

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Демин Михаил Валерьевич

**Изучение мутационного статуса гена фосфотрансферазы
цитомегаловируса и вируса герпеса человека 6, выделенных от
реципиентов гемопоэтических стволовых клеток**

1.5.10 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена на кафедре вирусологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

- Научный руководитель** – *Тихомиров Дмитрий Сергеевич – кандидат биологических наук*
- Официальные оппоненты** – *Кюрегян Карен Каренович – доктор биологических наук, профессор РАН, ФБУН "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Роспотребнадзора, заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов*
- Балашов Дмитрий Николаевич – доктор медицинских наук, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, заведующий отделением трансплантации гемопоэтических стволовых клеток № 2, врач-гематолог*
- Гараев Тимур Мансурович – кандидат биологических наук, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики*

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. в __ часов __ минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/2895>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и ее разработанность

Betaherpesvirinae, или β -герпесвирусы – это подсемейство вирусов, которое входит в семейство герпесвирусов *Orthoherpesviridae*. Подсемейство включает пять родов, но только вирусы из родов *Cytomegalovirus* (вирус герпеса человека 5-го типа, или цитомегаловирус (ЦМВ) и *Roseolovirus* (вирус герпеса человека типа 6А, вирус герпеса человека типа 6В (ВГЧ-6), вирус герпеса человека 7-го типа (ВГЧ-7) являются антропонозами. У иммунокомпрометированных пациентов (например, реципиенты органов и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК)), при реактивации ЦМВ и ВГЧ-6 могут наблюдаться серьезные вирусные инвазии отдельных органов и целых систем организма (Piret & Voivin, 2014). Таким образом, реципиенты органов или ГСК представляют собой особую группу пациентов и уязвимы для инфекционных осложнений, среди которых может быть и активная репликация герпесвирусов (Ramanan & Razonable, 2013). Вероятность появления симптомов вирусного поражения при отсутствии своевременной противовирусной терапии достигает 80%. Такая ситуация описана как для ЦМВ (Takenaka et al., 2015), так и для ВГЧ-6 (Rossi et al., 2001). Развитие инфекций, вызванных этими вирусами, увеличивает тяжесть течения основного гематологического заболевания, а у реципиентов стволовых клеточных клеток повышает вероятность как развития острой и хронической «РТПХ», так и отторжения трансплантата и летального исхода. Существенное влияние этих вирусов на тяжесть клинической картины осложнения у реципиентов алло-ГСК обуславливает актуальность проведения противовирусной профилактики и терапии. На сегодняшний день известно несколько препаратов, способных подавить размножение β -герпесвирусов: ацикловир, ганцикловир и их пролекарства с большей биодоступностью – валацикловир и валганцикловир. Данные лекарственные средства являются

аналогами нуклеозидов (Chen et al., 2019) и зарегистрированы для клинического применения на территории Российской Федерации. Учитывая критическую роль противовирусной терапии в лечении вирусного инфекционного осложнения, угрозу представляет ситуация, когда вирус приобретает устойчивость к действию препаратов прямого действия. Устойчивость вируса чаще всего связана с мутациями в геноме и была описана как для ЦМВ, так и для ВГЧ-6. В связи с этим, представляется актуальным исследование, направленное на поиск ассоциированных с устойчивостью мутаций в геномах вирусов, выделенных из клинического материала, реципиентов Алло-ГСК. Также актуальным является поиск оптимального диагностического подхода к идентификации таких мутаций у других пациентов с опухолевыми заболеваниями системы крови.

Активное изучение мутаций, ассоциированных с устойчивостью к противовирусным препаратам, началось в 1990-х годах. При этом большинство исследовательских групп было сосредоточено на поиске мутаций в геноме ЦМВ (Wolf et al., 1995). Большинство найденных мутаций ассоциированы с устойчивостью именно к ганцикловиру и его производным (Chou, 2020). Этот факт, скорее всего, объясняется более долгим сроком использования ганцикловира в качестве противовирусного препарата и его повсеместным распространением в мире (Kotton et al., 2018). Тем не менее были найдены и описаны мутации, приводящие к устойчивости и к цидофовиру, фоскарнету, марибавиру и летермовиру (Chou, 2008). На данный момент описано более 100 мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов (Chou, 2020) в геноме ЦМВ, и это число растет с каждым годом. Для ЦМВ определены не только сами мутации, но и их относительная эффективность противодействия противовирусным препаратам (Chou et al., 2017). Для ВГЧ-6 информации куда меньше: описано менее 50 мутаций (Piret & Boivin, 2014), к тому же, не существует данных относительно эффективности этих мутаций.

Несмотря на наличие молекулярных исследований, существует крайне мало работ, рассматривающих, как возникновение устойчивости влияет на течение инфекций у пациентов с гемобластозами, в частности у реципиентов Алло-ГСК, хотя диагностика таких мутаций и поиск методов противодействия представляются актуальными для науки и практической медицины (Chaer et al., 2016).

Цель и задачи исследования

Определить спектр, частоту встречаемости и молекулярно-биологическую характеристику мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию ганцикловира, в ДНК ЦМВ и ДНК ВГЧ-6

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Оценить актуальность изучения мутационного статуса геномов ЦМВ и ВГЧ-6 путем анализа частоты выявления ДНК данных вирусов у пациентов с иммунодефицитом различного генеза.
- 2) Провести поиск мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, в участках генов вирусной фосфотрансферазы ЦМВ и ВГЧ-6 (*UL97* и *U69*) в образцах ДНК
- 3) Оценить влияние выявленных мутаций на характер течения вирусной инфекции.
- 4) Разработать прототип тест-системы для определения мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию ганцикловира, на основе аллель-специфичной ПЦР.

Объект исследования

Объектами исследования являлись участки гена вирусной фосфотрансферазы у ЦМВ и ВГЧ-6, в которых возможно появление мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, а также клиничко-

лабораторные данные реципиентов алло-ГСК, результаты рутинных вирусологических исследований и записи в базах данных.

Научная новизна исследования

Впервые в России проведены исследования мутационного статуса генов вирусной фосфотрансферазы вирусов ЦМВ у взрослых больных гемобластозами и реципиентов алло-ГСК. Кроме того, аналогичные исследования проведены и для ВГЧ-6.

Секвенированы участки гена вирусной фосфотрансферазы вирусов ЦМВ и ВГЧ-6, где, согласно литературным данным, сосредоточены наиболее часто встречаемые мутации устойчивости к действию противовирусных препаратов. Обнаружены ранее описанные мутации в гене *UL97* ЦМВ: C592G, C603W, del600. Для ВГЧ-6 показано отсутствие мутаций в исследованном участке гена *U69*.

Проанализирован большой массив клиническо-лабораторных данных реципиентов, у которых выявлены мутантные штаммы ЦМВ. Оценена динамика возникновения мутации. Динамика идентификации мутации соотнесена с клинико-лабораторными данными: вирусная нагрузка, режим противовирусной терапии, клиническое течение.

Доказано, что появление мутации вызывает рост вирусной нагрузки и влияет на течение инфекции у пациента. Показана необходимость разработки и/или усовершенствования подходов к лечению активной вирусной инфекции у реципиентов алло-ГСК при обнаружении мутации устойчивости к действию противовирусных препаратов в геноме вируса.

Впервые в мировой практике разработан прототип тест-системы для идентификации мутаций C592G и C603W на основе аллель-специфичной ПЦР.

Показана эффективность использования такой системы для решения задач по сбору статистических данных и для рутинной диагностической практики.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования расширяют представления о распространенности мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, у вирусов ЦМВ и ВГЧ-6, показывают их влияние на особенности течения инфекции, клиническую картину.

Практическая значимость заключается в определении наиболее часто встречаемых мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, в образцах реципиентов алло-ГСК. Также предложен диагностический алгоритм для своевременной идентификации мутационного штамма, который в свою очередь позволяет скорректировать терапевтическую тактику. Прототип разработанной тест-системы на основе АС-ПЦР позволяет быстро проводить скрининг на наличие наиболее распространенных мутаций (в рамках данного исследования – С603W и С592G), что расширяет диагностический потенциал, доступный в рутинной клинической практике.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в работе с литературными данными, планировании и проведении экспериментальной части исследования, анализе и обработке полученных результатов. Автор внес вклад в подготовку научных публикаций по материалам диссертационной работы и представлял результаты исследований на конференциях. Автором написаны диссертация и автореферат к ней. Имена соавторов указаны в опубликованных работах. Участие соавторов отражено в тексте диссертации и автореферата. Вклад автора в представленную работу определяющий.

Методы и методология исследования

Для исследования были использованы ДНК ЦМВ и ВГЧ-6, выявленных в образцах клинического материала с помощью набора реагентов «АмплиСенс CMV/EBV/HHV 6» производства ООО «ИнтерЛабСервис» и приборов Rotor Gene Q (QIAGEN), RG-6000 (Corbett Research). В качестве клинического материала были исследованы образцы периферической крови, аспирата костного мозга, мочи, кала, бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛ), ликвора и биоптатов различных органов и тканей. Выделение нуклеиновых кислот проводили из 100 мкл материала, прошедшего преаналитическую обработку, с помощью наборов реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» или «АмплиПрайм ДНК-сорб-В», согласно прилагаемым инструкциям.

Для секвенирования проводили подбор праймеров к участкам генов *UL97* ЦМВ и *U69* ВГЧ-6, в которых ранее отмечали высокую частоту мутаций, ассоциированных с устойчивостью (Chou, 2015), с помощью онлайн сервиса Benchling. Очистку продуктов амплификации проводили, используя набор Cleanup Standard согласно инструкции производителя (Евроген). Секвенировали участки генов *UL97* ЦМВ и *U69* ВГЧ-6 на генетическом анализаторе «НАНОФОР 05» (ООО «Синтол»). Нуклеотидные и предсказанные аминокислотные последовательности выравнивали с помощью программы Benchling, с помощью этого же программного обеспечения осуществляли поиск мутаций в секвенированных последовательностях гена *UL97* ЦМВ.

Для разработки тест-системы на основе аллель-специфичной ПЦР (АС-ПЦР) для определения наличия актуальных мутаций в гене *UL97* ЦМВ использовали онлайн-сервиса Benchling для подбора праймеров и зондов. Для проведения ПЦРс детекцией продуктов в режиме реального времени использовали реагенты от компании ООО «Синтол».

Положения, выносимые на защиту

- 1) У реципиентов алло-ГСК герпесвирусная инфекция может быть вызвана устойчивыми к действию противовирусных препаратов штаммами бетагерпесвирусов.
- 2) При появлении в геноме бетагерпесвируса мутации устойчивости к действию ганцикловира возрастает вирусная нагрузка, ухудшается ответ на терапию.
- 3) Величина фактора резистентности мутации может оказывать влияние на уровень вирусной нагрузки у реципиентов алло-ГСК на фоне противовирусной терапии.
- 4) Метод АС-ПЦР может быть использован для разработки тест-системы, позволяющей определять наличие конкретных мутаций резистентности быстро и массово.
- 5) Такая тест-система может быть использована для подтверждения наличия наиболее распространенных или опасных мутаций в геноме вируса, выделенного от пациента с гемобластозом.
- 6) Частота выявления ЦМВ и ВГЧ-6 у больных гемобластозами выросла за наблюдаемый период. Вклад ВГЧ-6 в структуру инфекционных осложнений вырос по сравнению с ЦМВ.

Степень достоверности и результаты апробации

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, обеспечивается и подтверждается корректной постановкой цели и задач исследования, обоснованным применением современных лабораторных методик и адекватных методов описательной статистики, большим массивом проанализированных клинико-лабораторных данных и собранных экспериментальных данных, анализом широкого круга литературных источников, содержащих результаты исследований отечественных

и зарубежных авторов по рассматриваемой проблеме. Диагностику и идентификацию вирусных штаммов и подбор праймеров и зондов проводили, используя современные общепринятые методы, средства и протоколы анализа. Биоинформационную обработку данных проводили с помощью свободно распространяемого программного обеспечения: Benhcling, BLAST и др. Последовательности вирусных геномов, определенные независимо, были идентичны друг другу.

По материалам диссертации опубликовано 6 экспериментальных и 1 обзорные статьи в журналах, индексируемых в RSCI, WoS, Scopus или входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Апробация основных результатов диссертации проведена в 2023 году в рамках защиты научно-квалификационной работы, подготовленной соискателем при обучении в аспирантуре биологического факультета МГУ. Результаты работы были представлены соискателем на конференциях: «Современные подходы к профилактике, диагностике и лечению несостоятельности/отторжения трансплантата и других осложнений при трансплантации аллогенных органов и гемопоэтических стволовых клеток» Москва 02.03.2023г. (устный доклад), на конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность — 2022» Москва 27-28 апреля 2022 г. (устный доклад), VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и службе крови» С.-Петербург 14-15.04.2022 г. (устный доклад), VI Всероссийской научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и службе крови» С.-Петербург 9.10.2020 г. (устный доклад). Основные результаты диссертации были опубликованы в 10 статьях в научных рецензируемых журналах. Публикации по теме диссертации проходили процедуру независимого рецензирования.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста и состоит из следующих основных разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы». Работа содержит список цитируемой литературы, состоящий из 117 источников, и включает 13 рисунков и 8 таблиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Определение частоты выявления ЦМВ и ВГЧ-6

Для определения актуальности исследования была оценена частота выявления ДНК ЦМВ и ВГЧ-6 у пациентов, получивших медицинскую помощь с 2015 по 2019 гг. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Динамика количества положительных сигналов при проведении ПЦР исследований на наличие ДНК вируса ЦМВ и ВГЧ-6 за 2015-2019 гг.

			Положительные результаты определения ДНК ЦМВ		Положительные результаты определения ДНК ВГЧ-6		Различия в частоте выявления ЦМВ и ВГЧ-6
Год	Число обследованных пациентов	Число исследованных образцов клинического материала	Частота выявления среди пациентов, %	Медиана количества положительных результатов определения ДНК ЦМВ на одного пациента	Частота выявления среди пациентов, %	Медиана количества положительных результатов определения ДНК ВГЧ-6 на одного пациента	Величина р
2015	607	1469	14,33	1	16,14	1	0,370
2016	951	3366	16,30	2	25,87	1	<0.001
2017	1065	4312	19,53	2	29,20	1	<0.001
2018	1187	4658	20,30	1	30,33	1	<0.001
2019	1331	6558	18,03	2	32,08	6	<0.001

2. Поиск мутаций устойчивости к действию противовирусных препаратов в генах *UL97* ЦМВ и *U69* ВГЧ-6

Второй этап исследования включал поиск мутаций устойчивости к действию противовирусных препаратов в гене вирусной фосфотрансферазы ЦМВ и ВГЧ-6, выделенных из образцов клинического материала реципиентов алло-ГСК. Были выбраны следующие критерии, указывающие на возможную резистентность инфекции, вызванной ЦМВ и/или ВГЧ-6:

- Более 1 месяца положительных результатов определения ДНК вируса (при условии регулярного мониторинга не меньше 1 раза в 2 недели)
- Вирусная нагрузка в образцах более 10 000 копий геном-эквивалент (ГЭ)
- Раннее выявление ДНК вируса (до 30 дней) после трансплантации алло-ГСК (ТГСК)
- Неэффективность противовирусной терапии

В анализ были включены клиничко-лабораторные данные 438 реципиентов алло-ГСК, получивших лечение с 2016 по 2022 г. У 90 из 438 пациентов выполнялись 2 и более критерия (у 49 пациентов для ЦМВ и у 41 – для ВГЧ-6). С целью поиска мутаций резистентности для каждого пациента был исследован образец с наибольшей вирусной нагрузкой.

Мутации в гене *UL97* ЦМВ были обнаружены у 4 из 49 (8,2%) пациентов с признаками резистентной инфекции. Мутации обнаружены в разных кодонах и обладают разным фактором резистентности (ФР). ФР₅₀ - Фактор резистентности, выявленной мутации. Рассчитывается по формуле:

$$\text{ФР} = \text{IC}_{50} \text{ мутанта} / \text{IC}_{50} \text{ дикого типа}$$

IC₅₀ - половина минимальной концентрации противовирусного препарата, полностью ингибирующей репликацию в культуре клеток.

У пациента ПД выявлена мутация С607F с низким ФР, равным 1.9. Медиана концентрации вирусной ДНК составила 500 копий ГЭ на 10^5 ядродержащих клеток крови, что считается низкой вирусной нагрузкой. Аналогичная ситуация наблюдалась для пациента ГС с мутацией del600 с низким ФР тоже равным 1.9. В образцах ДНК, выделенной из крови пациента ПР, обнаружена мутация С592G (ФР=2.9) вирусная нагрузка на момент детекции мутации достигала более высоких показателей (превышала 10^5 ГЭ). У пациента ФС были исследованы образцы, собранные в разное время – в 2016 г. и в 2017 г., при этом в них выявлены разные мутации (С592G и С603W, ФР 2,9 и 8 соответственно), что говорит о смене штамма вируса, формирующего основную вирусную нагрузку. Согласно данным литературы, при проведении противовирусной терапии в низких (субоптимальных) дозах (по действующему веществу), может наблюдаться отбор мутантных штаммов ЦМВ, что, вероятно, и произошло в наблюдаемом случае.

Была оценена вирусная нагрузка и продолжительность выявления ДНК ЦМВ у пациентов в зависимости от детекции мутации резистентности к ганцикловиру. Данные представлены на рисунках 1 и 2.

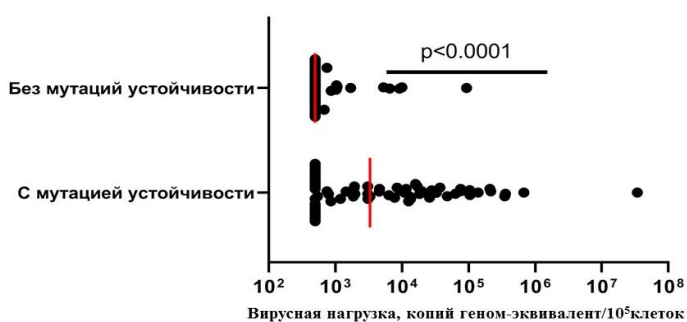


Рисунок 1. Вирусная нагрузка у пациентов-носителей вируса с мутациями, ассоциированными с устойчивостью к ганцикловиру и без них. Красной линией обозначена медиана.

Вирусная нагрузка в крови была статистически значимо выше у пациентов, у которых выявлена вирусная ДНК, содержащая мутацию в изучаемом регионе гена ($p < 0.0001$). Также была замечена тенденция, согласно которой у пациентов с мутантным штаммом ЦМВ вирусная ДНК выявляется в крови на более поздних сроках после ТГСК.

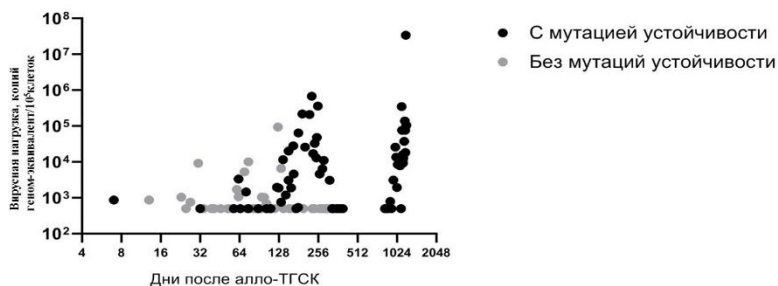


Рисунок 2. Длительность выявления и концентрация вирусной ДНК у пациентов после ТГСК у пациентов-носителей вируса с мутацией устойчивости к ганцикловиру и штамма без мутаций.

Все четыре обнаруженных мутаций располагались в нефункциональном регионе белка, участвующего в репликации вирусного генома. Согласно литературным данным, возникновение мутаций в этом регионе ведет к нарушению узнавания ганцикловира как субстрата, но не приводит к нарушению жизненного цикла вируса.

Учитывая возрастающую частоту выявления маркеров ВГЧ-6, а, следовательно, роль терапии связанных с ним осложнений, в том числе у реципиентов алло-ГСК, был осуществлен поиск мутаций устойчивости в гене *U69* ВГЧ-6, выделенного из образцов клинического материала этой когорты пациентов. Исследован 41 образец ДНК, выделенной из клинического материала 41 реципиента алло-ГСК с признаками резистентной инфекции. Показано, что ни в одном из случаев не была обнаружена известная (описанная ранее) мутация в изучаемом участке гена *U69*, ассоциированная с устойчивостью к действию противовирусных препаратов.

3. Анализ динамики возникновения мутаций в гене *UL97*

На следующем этапе работы было проведено исследование доступных архивных образцов ДНК ЦМВ, выделенной от трех пациентов-носителей мутантных штаммов, собранных в период за 6 месяцев до момента обнаружения мутации и 6 месяцев после, с целью возможности определения сроков возникновения найденной мутации. Всего в исследование включено 73 архивных образца, для которых проведена детекция вирусной ДНК: 24 образца от пациента ПР, 22 – от пациента ФС и 27 – от пациента ПД. Для всех положительных образцов была предпринята попытка секвенирования. Приемлемые результаты секвенирования были получены для 38 образцов: для 11 образцов от пациента ПР, для 14 – от пациента ФС и 3 – от пациента ПГ. Малое количество результатов в последнем случае, вероятно, связано с низкой концентрацией ДНК ЦМВ в исследуемых архивных образцах.

3.1. Пациент ПР

Клинический диагноз: лимфома из клеток мантийной зоны. Трансплантация алло-ГСК от 18.03.2016 г.

У пациента выявлен штамм ЦМВ с описанной ранее в литературе мутацией – С592G, обладающей фактором резистентности к ганцикловиру равным 2.9. Впервые она была выявлена у пациента спустя 187 дней после трансплантации и сохранялась в вирусной ДНК на протяжении всего последующего периода наблюдения. Исследование архивных образцов показало присутствие дополнительной ранее не описанной мутации А628Е неясного значения на протяжении всего срока наблюдения. После появления С592G мутация А628Е не элиминировала.

Из графика на **рис. 3** видно, что появление мутации С592G зафиксировано на фоне роста в крови вирусной нагрузки (ВН) более 10 000 копий ГЭ на 100 000 яросодержащих клеток. Для оценки влияния мутации на резистентность вируса к действию противовирусных препаратов проанализирована противовирусная

терапия (ПВТ), проводимая пациенту за время наблюдения (данные истории болезни пациента). Из **рис. 4** видно, что эффективного снижения значения ВН удалось добиться только на фоне применения фоскарнета, что дополнительно подтверждает наличие резистентности (отсутствие снижения ВН в течение 2 недель на фоне адекватной ПВТ).

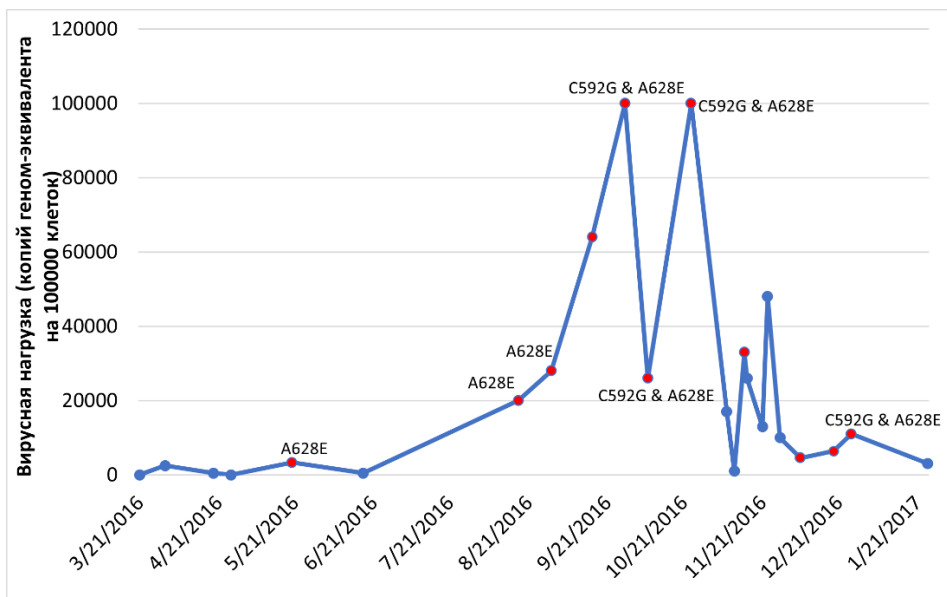


Рисунок 3. Динамика вирусной нагрузки до и после возникновения мутаций у пациента ПР

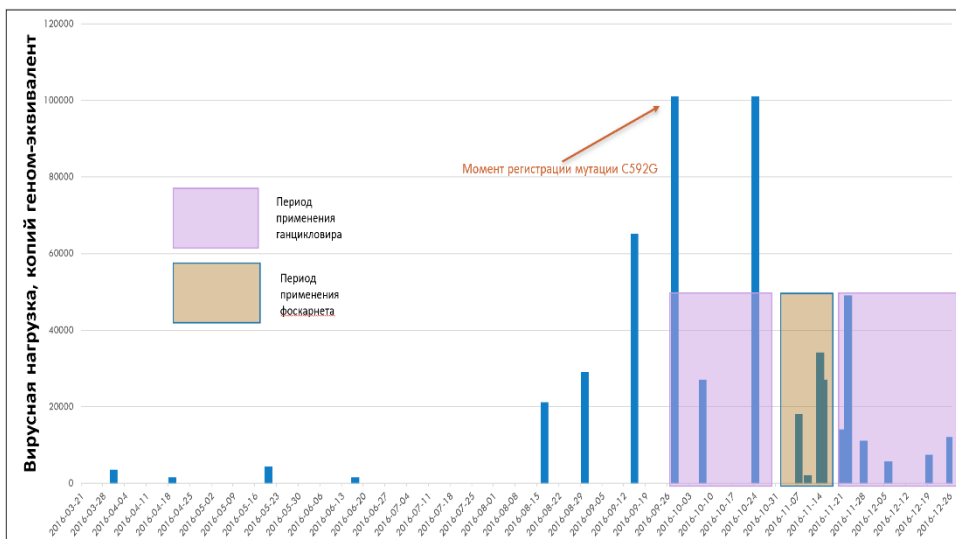


Рисунок 4. Динамика вирусной нагрузки на фоне проводимой противовирусной терапии у пациента ПР (стрелкой указан момент первичной регистрации мутации)

3.2. Пациент ФС

Клинический диагноз: острый миелоидный лейкоз. Трансплантация алло-ГСК от 21.12.2013 г. У этого пациента обнаружена ДНК ЦМВ, в которой в разные периоды были зафиксированы 2 ранее описанные в литературе мутации: С592G и С603W. При этом более агрессивная С603W впервые выявлена спустя 1184 дня после трансплантации. На основании изучения архивных образцов установлено, что мутация С592G возникла ещё до начала периода исследования (более 6 месяцев до выявления мутации С603W, см. **рис. 5**). В обозначенной на **рис. 6** временной точке одновременно детектировались обе мутации. Однако позднее мутация С592G перестала определяться с помощью секвенирования по Сенгеру, что может указывать на смену мажорного вирусного штамма в ходе наблюдения и проведения ПВТ (в т.ч. фоскарнетом). Приведённые факты с высокой степенью вероятности позволяют предполагать имевший место процесс селекции штамма под прессингом противовирусных препаратов, что видно на **рис. 6**.

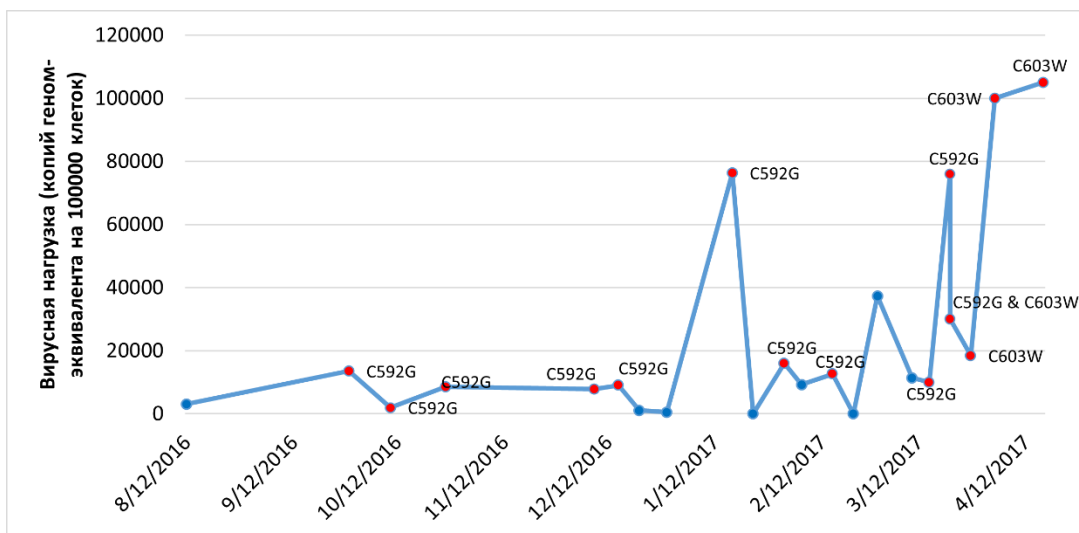


Рисунок 5. Динамика вирусной нагрузки до и после возникновения мутаций у пациента ФС

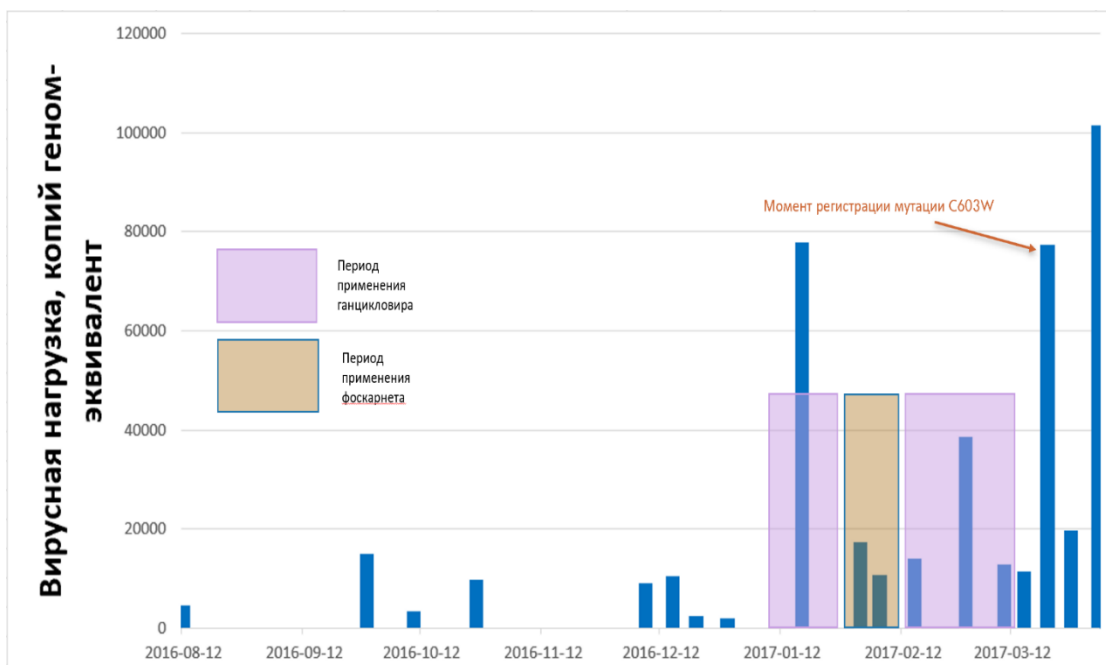


Рисунок 6. Динамика вирусной нагрузки на фоне проводимой противовирусной терапии у пациента ФС (стрелкой указан момент первичной регистрации мутации)

3.3. Пациент ПД

Клинический диагноз: острый лимфобластный лейкоз. Трансплантация алло-ГСК от 28.06.2017 г.

В данном клиническом случае была обнаружена 1 ранее описанная в литературе мутация – С607F. Исследование архивных образцов показало, что момент её возникновения можно считать +124 день после трансплантации (см. **рис. 7**). Анализ проводимой ПВТ в зависимости от ВН и выявление мутационных изменений представлен на **рис. 8**.

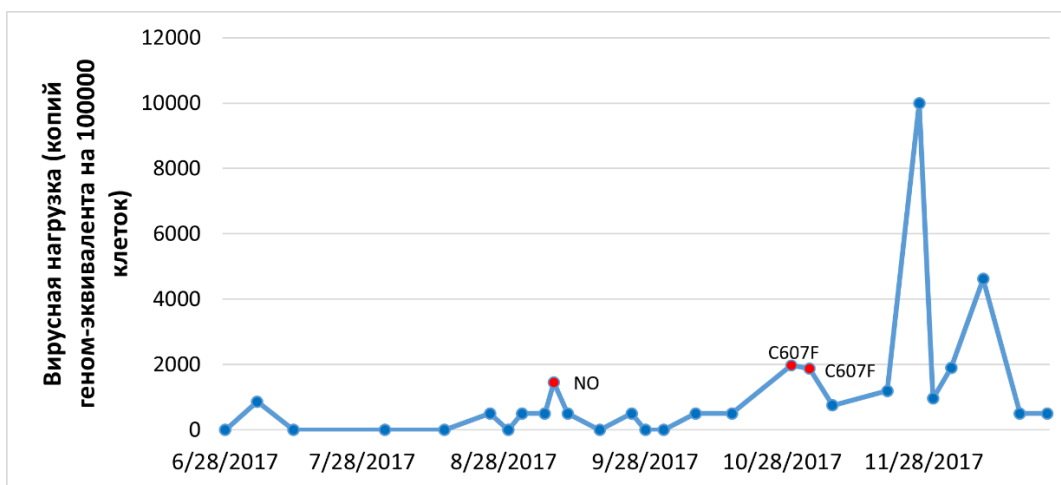


Рисунок 7. Динамика вирусной нагрузки до и после возникновения мутаций у пациента ФС

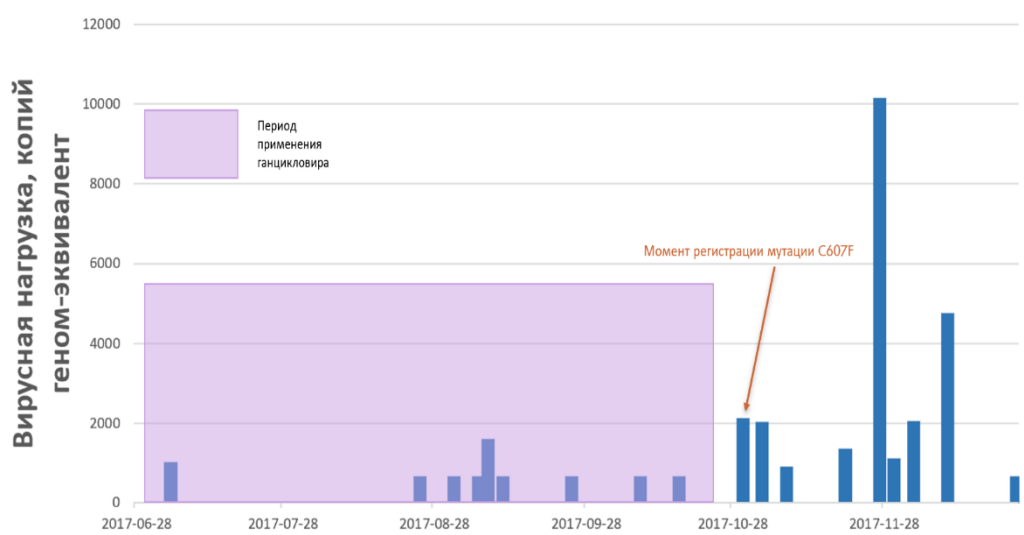


Рисунок 8. Динамика вирусной нагрузки на фоне проводимой противовирусной терапии у пациента ПД (стрелкой указан момент первичной регистрации мутации)

Изучение динамики появления мутантных штаммов показало, что все эпизоды возникновения мутации с высоким показателем фактора резистентности ассоциировались с ростом ВН у пациентов в крови. При этом её существенное повышение либо предшествует моменту регистрации новой мутации, либо совпадает с этой временной точкой.

В случае пациента ПР клинически значимое появление ЦМВ-ассоциированных инфекционных осложнений совпало с временем возникновения мутации. Впоследствии удалось достичь снижения показателя

ВН, применяя комплексную ПВТ: препараты иммуноглобулинов, ганцикловир и фоскарнет, что привело к стабилизации состояния и уменьшению ВН в крови.

У пациента ПД развитие острой ЦМВ-инфекции с гипертермией также имело место на фоне возрастания ВН и появления мутации. Резистентное течение инфекционного процесса констатировано лечащим врачом спустя несколько месяцев после возникновения мутационных изменений. На протяжении всего этого периода осуществлялось лечение валганцикловиром и человеческим иммуноглобулином. Тем не менее показатели ВН на фоне терапии не достигали столь высоких значений, как у остальных пациентов, включенных в исследование. Это может быть объяснено тем, что среди выявленных мутаций С607F обладает наиболее низким фактором устойчивости (1,9), что, очевидно, оказывает влияние на характер течения заболевания *in vivo*.

У больной ФС после возникновения второй мутации показатели ВН не снижались на фоне назначения ганцикловира, не был отмечен и клинический эффект. Присоединение к терапии препаратов иммуноглобулинов, согласно клиническим данным истории болезни пациента, способствовало достижению незначительного эффекта и нормализации состояния, но влияния на ВН при этом не отмечено. Несмотря на проводимые лечебные мероприятия, вскоре после обнаружения дополнительной мутации наступила смерть пациентки от резистентного септического шока.

Оценивая в целом данные о состоянии пациентов на протяжении периода наблюдения, дозы вводимых лекарственных средств и показатели ВН, можно утверждать, что при наличии мутаций с высоким фактором резистентности в геноме ЦМВ, применение ганцикловира и его производных не приводит к желаемому эффекту: ответ на терапию либо наступает позже, либо не наступает вовсе, в то время как ВН растёт вместе с ухудшением состояния пациента.

Показательно, что чем больше был фактор резистентности обнаруженной мутации, тем хуже были результаты проводимой противовирусной терапии.

4. Разработка тест-системы для идентификации мутаций в гене *UL97* ЦМВ

Учитывая высокую себестоимость секвенирования, в рамках исследования был разработан метод быстрой идентификации мутации в заранее известных кодонах на основе АС-ПЦР. Так как на предыдущем этапе исследования у реципиентов алло-ГСК были обнаружены описанные в литературе мутации С592G и С603W, была сформирована задача разработать тест-систему, способную детектировать наличие этих двух мутаций, относительно дешёвым и быстрым способом. Подобная тест-система была разработана на основе метода АС-ПЦР. В качестве положительного контроля были использованы образцы ДНК ЦМВ, в которых с помощью метода секвенирования по Сэнгеру, подтверждено наличие этих мутаций.

С помощью разработанной тест-системы были проанализированы архивные образцы ДНК, выделенной из клинического материала 209 пациентов (всего 675 архивных образцов). Достоверные результаты АС-ПЦР были получены для 578 из 675 образцов. В 98 образцах в ходе реакции были получены невалидные результаты, то есть не была зарегистрирована флуоресценция ни для реакционной смеси с праймерами, комплементарными ДНК дикого типа вируса, ни для мутанта. Объяснение этому скорее всего заключается в падении концентрации ДНК ЦМВ в архивном образце в ходе хранения.

Показано, что суммарно у 2.8% (16 из 578) пациентов, образцы ДНК которых были включены в исследование и дали валидные результаты, была обнаружена ДНК вируса с мутацией С603W, а в образцах 0.3% (2 из 578) пациентов – С592G. При этом последняя мутация выявлялась в основном совместно с С603W.

Заключение

В работе показано, что частота детекции штаммов ЦМВ, несущих мутации в участке гена вирусной фосфотрансферазы в изученных группах пациентов довольно высока. Были обнаружены следующие ранее описанные в литературе мутации резистентности к действию ганцикловира: С603W (фактор резистентности, ФР=8), С592G (ФР=2,9) del600 (ФР=1,9) и С607F (ФР=1,9). Полученные результаты показали, что наличие мутации и величина ее ФР влияют на вирусную нагрузку и длительность выявления в крови реципиентов ДНК ЦМВ. У реципиентов алло-ГСК с признаками резистентной ВГЧ-6-инфекции в участке гена вирусной фосфотрансферазы, аналогичном ЦМВ, не были обнаружены мутации устойчивости к действию ганцикловира.

Показано, что все эпизоды возникновения в геноме ЦМВ мутации с высоким ФР ассоциировались с ростом вирусной нагрузки, а также выявлена статистически значимая разница в величине ВН у пациентов до и после возникновения мутации на фоне проводимой противовирусной терапии ганцикловиром. Анализ клинико-лабораторных данных историй болезни пациентов (дозы вводимых противовирусных препаратов, величина ВН, описание течения эпизодов инфекционных осложнений и пр.) показал, что при наличии у реципиента алло-ГСК ЦМВ с мутацией, характеризующейся высоким ФР, противовирусная терапия ганцикловиром и его производными не оказывает желаемого эффекта, а именно – время ответа на терапию либо отложено, либо ответа вовсе не наступает, концентрация ДНК ЦМВ в крови пациента растет, а его состояние поступательно ухудшается.

В ходе выполнения исследования была разработана тест-система на основе АС-ПЦР позволяющая идентифицировать мутации с высоким фактором резистентности - С592G, С603W. Использование тест-системы на основе АС-

ПЦР может быть целесообразно для получения информации о распространенности тех или иных мутаций в гене UL97 в популяции РФ.

Выводы

- 1) Частота выявления ЦМВ и ВГЧ-6 у больных, получивших медицинскую помощь за период с 2015 по 2019 гг. выросла с 14,33% до 20,30% для ЦМВ и с 16,14% до 32,08% для ВГЧ-6.
- 2) У реципиентов алло-ГСК с признаками резистентных герпетических инфекций частота обнаружения мутаций резистентности к ганцикловиру составила 4 из 49 (8,2%) для ЦМВ и 0 из 41 (0%) для ВГЧ-6. В гене фосфоротрасферазы ЦМВ обнаружены мутации С592G, С603W, С607F и del600. Вирусная нагрузка в крови была выше у пациентов-носителей мутантного штамма.
- 3) Показано, что у реципиентов алло-ГСК появление ЦМВ с мутацией(-ями) устойчивости ассоциировано с повышением вирусной нагрузки и ухудшением ответа на терапию ганцикловиром. Показана связь между величиной фактора резистентности мутации и уровнем вирусной нагрузки на фоне противовирусной терапии. Смена противовирусной терапии (замена ганцикловира на фоскарнет) позволяет получить ответ.
- 4) Разработан прототип тест-системы для определения мутации С592G и С603W в гене UL97 ЦМВ на основе аллель специфичной ПЦР, с помощью которой определена частота мутаций среди больных, получивших медицинскую помощь в 2019 году и у которых была выявлена ДНК ЦМВ, которая составила 2.8% для С603W и 0.3% для С592G. В большинстве случаев С592G выявляется совместно с С603W.

Список публикаций по теме диссертации

1. Демин М.В., Тихомиров Д.С., Бидерман Б.В., Дроков М.Ю., Судариков А.Б., Туполева Т.А., Филатов Ф.П. Мутации в гене *ul97* цитомегаловируса (*herpesvirales: herpesviridae: cytomegalovirus: human betaherpesvirus 5*), ассоциированные с устойчивостью к ганцикловиру, у реципиентов аллогенных стволовых гемопоэтических клеток // Вопросы вирусологии. 2022. Vol. 67, № 1. P. 37–47. SJR = 0.213. Доля участия = 90%. 1 п.л.
2. Демин М.В., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А., Филатов Ф.П. Устойчивость к противовирусным препаратам у вирусов человека из подсемейства *betaherpesvirinae* // Вопросы вирусологии. 2022. Vol. 67, № 5. P. 385–394. SJR = 0.213. Доля участия = 90%. 0.9 п.л.
3. Демин М.В., Тихомиров Д.С., Бидерман Б.В., Глинщикова О.А., Дроков М.Ю., Судариков А.Б., Туполева Т.А., Паровичникова Е.Н., Филатов Ф.П. Цитомегаловирус после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: реактивация или реинфекция новым штаммом? // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2022. Vol. 23, № 2. P. 138–145. SJR = 0.116. Доля участия = 90%. 0.8 п.л.
4. Дмитрова А.А., Дроков М.Ю., Вагида М.С., Кирюхин Д.О., Васильева В.А., Попова Н.Н., Михальцова Е.Д., Довыденко М.В., Королева О.М., Дубняк Д.С., Конова З.В., Ахмедов М.И., Никифорова Н.М., Масликова У.В., Старикова О.С., Омарова Ф.А., Кольгаева Э.И., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А., Демин М.В. и др. Влияние серологического статуса донора и реципиента на восстановление противовирусного иммунитета у пациентов после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток // Клеточная Терапия и Трансплантация. 2021. Vol 10, № 3. P. 69–71. SJR = 0.129. Доля участия = 10%. 0.3 п.л.

5. Тихомиров Д.С., Демин М.В., Дроков М.Ю., Бидерман Б.В., Судариков А.Б., Туполева Т.А., Филатов Ф.П., Паровичникова Е.Н. Определение мутаций в гене *UL97* цитомегаловируса, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, у реципиентов аллогенных стволовых гемопоэтических клеток // Гематология и трансфузиология. 2020. Vol. 65. № 1. P. 226–227. SJR = 0.127. Доля участия = 50%. 0.2 п.л.
6. Демин М.В., Тихомиров Д.С., Бидерман Б.В., Глинщикова О.А., Дроков М.Ю., Судариков А.Б., Туполева Т.А., Филатов Ф.П. Мутации в гене *UL97* цитомегаловируса, ассоциированные с устойчивостью к ганцикловиру, у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2019. Vol. 21, № 4. P. 352–357. SJR = 0.116. Доля участия = 90%. 0.5 п.л.
7. **Demin M.V.**, Tikhomirov D.S., Biderman B.V., Glinshchikova O.A., Tupoleva T.A., Sudarikov A., Filatov F.F., Gaponova T.V., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. Differences of human cytomegalovirus strains in recipients of allogeneic hematopoietic stem cells before and after transplantation // Blood. 2017. Vol. 130, № 1. P. 5510. SJR = 4.927. Доля участия = 90%. 0.1 п.л.