

ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА И ГЕОГРАФИЯ ПРИРОДНОГО МЕЖГЕНОТИПНОГО РЕКОМБИНАНТА ВИРУСА ГЕПАТИТА С RF1_2k/1b

О.В. Калинина

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург

Резюме. Многие годы вирусный гепатит С (ГС) является одной из наиболее актуальных инфекционных патологий человека. За последнее десятилетие число зарегистрированных больных хроническим гепатитом С в Российской Федерации увеличилось вдвое и достигло 40,9‰. Согласно современной классификации, вирус гепатита С (ВГС) представлен 6 генотипами и более 200 субтипами. При этом постоянно появляются сообщения о новых, ранее не выявлявшихся вариантах вируса. Основным фактором, обуславливающим генетическое разнообразие ВГС, является высокая частота мутирования. Рекомбинацию как механизм, участвующий в формировании генетического разнообразия вида, долгое время не принимали во внимание, полагая, что возможные природные рекомбинанты ВГС нежизнеспособны. В 2002 г. в Санкт-Петербурге впервые в мире был выявлен природный межгенотипный рекомбинант ВГС RF1_2k/1b с абсолютно новыми фенотипическими характеристиками: его структурные гены принадлежат к субтипу 2k, а неструктурные — к субтипу 1b. С тех пор начались широкие исследования, посвященные поиску природных рекомбинантов ВГС. В данном обзоре представлены имеющиеся к настоящему времени сведения об организации генома вируса гепатита С и генома природного межгенотипного рекомбинанта ВГС RF1_2k/1b, а также сведения о его географическом распространении.

Ключевые слова: природный рекомбинант ВГС RF1_2k/1b, организация генома, география распространения.

GENOME ORGANIZATION AND GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF THE NATURAL INTERGENOTYPIC RECOMBINANT OF HEPATITIS C VIRUS RF1_2k/1b

Kalinina O.V.

Abstract. For many years, the viral hepatitis C is considered as one of the most actual infectious pathologies of human. During the last decade the number of registered cases of chronic viral hepatitis C in Russia increased two times and reached 40.9‰. According to the current virological classification, hepatitis C virus (HCV) is differentiated into 6 genotypes and more than 200 subtypes. At the same time, increasing number of publications report about novel genetic variants of HCV. A high mutation rate is considered to be a major factor behind HCV genetic diversity. Recombination as another mechanism for creating genetic variation was not recognized as important factor for generating the HCV diversity. For a long time it was believed that the natural recombinants of hepatitis C virus were not viable. The first inter-genotype HCV recombinant RF1_2k/1b was identified in 2002 in Saint-Petersburg. The structural genes of the recombinant strain were similar to those of the HCV subtype 2k, while its nonstructural genes (except for the part of the NS2 gene) belonged to the HCV subtype 1b. Since that time, many studies were initiated to indentify natural HCV recombinants. This review presents current data regarding the genomic organization of HCV and its natural inter-genotype recombinant RF1_2k/1b as well as information about circulation of this recombinant in the world. (*Infekc. immun.*, 2012, vol. 2, N 4, p. 677–686)

Key words: HCV natural recombinant RF1_2k/1b, genome organization, geographical distribution.

поступила в редакцию 10.06.2012
отправлена на доработку 13.06.2012
принята к печати 21.08.2012

© Калинина О.В., 2012

Адрес для переписки:

Калинина Ольга Викторовна,
к.б.н., ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярной микробиологии
ФБУН НИИЭМ имени Пастера

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИЭМ имени Пастера.
Тел./факс: (812) 233-21-49.
E-mail: olgakalinina@mail.ru

Уже более 20 лет вирусный гепатит С (ГС) занимает одно из ведущих мест в инфекционной патологии человека, что обусловлено частыми неблагоприятными исходами инфекции с развитием хронического гепатита, цирроза печени и гепатокарциномы. Согласно расчетным данным ВОЗ, во всем мире вирусным гепатитом инфицировано не менее 3% населения. Начиная с 2000 г., число зарегистрированных больных хроническим гепатитом С в Российской Федерации увеличилось вдвое и достигло 40,9 случаев на 100 000 населения [1].

Вирус гепатита С (ВГС) характеризуется высокой генетической вариабельностью, которая обеспечивает его ускользание от факторов иммунной защиты организма хозяина и затрудняет разработку эффективных методов специфической профилактики и лечения ГС. Основным фактором, обуславливающим генетическое разнообразие ВГС, является высокая частота мутирования, которая обусловлена, с одной стороны, отсутствием у РНК-зависимой РНК-полимеразы функции коррекции ошибочного включения нуклеотидов в процессе репликации генома (3'-5' экзонуклеазной активности), и селективным давлением иммунной системы хозяина, с другой стороны. Однако большинство нуклеотидных замен встречаются в синонимичных сайтах, поскольку их присутствие существенно не влияет на фенотип вируса. Высокая вариабельность генома ВГС позволила создать концепцию генотипов, субтипов и квазивидов, основанную на проценте гомологии нуклеотидных последовательностей [36]. За последнее десятилетие Международный генетический банк данных (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) значительно пополнился новыми полноразмерными нуклеотидными последовательностями геномов изолятов, в связи с чем в 2005 г. был пересмотрен статус номенклатуры генотипов ВГС [38]. Современная классификация ВГС включает 6 генотипов, согласно формирующимся ветвям филогенетического дерева, основанного на анализе полноразмерных нуклеотидных последовательностей генома. Гомология между генотипами составляет менее 69%. Уровень гомологии между различными субтипами внутри одного генотипа находится в пределах 75–80%. Изоляты, обладающие гомологией нуклеотидных последовательностей более 81%, принадлежат к одному и тому же субтипу [17, 38].

Рекомбинацию как другой механизм, участвующий в формировании генетического разнообразия вида, долгое время не принимали во внимание, полагая, что возможные природные рекомбинанты ВГС нежизнеспособны [37, 45], тогда как именно генетическая рекомбинация играет наиболее значительную роль в эволюции вирусов, приводя к созданию генетических вариантов, с абсолютно новыми

фенотипическими характеристиками, и как следствие, к возникновению новых тяжелых инфекционных болезней.

В 2002 г. в Санкт-Петербурге впервые в мире был идентифицирован природный рекомбинант ВГС, названный RF1_2k/1b [11], после чего во всем мире начались широкие исследования, посвященные поиску природных рекомбинантов ВГС. К настоящему времени выявлено еще пять вариантов межгенотипных рекомбинантов ВГС: 2i/6r (Вьетнам), 2b/1b (Филиппины), 2/5 (Франция), 2b/6w (Тайвань), 2b/1a (США) [19, 20, 29, 47], каждый из которых представлен пока единичным изолятом. Однако широкое распространение получил только природный рекомбинант RF1_2k/1b, который начиная с 2005 г. официально внесен в классификацию ВГС, как RF 01_1b/2k (рекомбинантная форма), а с 2009 как CRF 01_1b/2k (циркулирующая рекомбинантная форма) [17, 38].

В данном обзоре представлены имеющиеся к настоящему времени сведения об организации генома ВГС и генома природного межгенотипного рекомбинанта ВГС RF1_2k/1b, сведения о филогеографии выявленных изолятов этого рекомбинанта.

Организация генома и белки ВГС

Геном ВГС представлен (+)-цепью РНК длиной около 9600 нуклеотидов. Открытая рамка считывания (ORF) кодирует полипротеин, состоящий из 3011–3033 аминокислотных остатков согласно опубликованным последовательностям [3, 21, 30, 42]. На 5'-конце (5'UTR) ORF ограничена нетранслируемой высококонсервативной последовательностью длиной 341 нуклеотид, которая включает внутренний сайт связывания рибосомы IRES [39]. Гомология 5'UTR области внутри одного генотипа колеблется между 92–98%, тогда как между изолятами внутри субтипа достигает 98–99%. Поэтому данный район используется в лабораторной диагностике для определения РНК ВГС в клинических образцах. На 3'-конце (3'UTR) ORF находится нетранслируемая последовательность, состоящая из вариабельного участка длиной около 40 нуклеотидов, за которым следует polyU область (27–45 нуклеотидов), далее X-РНК (98 нуклеотидов), который принимает участие в инициации репликации вирусного генома [16, 42].

Полипротеин в результате ко- и посттрансляционного процессинга расщепляется вирусными и клеточными протеазами на структурные и неструктурные вирусные белки (рис. 1).

Первая треть генома кодирует структурные белки: капсидный белок (core) и два гликопротеиновых белка оболочки (E1 и E2). Капсидный белок (21–23 kDa) участвует в морфогенезе вируса, способен взаимодействовать с различными регуляторными белками клетки [22, 33, 34].

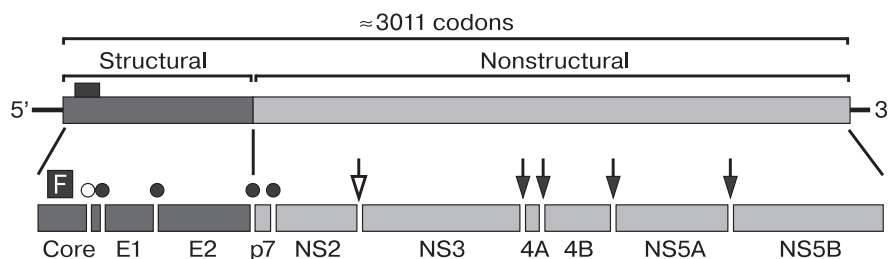


Рисунок 1. Организация генома вируса гепатита С (по В.Д. Lindenbach и С.М. Rice, 2005)

Структурные гены (Structural) показаны темным прямоугольником, неструктурные гены (Nonstructural) – светлым. Альтернативная рамка считывания, кодирующая белок F, указана небольшим темным прямоугольником, расположенным над открытой рамкой считывания. Сайты расщепления полипротеина клеточной сигнальной пептидазой указаны темными кругами, клеточной сигнальной пептидазой – светлым кругом. Стрелками отмечены сайты расщепления полипротеина вирусными протеазами. Название и функции белков полипротеина приведены в тексте.

Полагают, что он играет роль в развитие первичного рака печени у больных хроническим гепатитом С (ХГС) [22, 35]. Нуклеотидные последовательности, кодирующие капсидный белок, также характеризуются высокой гомологией выше 81% внутри одного генотипа, благодаря чему область 5'UTR/core генома используется для генотипирования изолятов ВГС в лабораторной диагностике [31].

Гликопротеины E1 (31 kDa) и E2 (70 kDa) являются трансмембранными белками, основная их функция — связывание и проникновение вириона в клетку [4, 24]. Область генома, кодирующая гликопротеины E1 и E2, наиболее вариабельна. На N-конце E2 находится гипервариабельный район (HVR1), высокая гетерогенность которого наблюдается даже между изолятами, выделенными от одного пациента в различные периоды заболевания [15]. Мутации в HVR1 способствуют формированию квазивидов и персистенции вируса. Кроме того, в экспериментах *in vitro* было показано, что гликопротеин E2 изолятов ВГС субтипа 1b, имеет консервативный участок, состоящий из 12 аминокислотных остатков (названный PePHD домен), идентичный участку фосфорилирования в рибосомальном факторе инициации транскрипции (eIF2 α), который может взаимодействовать с протеинкиназой R (PKR), ингибируя ее фосфолизирующую активность. Таким образом, E2 может участвовать в формировании резистентности вируса к интерферону [43].

Недавно несколькими группами исследователей был описан новый белок (17 kDa) ВГС (названный F или core+1/ARFP белок), образующийся в результате $-2/+1$ сдвига рибосомальной рамки считывания или начала синтеза с внутреннего иницирующего кодона (AUG85 или AUG87), расположенного в гене, кодирующем капсидный белок С [44, 46]. До сих пор белок F не обнаружен ни в образцах сыворотки крови, ни в биоптатах пациентов, инфицированных ВГС, тогда как антитела к этому белку выявляются у некоторых больных ХГС [2, 46].

Предполагается, что белок F играет роль в вирусном морфогенезе и патогенезе инфекции.

Между структурными и неструктурными белками располагается небольшой белок р7, обладающий способностью образовывать ионные каналы в липидных мембранах [26].

Две трети генома ВГС кодируют неструктурные белки: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B. Белок NS2 (23 kDa) и аминоконцевой домен белка NS3 образуют цинк-зависимую металлоавтопротеазу, которая обеспечивает протеолитический процессинг NS2 и NS3 между 1026/1027 аминокислотными остатками [8, 9]. Гистидин в позиции 952 и цистеин в позиции 993 необходимы для каталитической активности этого энзима [9]. Белок NS3 (70 kDa) — многофункциональный белок: N-концевой домен является сериновой протеазой, С-концевой домен — хеликазой и обладает нуклеозидтрифосфатазной/РНК-хеликазной активностью [7]. Белок NS4A (8 kDa) играет роль кофактора сериновой протеазы NS3, существенно повышая ее эффективность [32]. Комплекс NS3-NS4A влияет на клеточную защиту, ингибируя RIG-1 и TLR3 сигнальные пути активации интерферона, а также на ряд других клеточных функций [7, 25]. Функция белка NS4B (27 kDa) изучена недостаточно. Показано, что он оказывает влияние на репликацию ВГС; может связываться с некоторыми белками Ras семейства, обуславливающих трансформацию клетки; снижать экспрессию эндогенного интерферона I типа [23]. Белок NS5A (56 или 58 kDa) входит в состав репликационного комплекса ВГС [4]. В данном белке имеется PKR-связывающий домен, в составе которого присутствует аминокислотная последовательность ISDR (IFN α sensitivity determining region), мутации в которой, как было показано в ряде исследований, влияют на чувствительность к терапии интерфероном- α в случае инфицирования пациентов ВГС субтипа 1b [6]. Белок NS5B (68 kDa) кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу вируса, которая способна катализировать синтез РНК как по праймер-зависимому,

так и праймер-независимому механизму [21]. Нуклеотидные последовательности NS5 области генома характеризуются вариабельностью аналогичной таковой полноразмерного генома ВГС (69% внутри одного генотипа), что позволяет использовать нуклеотидные фрагменты этой области при построении филогенетических деревьев не только для генотипирования, но и для установления генетических взаимоотношений между изолятами [17, 38].

Организация генома и белки природного рекомбинанта ВГС RF1_2k/1b

Геном природного рекомбинанта RF1_2k/1b кодирует полипротеин размером 3014 аминокислотных остатков со стандартным для ВГС порядком расположения белков: С 191 аа, Е1 192 аа, Е2-HVR 367 аа, р7 63 аа, NS2 217 аа, NS3 631 аа, NS4А 54 аа, NS5В 261 аа, NS5А 447 аа, NS5В 591 аа (табл. 1) [13]. На 5'- и 3'-концах генома, также как и у нерекомбинантных изолятов, имеются нетранслируемые участки. Никаких инсерций или делеций на протяжении всего генома рекомбинантного изолята, включая область рекомбинации и нетранслируемые участки, не обнаружено. Анализ мозаичности полноразмерного генома рекомбинанта ВГС выявил единственный сайт рекомбинации в пределах NS2 области генома. Несмотря на высокую схожесть нуклеотидных и аминокислотных последовательностей на этом участке генома, характерную для всех генотипов ВГС, сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей рекомбинантных изолятов с таковыми референсных изолятов k1-s2 субтипа 1b и VАТ-96 субтипа 2k позволило маркировать точку рекомбинации в кодоне Val/Ile (949), расположенном сразу перед консервативным сай-

том, состоящим из четырех аминокислотных остатков Tyr-Asp/Asn-His-Leu (950–953), включая гистидин (His952), ассоциированный с энзиматической активностью NS2-NS3 протеазы [11]. Области генома рекомбинантного изолята N687 от 5'-UTR до рекомбинационного сайта внутри NS2 гена схожи с аналогичными областями генома изолята субтипа 2k, тогда как области генома от сайта рекомбинации до 3'-конца генома подобны субтипу 1b (рис. 2).

Таким образом, все структурные гены рекомбинант получил от «родительского» изолята субтипа 2k, а неструктурные — от «родительского» изолята субтипа 1b.

Гликопротеин Е2 (367 аа) рекомбинантного изолята и изолятов субтипа 2а и 2k длиннее на четыре аминокислотных остатка, чем аналогичный белок (363 аа) изолятов субтипа 1b. При этом аминокислотный состав РePHD домена, расположенного внутри гена Е2 (участок гомологии сайта фосфорилирования РKR-eIF2 α), рекомбинантного изолята N687 полностью идентичен таковому изолятов субтипов 2а и 2k, и отличается по двум (Е652Q и L668H) из 12 позиций от аминокислотной последовательности РePHD домена изолятов субтипа 1b. Соответственно, РePHD домен природного рекомбинанта ВГС не имеет сродства к РKR и, следовательно, не может участвовать в формировании резистентности ВГС к интерферону.

Напротив, белок NS5А (447 аа) рекомбинантного изолята N687 и изолятов субтипа 1b короче на 19 аминокислотных остатка аналогичного белка (466 аа) изолятов субтипов 2а и 2k (табл. 1). Аминокислотный профиль ISDR области внутри гена NS5А рекомбинантного изолята N687 полностью аналогичен таковой изолята субтипа 1b, принадлежащего к «дикому» типу («wild-type»), ассоциированному с устойчивостью к интерферон-терапии [13].

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВО АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ БЕЛКОВ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ИЗОЛЯТА ВГС

Область генома	Количество аминокислотных остатков				
	Субтип 2а (НС-Ј6*)	Субтип 2k (VAT-96)	RF1_2k/1b (N687)	Субтип 1b (k1-s2)	Субтип 1b (N589)
ORF	3033	3033	3014	3010	3010
CORE	191	191	191	191	191
E1	192	192	192	192	192
E2	367	367	367	363	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

Примечание. * В скобках указаны номера референсных изолятов ВГС.

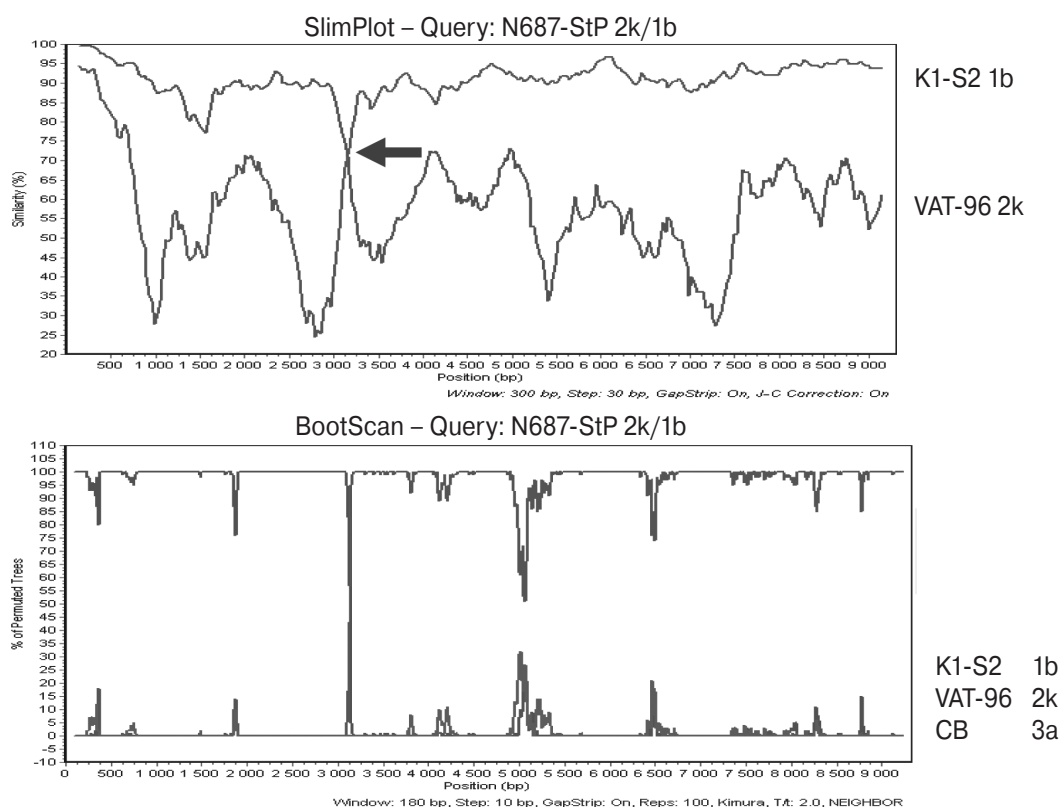


Рисунок 2. Similarity plots и Bootscan анализ нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания генома рекомбинантного изолята RF1_2k/1b N687

Стрелка указывает точку рекомбинации в позиции 3175/3176. «Родительские» генотипы представлены изолятами K1-S2 субтипа 1b и VAT-96 субтипа 2k. Генотип 3a (изолят CB) использован как внешняя группа. Достоверность бутстрапинга основана на 1000 репликатах.

Таким образом, природный межгенотипный рекомбинант RF1_2k/1b обладает уникальными новыми фенотипическими характеристиками, которые позволяют ему быстро и широко распространяться в человеческой популяции.

В настоящее время в Международный Банк данных (GenBank) депонированы четыре полноразмерных генома изолятов (N687, M21, CYNCV037, CYNCV093) природного рекомбинанта ВГС RF1_2k/1b ВГС [5, 13, 28].

География природного рекомбинанта RF1_2k/1b вируса гепатита С

В настоящее время глобальное географическое распространение генотипов и субтипов ВГС хорошо документировано. Различными лабораториями мира постоянно ведется мониторинг за циркулирующими вариантами ВГС на определенных территориях, что позволяет выявлять новые варианты возбудителя. Так, обширные молекулярно-эпидемиологические исследования выявили огромное разнообразие субтипов ВГС, циркулирующих в некоторых районах Африки южнее Сахары (генотипы 2 и 4), Южной и Юго-Восточной Азии (генотипы 1 и 6) [17, 38]. В противоположность этому, в Ев-

ропе, Северной Америке показано, что широко циркулирует достаточно ограниченное число субтипов ВГС: 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, и 4a, при этом другие субтипы регистрируются, как правило, эпизодически [17, 38].

В 1999–2002 гг. сотрудниками НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера совместно со шведскими коллегами L.O. Magnus и H. Norder (Шведский институт по Контролю за инфекционными заболеваниями) было проведено изучение 149 изолятов ВГС, циркулировавших в Санкт-Петербурге среди различных групп населения (пациенты инфекционных отделений различных стационаров города, а также пациенты отделений гемодиализа) [10]. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей NS5A области генома выявил шесть субтипов ВГС: 1a, 1b, 2a, 2c, 3a и 4a. Специальное исследование было проведено с целью обнаружения возможных природных рекомбинантов. Из 149 изолятов ВГС выбрали 41 изолят для секвенирования фрагмента 5'UTR/CORE области. Эти изоляты располагались на разных ветвях филогенетического дерева в пределах каждого из 6 определенных субтипов: 19 изолятов принадлежали к субтипу 1b, 2 — к субтипу 2a, 17 — к субтипу 3a, по одному изоляту — каждому из субтипов 1a, 2c и 4a.

ТАБЛИЦА 2. ГЕОГРАФИЧЕСКОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЛЯТОВ ПРИРОДНОГО РЕКОМБИНАНТА RF1_2k/1b ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Страна, регион	Всего изолятов RF1_2k/1b	Пути инфицирования
Россия, СПб	14	ВНС* (8)** трансфузии/медицинские оперативные вмешательства (2) гемодиализ (1) неизвестен (3)
Россия, Москва	2	гетеросексуальный (1) неизвестен (1)
Россия, Московская обл	2***	ВНС (2)
Россия, Тамбовская обл*	2***	нет данных
Россия, Сибирь*	6	ВНС (1) трансфузии/медицинские оперативные вмешательства (1) неизвестен (4)
Эстония	1	трансфузии/медицинские оперативные вмешательства (1)
Азербайджан	6	ВНС (6)
Узбекистан	2	ВНС (1) трансфузии/медицинские оперативные вмешательства (1)
Швеция	1	неизвестен (1)
Ирландия	2	неизвестен (2)
Франция	1	ВНС (1)
Кипр	2	ВНС (1) гетеросексуальный (1)
Голландия	6	ВНС (3) неизвестен (3)

Примечания. * ВНС — внутривенное употребление наркотических средств; ** в скобках здесь и далее указано число пациентов, имевших в анамнезе указания на данный путь инфицирования; *** изоляты, выявленные сотрудниками ФГБУ Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова.

У двух изолятов (N747 и N796) субтипа 1b, принадлежавших к одному субкластеру, было выявлено несовпадение результатов генотипирования, основанных на анализе нуклеотидных последовательностей из NS5B и 5'UTR/core областей. Данные об отсутствии эпидемиологической связи между пациентами свидетельствовали о возможной принадлежности этих изолятов к атипичному варианту ВГС. Картирование сайта рекомбинации стало доказательством выявления первого жизнеспособного природного межгенотипного рекомбинанта ВГС RF1_2k/1b [11, 13].

Дальнейшее изучение распространенности рекомбинанта ВГС RF1_2k/1b было проведено не только в Санкт-Петербурге, но и в странах Балтийского региона в рамках проекта по надзору за вирусным гепатитом С под руководством профессора Л.О. Magnius (Шведский институт по Контролю за инфекционными заболеваниями). Изучено 416 изолятов ВГС, полученных от анти-ВГС и РНК ВГС-позитивных пациентов, наблюдавшихся в течение 1998–2005 гг. в различных стационарах Санкт-Петербурга (185 пациентов, включая 16 пациентов, находившихся на отделениях гемодиализа), Москвы (64 пациента), Эстонии (67 пациентов) и в стационаре одного из округов Стокгольма (100 пациентов) [12, 14, 40]. Филогенетический анализ

выявил циркуляцию природного рекомбинанта RF1_2k/1b на всех изученных территориях. При этом в Санкт-Петербурге его доля в структуре ВГС популяции составила 7,5%, что поставило его на третье место по частоте встречаемости. Все пациенты (за исключением двух, состоявших в браке и проживавших в Москве), инфицированные RF_2k/1b, были эпидемиологически не связаны друг с другом и имели различные пути инфицирования: семеро употребляли внутривенно наркотические средства; трое имели оперативные медицинские вмешательства и/или переливания крови; один находился на гемодиализе; у пятерых установить возможный путь инфицирования не удалось. Выявление RF_2k/1b у обоих супругов доказало возможность полового пути передачи для данного варианта ВГС (табл. 2).

Следует отметить, что популяция ВГС в Санкт-Петербурге была наиболее гетерогенна по сравнению с другими территориями. Только в Санкт-Петербурге выявили два изолята ВГС субтипа 2k, одного из «родительских» субтипов рекомбинанта ВГС RF1_2k/1b, у пациентов старше 59 лет, при этом в анамнезе одного из них имелись указания на переливания крови и хирургические вмешательства, начиная с 60-х гг. Возраст же пациентов, инфицированных природным рекомбинантом RF_2k/1b, варьировал

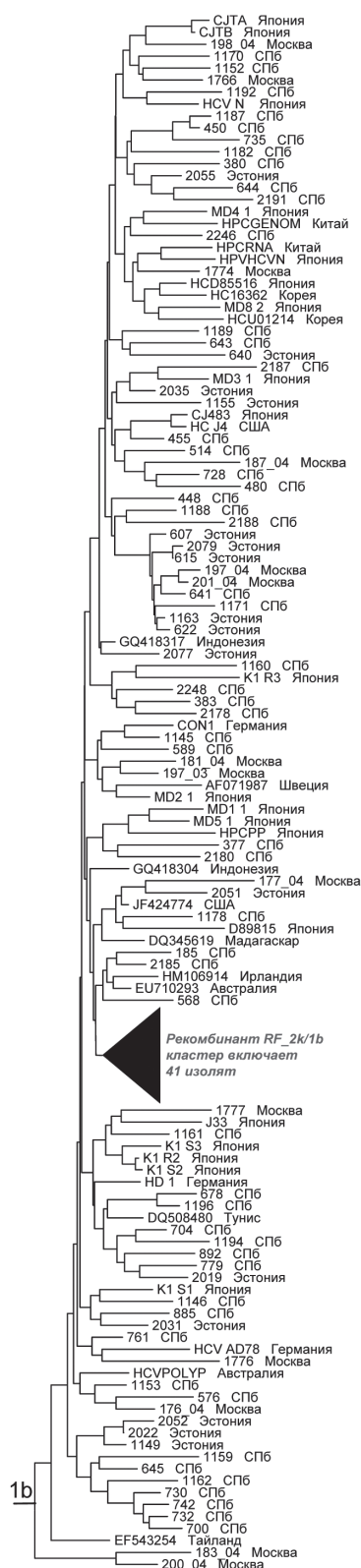


Рисунок 3. Часть дендрограммы филогенетического дерева, построенного на 270 п.о. из NS5B области генома с использованием метода neighbor-joining (Mega 5.05, Tamura K. et al., 2011), представляет ветвь, сформированную изолятами ВГС субтипа 1b

Наименование и географическое происхождение изолятов ВГС указаны справа от каждой ветви.

от 18 до 64 лет, составляя в среднем $32,82 \pm 14,88$. Полученные данные свидетельствуют о том, что природный рекомбинант обладает определенным потенциалом для более успешного распространения в популяции, чем, по крайней мере, один из «родительских» субтипов 2k.

Благодаря депонированию сиквенсов первых Санкт-Петербургских изолятов природного рекомбинанта RF1_2k/1b в GenBank, стало возможным проводить глобальный мониторинг за распространением данных изолятов. Согласно последним опубликованным данным, изоляты природного рекомбинанта RF1_2k/1b идентифицированы на пяти территориях России (Санкт-Петербург, Москва, Московская область, Тамбовская область, Сибирь), а также в Эстонии, Узбекистане, Азербайджане, Швеции, Ирландии, Голландии, Франции, Кипре (табл. 2) [5, 18, 27, 28, 32, 40]. При этом в Швеции, Ирландии, Голландии, Франции и Кипре изоляты RF_2k/1b обнаружены только у эмигрантов из Грузии или России (единичные случаи).

На рис. 3 представлен массивный филогенетический кластер, сформированный изолятами RF1_2k/1b, выявленными на территории стран Балтийского региона, а также изолятами, сиквенсы которых были отобраны с помощью программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) как близкородственные по NS5B области генома природному рекомбинанту. Данные сиквенсы были опубликованы в GenBank различными российскими и зарубежными исследователями, во всех случаях авторами также был секвенирован фрагмент 5'UTR/core области генома для подтверждения принадлежности данных изолятов к природному рекомбинанту RF1_2k/1b. Несмотря на то, что в анамнезе большинства пациентов имелись указания на употребление ВНС, филогенетический анализ не выявил внутри RF1_2k/1b кластера ни одного субкластера, состоявшего только из изолятов, полученных от лиц, употреблявших ВНС. Однако один субкластер имел «географическую» обособленность: в его состав входили шесть изолятов, выделенных от пациентов различных групп риска, проживавших только на территории Российской Федерации (Санкт-Петербург, Сибирь). Это свидетельствует в пользу того, что, по-видимому, рекомбинант RF1_2k/1b начал давно активно циркулировать на территории Российской Федерации.

Анализ молекулярных часов (molecular clock analysis) показал, что время формирования рекомбинантного варианта RF1_2k/1b располагается между 1923 и 1956 гг. [32]. Этот период включает создание в 1926 г. первого в мире Научно-практического института переливания крови в Москве, начало широкого использования гемотрансфузий на всей территории Советской Республики и Великую Отечественную

войну. Далее начался период истории, в течение которого миграция людей происходила в пределах республик бывшего Советского Союза. Учитывая изложенное и то, что все известные на данный момент изоляты ВГС RF1_2k/1b выделены от жителей бывшего Советского Союза, можно заключить, что рекомбинация ВГС произошла на территории Советского Союза. С момента «перестройки», начала активной эмиграции и свободного перемещения жителей республик бывшего Советского Союза за пределы стран проживания началась «новая» эра в распространении рекомбинанта ВГС RF1_2k/1b.

Заключение

К настоящему времени идентифицировано как минимум 45 изолятов природного рекомбинанта RF1_2k/1b, выделенных от пациентов всех возрастных категорий различных групп населения, что свидетельствует о его интенсивном распространении. Установлено, что данный вариант ВГС может передаваться двумя из трех основных способов передачи, характерных для всех парентеральных инфекций: гемоконтактным (включая внутривенное употребление наркотических средств) и гетеросексуальным, который играет минорную роль при передаче других вариантов ВГС. Сведений о возможности вертикальной передачи рекомбинантного варианта ВГС пока нет.

Поскольку рекомбинант RF1_2k/1b получил широкое распространение на территории России, отдельно необходимо отметить, что влияние принадлежности изолята ВГС к рекомбинантному генотипу 2k/1b на клиническое течение заболевания и тактику выбора терапии пока мало изучено. Пациенты, инфицированные субтипом 1b, хуже отвечают на интерферон-терапию, чем пациенты, инфицированные генотипом 2. В этой связи особое внимание следует уделять пациентам, инфицированным изолятами ВГС, типированными рутинными методами диагностики как генотип 2, так как коммерческие тест-системы для выявления генотипа ВГС основаны на анализе фрагментов из 5'UTR/core области генома.

В ближайшее время необходимо создание новых тест-систем для успешного генотипирования и выявления рекомбинантных изолятов в рутинной лабораторной практике.

Список литературы

1. Вирусные гепатиты в Российской Федерации: Справочник / Под ред. Онищенко Г.Г., Жебруна А.Б. — СПб: НИИЭМ им. Пастера, 2010. — 204 с.
2. Budkowska A., Kakkanas A., Nerrienet E., Kalinina O., Maillard P., Horm S.V., Dalagiorgou G., Vas-silaki N., Georgopoulou U., Martinot M., Sall A.A., Mavromara P. Synonymous mutations in the core gene are linked to unusual serological profile in hepatitis C virus infection // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6, N 1. — P. 1–12.
3. Choo Q.L., Richman K.H., Han J.H., Berger K., Lee C., Dong C., Gallegos C., Coit D., Medina-Selby R., Barr P.J. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1991. — Vol. 88, N 6. — P. 2451–2455.
4. De Francesco R. Molecular virology of the hepatitis C virus // *J. Hepatol.* — 1999. — Vol. 31, Suppl. 1. — P. 47–53.
5. Demetriou V.L., Kyriakou E., Kostrikis L.G. Near-full genome characterization of two natural intergenotypic 2k/1b recombinant hepatitis C virus isolates // *Advances in Virology*. — 2011. — Vol. 2011. — P. 1–7.
6. Enomoto N., Sakuma I., Asahina Y., Kurosaki M., Murakami T., Yamamoto C., Ogura Y., Izumi N., Marumo F., Sato C. 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. — P. 77–81.
7. Gale M.Jr, Foy E.M. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus // *Nature*. — 2005. — Vol. 436. — P. 939–945.
8. Grakoui A., Wychowski C., Lin C., Feinstone S.M., Rice C.M. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products // *J. Virol.* — 1993. — Vol. 67, N 3. — P. 1385–1395.
9. Hijikata M., Kato N., Ootsuyama Y., Nakagawa M., Shimotohno K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1991. — Vol. 88, N 13. — P. 5547–5551.
10. Kalinina O., Norder H., Vetrov T., Zhdanov K., Barzunova M., Plotnikova V., Mukomolov S., Magnius L. Shift in predominating subtype of HCV from 1b to 3a in St. Petersburg mediated by increase in injecting drug use // *J. Med. Virol.* — 2001. — Vol. 65. — P. 517–524.
11. Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., Magnius L. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg // *J. Virol.* — 2002. — Vol. 76. — P. 4034–4043.
12. Kalinina O., Norder H., Thcakharian V., Zhdanov K., Kislii P., Vetrov T., Mukomolov S., Magnius L. More recombinant HCV strains recovered in St. Petersburg // 9th International Meeting on HCV and Related Viruses. — San-Diego, USA, 2002. — P. 225.
13. Kalinina O., Norder H., Magnius L. 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. — P. 1853–1857.
14. Kalinina O., Jern C., Tallo T., Thcakharian V., Gusev D., Znoiko O., Isagulians M., Mukomolov S., Norder H., Magnius L. Spread of the natural hepatitis C virus recombinant outside Russia // 12th International symposium on viral hepatitis and liver disease. — Paris, 2006. — P. 189.

15. Kato N., Ootsuyama Y., Ohkoshi S., Nakazawa T., Sekiya H., Hijikata M., Shimotohno K. Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1992. — Vol. 189, N 1. — P. 119–127.
16. Kolykhalov A.A., Feinstone S.M., Rice C.M. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA // *J. Virol.* — 1996. — Vol. 70, N 6. — P. 3363–3371.
17. Kuiken C., Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus // *Methods Mol. Biol.* — 2009. — Vol. 510, Hepatitis C, part II. — P. 33–53.
18. Kurbanov F., Tanaka Y., Chub E., Maruyama I., Azlarova A., Kamitsukasa H., Ohno T., Bonetto S., Moreau I., Fanning L.J., Legrand-Abravanel F., Izopet J., Naoumov N., Shimada T., Netesov S., Mizokami M. Molecular epidemiology and interferon susceptibility of the natural recombinant hepatitis C virus strain RF1_2k/1b // *J. Infect. Dis.* — 2008. — Vol. 198, N 10. — P. 1448–1456.
19. Lee Y.M., Lin H.J., Chen Y.J., Lee C.M., Wang S.F., Chang K.Y., Chen T.L., Liu H.F., Chen Y.M. 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. — P. 57–68.
20. Legrand-Abravanel F., Claudinon J., Nicot F., Dubois M., Chapuy-Regaud S., Sandres-Saune K., Pasquier C., Izopet J. New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus // *J. Virol.* — 2007. — Vol. 81, N 8. — P. 4357–4362.
21. Lindenbach B.D., Rice C.M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function // *Nature.* — 2005. — Vol. 436. — P. 933–938.
22. Lu W., Lo S.Y., Chen M., Wu K., Fung Y.K., Ou J.H. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein // *Virology.* — 1999. — Vol. 264. — P. 134–141.
23. Macdonald A., Crowder K., Street A., McCormick C., Saksela K., Harris M. The hepatitis C virus non-structural NS5A protein inhibits activating protein-1 function by perturbing ras-ERK pathway signaling // *J. Biol. Chem.* — 2003. — Vol. 278, N 20. — P. 17775–17784.
24. Matsuura Y., Harada T., Makimura M., Sato M., Aizaki H., Suzuki T., Miyamura T. Characterization of HCV structural proteins expressed in various animal cells // *Intervirology.* — 1994. — Vol. 37, N 2. — P. 114–118.
25. Melyan E., Curran J., Hofmann K., Moradpour D., Binder M., Bartenschlager R., Tschopp J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus // *Nature.* — 2005. — Vol. 437. — P. 1167–1172.
26. Mizushima H., Hijikata M., Tanji Y., Kimura K., Shimotohno K. Analysis of N-terminal processing of hepatitis C virus nonstructural protein 2 // *J. Virol.* — 1994. — Vol. 68, N 4. — P. 2731–2734.
27. Moreau I., Hegarty S., Levis J., Sheehy P., Crosbie O., Kenny-Walsh E., Fanning L.J. Serendipitous identification of natural intergenotypic recombinants of hepatitis C in Ireland // *Virol. J.* — 2006. — Vol. 3. — P. 1–7.
28. Morel V., Descamps V., François C., Fournier C., Brochet E., Capron D., Duverlie G., Castelain S. 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. — P. 382–386.
29. Noppornpanth S., Lien T.X., Poovorawan Y., Smits S.L., Osterhaus A.D., Haagmans B.L. Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus // *J. Virol.* — 2006. — Vol. 80, N 15. — P. 7569–7577.
30. Okamoto H., Mishiro S. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus // *Intervirology.* — 1994. — Vol. 37, N 2. — P. 68–76.
31. Okamoto H., Kobata S., Tokita H., Inoue T., Woodfield G.D., Holland P.V., Al-Knawy B.A., Uzunalimoglu O., Miyakawa Y., Mayumi M. A second-generation method of genotyping hepatitis C virus by the polymerase chain reaction with sense and antisense primers deduced from the core gene // *J. Virol. Methods.* — 1996. — Vol. 57, N 1. — P. 31–45.
32. Raghwani J., Thomas X.V., Koekkoek S.M., Schinkel J., Molenkamp R., Thijs J. van de Laar, Takebe Y., Tanaka Y., Mizokami M., Rambaut A., Pybus O.G. Origin and Evolution of the unique hepatitis C virus circulating recombinant form 2k/1b // *J. Virol.* — 2012. — Vol. 86, N 4. — P. 2211–2220.
33. Roohvand F., Maillard P., Lavergne J.P., Boulant S., Walic M., Andréo U., Goueslain L., Helle F., Mallet A., McLauchlan J., Budkowska A. Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein // *J. Biol. Chem.* — 2009. — Vol. 284, N 20. — P. 13778–13791.
34. Santolini E., Migliaccio G., La M.N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein // *J. Virol.* — 1994. — Vol. 68, N 6. — P. 3631–3641.
35. Schwer B., Ren S., Pietschmann T., Kartenbeck J., Kaehlcke K., Bartenschlager R., Yen T.S., Ott M. Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif // *J. Virol.* — 2004. — Vol. 78. — P. 7958–7968.
36. Simmonds P., Holmes E.C., Cha T.A., Chan S.W., McOmish F., Irvine B., Beall E., Yap P.L., Kolberg J., Urdea M.S. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region // *J. Gen. Virol.* — 1993. — Vol. 74, N 11. — P. 2391–2399.
37. Simmonds P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus // *J. Hepatol.* — 1999. — Vol. 31, Suppl. 1. — P. 54–60.
38. Simmonds P., Bukh J., Combet Ch., Delreage G., Enomoto N., Feinstone S., Halfon Ph., Inchausti G., Kuiken C., Maertens G., Mizokami M., Murphy D.G., Okamoto H., Pawlotsky J.-M., Penin F., Sablon E., Shin T., Stuyver L.J., Thiel H.J., Viazov S., Weiner A.J., Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes // *Hepatology.* — 2005. — Vol. 42, N 4. — P. 962–973.

39. Spahn C.M., Kieft J.S., Grassucci R.A., Penczek P.A., Zhou K., Doudna J.A., Frank J. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit // *Science*. — 2001. — Vol. 291. — P. 1959–1962.
40. Tallo T., Norder H., Tefanova V., Krispin T., Schmidt J., Ilmoja M., Orgulas K., Pruunsild K., Priimagi L., Magnius L. Genetic characterization of hepatitis C virus strains in Estonia: fluctuations in the predominating subtype with time // *J. Med. Virol.* — 2007. — Vol. 79, N 4. — P. 374–382.
41. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* — 2011. — Vol. 28. — P. 2731–2739.
42. Tanaka T., Kato N., Cho M.J., Sugiyama K., Shimotohno K. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome // *J. Virol.* — 1996. — Vol. 70, N 5. — P. 3307–3312.
43. Taylor D.R., Shi S.T., Romano G.N., Lai M.M. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein // *Science*. — 1999. — Vol. 285. — P. 107–110.
44. Vassilaki N., Mavromara P. Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding openreading frame // *J. Biol. Chem.* — 2003. — Vol. 278. — P. 40503–40513.
45. Viazov S., Widell A., Nordenfelt E. Mixed infection with two types of hepatitis C virus is probably a rare event // *Infection*. — 2000. — Vol. 28, N 1. — P. 21–25.
46. Walewski J.L., Keller T.R., Stump D.D., Branch A.D. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame // *RNA*. — 2001. — Vol. 7. — P. 710–721.
47. Yamamura J., Ichimura H. A natural intergenotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines // *J. Med. Virol.* — 2006. — Vol. 78. — P. 1423–1428.