения HBsAg. Это значит, что обнаруженные варианты не являются "мутантами бегства от нейтрализации", а относятся к естественным вариантам. Тем не менее, не исключено, что, если они могут избегать нейтрализации анти Hbs, значит, они могут инфицировать вакцинированных людей и распространение их будет увеличиваться по мере того, как будет расти охват населения вакцинацией. Другими словами, массовая вакцинация "помогает" широкому распространению вышеописанных мутаций. Пре-S1 и пре-S2 регионы представлены на поверхности HBV частицы и являются высокоиммуногенными, следовательно, потенциальными мишенями для отбора со стороны иммунной системы хозяина. Некоторые мутации в этой области приводят к тому, что нарушается клиренс вируса при сохранении его способности прикрепляться к гепатоцитам с последующим проникновением внутрь клетки. Это в последствии приводит к хронизации процесса. Самое опасное, что некоторые из этих мутантов могут получать преимущество в условиях,

когда иммунологические реакции направлены на уничтожение дикого типа HbsAg. Было высказано предположение, что если вводить в будущие вакцины пре-S детерминанты, это приведет к появлению пре-S делеции и "мутантов бегства" у вакцинируемых.

Некоторые мутации в S и пре-S регионах связывают с развитием гепатоцеллюлярной карциномы. В последнее время обнаружены новые вакцин-ассоциированные HBsAg мутанты вне α -детерминанты, их значение сейчас изучается.

Исследования, проведенные в различных частях света, продемонстрировали существование и других мутантов, названных мутантами "диагностического бегства", что приводит к диагностическим ошибкам и ошибкам в определении субтипа вируса. Эти данные означают: во-первых, что разрабатываемые HBsAg-тесты должны быть адаптированы с учетом местных вариантов последовательностей, и, во-вторых, диагностические тест-системы должны иметь высокую чувствительность.

Выводы. Принимая во внимание все вышесказанное, шансы мутанта на выживание и возможность распространяться в популяции, довольно высоки. Нельзя игнорировать и тот факт, что многие другие вирусы — гепатита А, гепатита С, вирусы простого герпеса, полиовирусы, наконец, ВИЧ — также демонстрируют значительное генетическое разнообразие и образуют мутанты, которые "отбираются" под действием нейтрализующих антител. Это делает весьма правдоподобной мысль о том, что, когда вакцинальные программы станут проводиться повсеместно, частота появления "мутантов бегства" еще более возрастет. В любом случае, список различных типов HBV мутантов будет становиться все длиннее и длиннее. Нельзя исключать, что нарастающее давление отбора будет способствовать тому, что мутантные штаммы догонят дикий тип и даже достигнут сравнимого уровня распространения. Все это является поводом для беспокойства, учитывая способность мутантных штаммов ВГВ "прятаться" от современных диагностических тест-систем, вызывать более тяжелые формы

заболевания и давать более высокий процент хронизации. Также все вышесказанное ставит, мягко говоря, под сомнение саму идею массовых обязательных вакцинаций против гепатита В. Опуская вопрос о побочных эффектах и безопасности вакцин (это тема отдельного разговора), нельзя забывать слова известного ученого-генетика, лауреата Нобелевской премии Чар

Гофа, который на Гарвардской конференции еще в 1973 году категорически выступал "против игр в рекомбинантную ДНК", поскольку ее поведение в организме человека непредсказуемо. "Возникает проблема необратимости того, что предполагается совершить, — говорил он, — ибо нельзя отозвать обратно новую форму жизни".

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guido Francois, Michael Kew, Pierre Van Damme. Мутантные вирусы гепатита В: предмет исключительно академического интереса или проблема с далеко идущими последствиями? — <http://hepatit.ru/reviews/immuno1.gif>
2. Koff RS. Problem hepatitis viruses: the mutants. *Am J Med* 1994;96(Suppl 1A):52S-6S.
3. Jilg W. Novel hepatitis B vaccines. *Vaccine* 1998;16:S65-8.
4. Viral Hepatitis Prevention Board. VHPB consensus statement on HBV mutants and variants. *Viral Hepatitis* 1999;Fact Sheet 4:1-2.
5. Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995;38:24-34.
6. Ohba K., Mizokami M., Ohno T., et al. Relationships between serotypes and genotypes of hepatitis B virus: genetic classification of HBV by use of surface genes. *Virus Res* 1995;39:25-34.
7. Krugman S., Stevens CE. Hepatitis B vaccine. In: Plotkin SA, Mortimer EA, editors. *Vaccines*. Philadelphia: Saunders, 1994:419-37.
8. Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990;336:325-9.
9. Waters J.A., Kennedy M., Voet P., et al. Loss of the common "α" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *J Clin Invest* 1992;90:2543-7.
10. Carman W.F., Van Deursen F.J., Mimms L.T., et al. The prevalence of surface antigen variants of hepatitis B virus in Papua New Guinea, South Africa, and Sardinia. *Hepatology* 1997;26:1658-66.
11. Carman W.F., Mimms L.T. Pre-S/S gene variants of hepatitis B virus. In: Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, editors. *Viral hepatitis and liver disease*. Turin: Edizioni Minerva Medica, 1997:108-15.
12. Hess C., Karayiannis P., Rabiell R., Thomas H.C. Variants of the hepatitis B virus: a diagnostic and vaccine challenge. In: Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, editors. *Viral hepatitis and liver disease*. Turin: Edizioni Minerva Medica, 1997:974-6.
13. Domingo E., Sabo D., Taniguchi T., Weissmann C. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* 1978;13:735-44.
14. Blum H.E. Variants of hepatitis B, C and D viruses: molecular biology and clinical significance. *Digestion* 1995;56:85-95.
15. Chuang W.L., Omata M., Ehata T., Yokosuka O., Ohto M. Concentrating missense mutations in core gene of hepatitis B virus. Evidence for adaptive mutation in chronic hepatitis B virus infection. *Dig Dis Sci* 1993;38:594-600.
16. Feitelson M., Lega L., Guo J., et al. Pathogenesis of posttransfusion viral hepatitis in children with thalassemia. *Hepatology* 1994;19:558-68.
17. Mimms L. Hepatitis B virus escape mutants: "pushing the envelope" of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1995;21:884-7.
18. Tu H., Xiong S.D., Trepco C., Wen Y.M. Frequency of hepatitis B virus e-minus mutants varies among patients from different areas of China. *J Med Virol* 1997;51:85-9.
19. Nowak M.A., Bonhoeffer S, Hill A.M., Boymeh R., Thomas H.C., McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4398-402.
20. Blum H.E., Moradpour D., von Weizsacker F., Wieland S., Peters T., Rasenack J.W.S. Hepatitis-B-Virusmutanten — Klinische Bedeutung. *Z Gastroenterol* 1997;35:347-55.
21. Carman W.F., Jacyna M.R., Hadziyannis S., et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989;2:588-91.
22. Kramvis A., Bukofzer S., Kew M.C., Song E. Nucleic acid sequence analysis of the precore region of the hepatitis B virus from sera of southern

African black adult carriers of the virus. — *Hepatology* 1997;25:235-40.

23. Akarca U.S., Greene S., Lok A.S. Detection of precore hepatitis B virus mutants in asymptomatic HBsAg-positive family members. — *Hepatology* 1994;19:1366-70.

24. Hamasaki K., Nakata K., Nagayama Y., et al. Changes in the prevalence of HBeAg-negative mutant hepatitis B virus during the course of chronic hepatitis B. *Hepatology* 1994;20:8-14.

25. Lai M.E., Solinas A., Mazzoleni A.P., et al. The role of pre-core hepatitis B virus mutants on the long-term outcome of chronic hepatitis B virus hepatitis. A longitudinal study. *J Hepatol* 1994;20:773-81.

26. Lee Y.I., Hur G.M., Suh D.J., Kim S.H. Novel pre-C/C gene mutants of hepatitis B virus in chronic active hepatitis: naturally occurring escape mutants. *J Gen Virol* 1996;77:1129-38.

27. Laras A., Koskinas J., Avgidis K., Hadziyanis S.J. Incidence and clinical significance of hepatitis B virus precore gene translation initiation mutations in e antigen-negative patients. *J Viral Hepatitis* 1998;5:241-8.

28. Li J.S., Tong S.P., Wen Y.M., Vitvitski L., Zhang Q., Trepo C. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *J Virol* 1993;67:5402-10.

29. Mangia A., Chung Y.H., Hoofnagle J.H., Birkenmeyer L., Mushahwar I., di Bisceglie A.M. Pathogenesis of chronic liver disease in patients with chronic hepatitis B virus infection with serum HBeAg. *Dig Dis Sci* 1996;41:2447-52.

30. http://www.zaistinu.ru/old/skrest/sk/88_irods21.shtml

УДК: 616.36-002-002:615.371

О.А. Голубовська

Деякі мутації вірусу гепатиту В і пов'язані з ними проблеми щеплення

У статті подано огляд основних мутацій вірусу гепатиту В та їхній вплив на можливість щеплення проти HBV-інфекції. Показано, що поширення мutowаних штамів різко знижує ефективність щеплення.

UDC: 616.36-002-002:615.371

O.A. Golubovska

Some mutants of virus hepatitis B and problems of vaccination against HBV-infection

In the article some mutants of virus hepatitis B and problems of vaccination against HBV-infection are given.