

Резистентность вируса гепатита В к противовирусной терапии: диагностика, профилактика и лечение

Д.Т. Абдурахманов

Кафедра терапии и профболезней ММА им. И.М. Сеченова

В последнее десятилетие в лечении хронического гепатита В наряду с препаратами интерферона- α , в том числе пегилированными, которые применяются с 1992 г., стали использоваться нуклеоз(т)идные аналоги. В настоящее время в мире зарегистрированы 4 препарата из этого класса – ламивудин, адефовир дипивоксил, энтекавир и телбивудин (в России на данный момент зарегистрирован только ламивудин). Наряду с преимуществами этого класса препаратов (удобство применения, отсутствие серьезных нежелательных явлений), имеется ряд ограничений, прежде всего, отсутствие в большинстве случаев стойкого вирусологического ответа и связанная с этим неопределенная длительность лечения. Другой серьезной проблемой применения нуклеоз(т)идных аналогов является развитие к ним резистентности вследствие мутаций вируса, которая приводит к реактивации инфекции и обострению заболевания.

Механизм резистентности

Вирус гепатита В (HBV) обладает высокой репликативной активностью (за сутки может синтезироваться до 10^{12} - 10^{13} вирусных частиц), что сопровождается повышенной частотой развития мутантных штаммов (10^{10} точечных мутаций генома в сутки) [1, 2]. При этом мутантные штаммы, сохраняющие репликативную активность, способны закрепляться, в результате популяция вируса в организме представлена различными квазивидами, с одним наиболее репликативно активным доминирующим, штаммом вируса. Наибольший риск развития и селекции мутантных штаммов наблюдается при лечении препаратами с умеренной противовирусной активностью и одной точкой приложения, особенно при монотерапии; и минимальный – при использовании препаратов с низкой или высокой противовирусной активностью (в первом случае вследствие того, что препарат не способен адекватно подавить доминирующий штамм, во втором – выраженное ингибирование репликации вируса подавляет не только доминирующий, но и мутантные штаммы) (рис. 1) [3].

Нуклеоз(т)идных аналоги встраиваются вместо естественных нуклеотидов в синтезируемую вирусом при своем размножении цепь РНК или ДНК и, нарушают тем самым дальнейшее построение молекулы вируса. Таким образом, эти препараты, их еще называют “chain terminators”, блокируют репликацию вируса.

В ходе их применения или спонтанно могут развиваться мутации Р-гена вируса, что приводит к изменению конфигурации различных участков (доменов) молекулы ДНК-полимеразы вируса и утрате противовирусного эффекта. Основной участок ДНК-полимеразы – обратная транскриптаза – образован 7 регионами, которые обозначаются латинскими буквами (A-G), наиболее часто мутации, главным образом замена одного аминокислотного остатка на другой, наблюдаются в В и С регионах (рис. 2).

На примере ламивудина развитие резистентности к препарату выглядит следующим образом: ламивудин связывается с ДНК полимеразой в участке молекулы, который отчасти образован аминокислотным остатком 204. При замене метионина изолейцином или валином

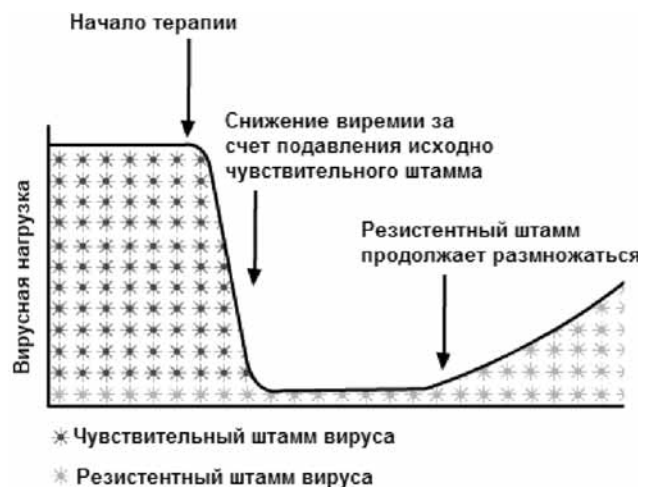


Рис. 1. Механизм селекции мутантного штамма в ходе лечения

Резистентность вируса гепатита В к противовирусной терапии: диагностика, профилактика и лечение

Д.Т. Абдурахманов

Кафедра терапии и профболезней ММА им. И.М. Сеченова

В последнее десятилетие в лечении хронического гепатита В наряду с препаратами интерферона- α , в том числе пегилированными, которые применяются с 1992 г., стали использоваться нуклеоз(т)идные аналоги. В настоящее время в мире зарегистрированы 4 препарата из этого класса – ламивудин, адефовир дипивоксил, энтекавир и телбивудин (в России на данный момент зарегистрирован только ламивудин). Наряду с преимуществами этого класса препаратов (удобство применения, отсутствие серьезных нежелательных явлений), имеется ряд ограничений, прежде всего, отсутствие в большинстве случаев стойкого вирусологического ответа и связанная с этим неопределенная длительность лечения. Другой серьезной проблемой применения нуклеоз(т)идных аналогов является развитие к ним резистентности вследствие мутаций вируса, которая приводит к реактивации инфекции и обострению заболевания.

Механизм резистентности

Вirus гепатита В (HBV) обладает высокой репликативной активностью (за сутки может синтезироваться до 10^{12} - 10^{13} вирусных частиц), что сопровождается повышенной частотой развития мутантных штаммов (10^{10} точечных мутаций генома в сутки) [1, 2]. При этом мутантные штаммы, сохраняющие репликативную активность, способны закрепляться, в результате популяция вируса в организме представлена различными квазивидами, с одним наиболее репликативно активным доминирующим, штаммом вируса. Наибольший риск развития и селекции мутантных штаммов наблюдается при лечении препаратами с умеренной противовирусной активностью и одной точкой приложения, особенно при монотерапии; и минимальный – при использовании препаратов с низкой или высокой противовирусной активностью (в первом случае вследствие того, что препарат не способен адекватно подавить доминирующий штамм, во втором – выраженное ингибирование репликации вируса подавляет не только доминирующий, но и мутантные штаммы) (рис. 1) [3].

Нуклеоз(т)идных аналоги встраиваются вместо естественных нуклеотидов в синтезируемую вирусом при своем размножении цепь РНК или ДНК и, нарушают тем самым дальнейшее построение молекулы вируса. Таким образом, эти препараты, их еще называют “chain terminators”, блокируют репликацию вируса.

В ходе их применения или спонтанно могут развиваться мутации Р-гена вируса, что приводит к изменению конфигурации различных участков (доменов) молекулы ДНК-полимеразы вируса и утрате противовирусного эффекта. Основной участок ДНК-полимеразы – обратная транскриптаза – образован 7 регионами, которые обозначаются латинскими буквами (A-G), наиболее часто мутации, главным образом замена одного аминокислотного остатка на другой, наблюдаются в В и С регионах (рис. 2).

На примере ламивудина развитие резистентности к препарату выглядит следующим образом: ламивудин связывается с ДНК полимеразой в участке молекулы, который отчасти образован аминокислотным остатком 204. При замене метионина изолейцином или валином

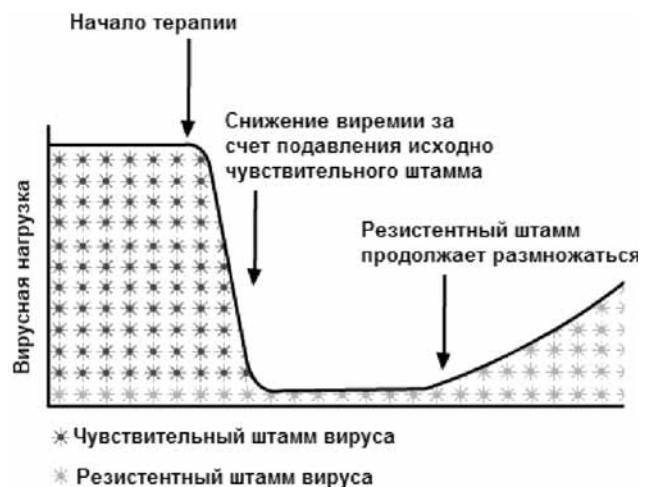


Рис. 1. Механизм селекции мутантного штамма в ходе лечения

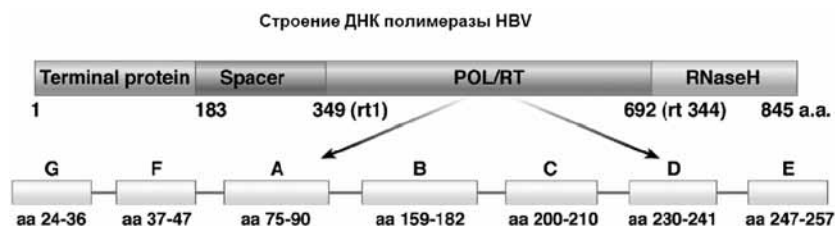


Рис. 2. Строение ДНК-полимеразы вируса гепатита В

(вследствие мутации) наблюдается постепенное укорочение боковой цепи. По мере ее укорочения увеличивается размер углубления на поверхности ДНК полимеразы и связывание ламивудина с этим участком фермента затрудняется, в результате чего эффект препарата утрачивается.

В настоящее время известно, что резистентные штаммы вируса могут как присутствовать исходно, так и формироваться в ходе лечения нуклеоз(т)идными аналогами.

Клинические формы резистентности

Выделяют первичную резистентность, когда доминирующий штамм вируса исходно не чувствителен или мало чувствителен к противовирусному действию препарата, при этом уровень виремии не снижается более чем на один логарифм в течение первых трех месяцев лечения. Однако чаще в клинической практике встречается вторичная резистентность, когда после начального периода значительного снижения уровня виремии (в том числе до неопределяемого уровня) наблюдается повторное повышение репликативной активности вируса (более одного логарифма от наименьшего достигнутого в ходе лечения) (рис. 3). Выделяют следующие формы резистентности, которые можно также назвать ее последовательными стадиями:

1) генотипическая резистентность (обнаружение мутантных штаммов вируса в крови с помощью секвенирования гена полимеразы вируса), которая развива-

ется вследствие мутаций в Р участке генома вируса;

2) фенотипическая резистентность — снижение чувствительности мутантного штамма к препарату в исследовании *in vitro*;

3) клиническая резистентность (рецидив активности печеночного процесса, по данным биохимического или морфологического исследования).

Необходимо отметить, что генетическая, а также фенотипическая резистентность не всегда сопровождается клиническим обострением заболевания, в частности повышением активности аминотрансфераз, а также, что от момента появления мутантных штаммов вируса до развития клинического обострения может пройти от 1 до 6 месяцев.

Резистентность к ламивудину

Лечение ламивудином приводит к мутациям в Р-гене, что изменяет последовательность аминокислотных остатков в С регионе (YMDD мотив — тирозин[Y]-метионин[M]-аспарат[D]-аспарат[D]) обратной транскриптазы вируса. Этот участок является ключевым для фермента и отвечает за захват нуклеозидов. Чаще всего встречаются два типа мутаций: замена метионина на валин или изолейцин или серин в позиции 204 (M204V/I/S) и лейцина на метионин в позиции 180 (L180M). Как показали дальнейшие исследования, M204V/I/S мутация является основной и определяет резистентность вируса к ламивудину, а L180M — дополнительной, которая усиливает репликативную активность мутантного штамма [4]. Кроме того, описан еще ряд дополнительных мутаций (V173L и L80V/I), значение которых предстоит уточнить, возможно, они также усиливают репликативную активность и селекцию мутантных штаммов вируса [16, 17]. Впервые эти

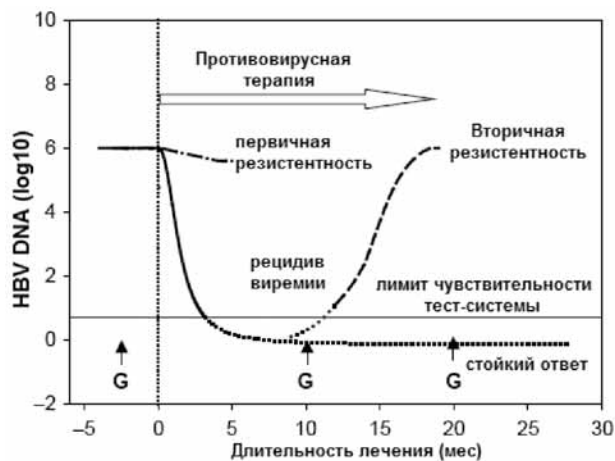


Рис. 3. Клинические формы резистентности

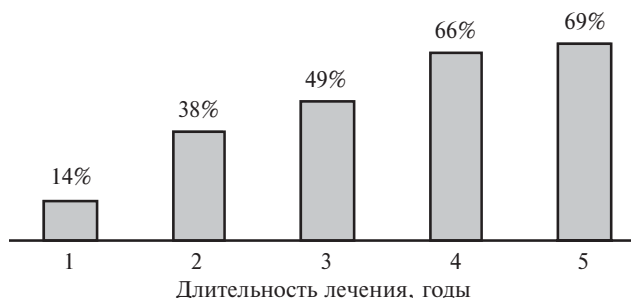


Рис. 4. Частота развития YMDD-мутаций при лечении ламивудином HBeAg-позитивного гепатита В

Таблица 1. Факторы риска развития YMDD-мутантных штаммов HBV в ходе лечения ламивудином

Наиболее вероятные	Возможные
- Высокий исходный уровень HBVDNA в крови	- Уровень HBVDNA более 1000 копий /мл на 6 мес лечения
- Мужской пол	- Высокий исходный уровень АЛТ
- Повышенный индекс массы тела	- Некоторые генотипы HBV

Таблица 2. Клинические последствия резистентности

<i>Утрата лечебного эффекта</i>
- Уменьшение частоты сероконверсии HBeAg
- Рецидив активности печеночного процесса
- Усиление прогрессирования фиброза печени
- Тяжелое обострение заболевания у больных циррозом
- Риск потери трансплантата и смерти у больных после пересадки печени
<i>Эпидемиологические последствия</i>
- Распространение лекарственно-устойчивых штаммов
- Появление “вакцин-ускользающих” штаммов HBV

мутации были обнаружены у пациентов с рецидивом HBV инфекции после трансплантации печени на фоне приема ламивудина [5, 6]. Как показали исследования, устойчивость к терапии и реактивация инфекции обычно появляются после 7-8 месяцев лечения, и с увеличением длительности лечения частота развития мутаций повышается (рис. 4) [7, 8, 9].

Клинически резистентность к ламивудину проявляется повторным возникновением или увеличением вирусной нагрузки и активности аминотрансфераз в ходе лечения. При этом появление YMDD-мутантных штаммов, как правило, на 3-6 мес предшествует повышению активности аминотрансфераз. Факторы риска развития YMDD-мутантных штаммов изучены не достаточно, однако исходно высокая вирусная нагрузка до начала лечения, мужской пол и повышенный индекс массы тела чаще связаны с появлением устойчивых штаммов [10]. Риск развития YMDD-мутантных штаммов также повышен при некоторых генотипах HBV, исходно высокой активности АЛТ и сохранении уровня вирусной нагрузки более 1000 копий /мл на 6 мес лечения (табл. 1) [11].

По некоторым данным, репликативная и патогенная активность YVDD/YIDD штаммов HBV ниже, чем ис-

ходно “дикого” типа вируса [12]. Кроме того, в ряде работ показано, что реактивация инфекции на фоне появления YMDD-мутантных штаммов HBV, может завершиться сероконверсией е-антигена и ремиссией процесса [13]. Однако в большинстве случаев развитие YMDD-мутантных штаммов HBV приводит к утрате лечебного эффекта, в том числе описаны случаи тяжелого обострения гепатита и декомпенсации функции печени [9]. Другой серьезной проблемой, связанной с формированием ламивудин-резистентных штаммов, является их более низкая чувствительность к последующей терапии (табл. 2).

Резистентность к адефовиру

При лечении адефовирусом описаны две основные мутации, определяющие резистентность к адефовиру, — N236T (замена аспарагина[N] на треонин[T] в позиции 236 D-региона обратной транскриптазы) или A181V (замена аденина[A] на валин[V] в позиции 181 В-региона обратной транскриптазы вируса) [14]. Кроме того, выделяют целый ряд других мутаций (L80V/I, V84M, V214A, S85A Q215S, P237H и N238T/D), которые сочетаются с одной из основных, или, реже — встречаются изолированно. Частота развития мутаций к адефовиру ниже, чем при лечении ламивудином и достигает 29% при 5-летнем приеме препарата (рис. 5) [15]. Несмотря на то, что адефовир не обладает перекрестной резистентностью с ламивудином и эффективен у больных с YMDD-мутантными штаммами вируса, показано, что резистентность к адефовиру развивается быстрее при лечении больных с исходной резистентностью к ламивудину [18, 19].

Резистентность к энтекавиру

При лечении энтекавирусом описано развитие ряда специфических для препарата мутантных штаммов — T184S/A/I/L, S202G/C и M250I/V в регионах В, С и Е обратной транскриптазы вируса соответственно, а также мутаций, характерных для лечения ламивудином — M204V/I/S и L180M. Анализ 4-летнего приема энтекавира показал, что препарат обладает наилучшим профилем резистентности среди исполь-

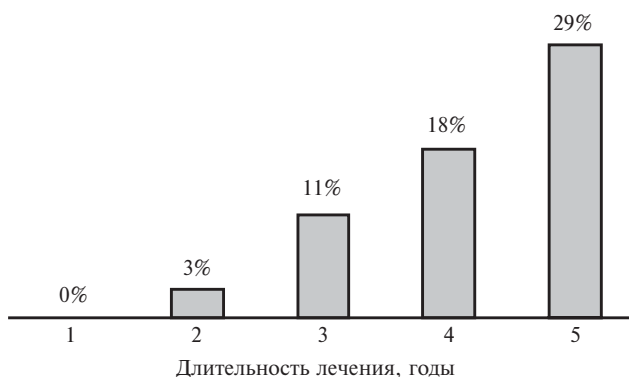


Рис. 5. Частота развития мутантных штаммов HBV при лечении адефовирусом

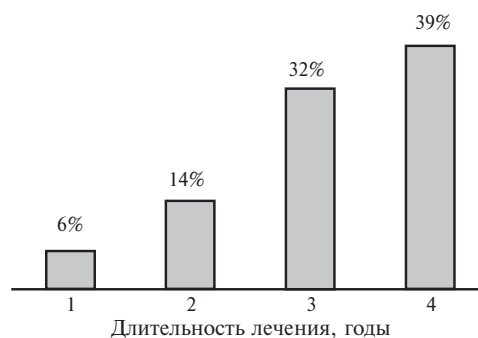


Рис. 6. Частота развития резистентности к энтекавиру у больных с исходной устойчивостью к ламивудину

Таблица 3. Перекрестная резистентность *in vitro* (степень снижения чувствительности) к наиболее распространенным ламивудин-резистентным штаммам HBV

Препарат	Степень снижения чувствительности*			
	L180M+M204V	V173L+L180M+M204V	M204I	L180M+M204I
Адефовир	1,1	1,1	1,8	2,1
Тенофовир	0,8	1,8	2,1	0,7
Энтекавир	37	164	471	38
Телбивудин	>322	>322	>322	>322
Эмтрицитабин	>2000	898	>2000	845
Ламивудин	>700	>1000	>1000	>1000

Примечание: *Определяется как соотношение концентраций препарата, необходимых для подавления на 50% репликации “дикого” и мутантного штаммов HBV. Тенофовир и эмтрицитабин применяются для лечения ВИЧ-инфекции, изучается их эффективность при HBV-инфекции

зуемых для лечения хронического гепатита В нуклеоз(т)идных аналогов. Так, частота развития мутантных штаммов вируса у больных, не получавших ранее лечения, не превышает 1% [20]. В основном резистентность к энтекавиру наблюдается при лечении больных с исходной резистентностью к ламивудину и достигает 39% при 4-летнем применении препарата (рис. 6) [20].

Резистентность к телбивудину

При лечении телбивудином описано развитие мутаций, аналогичных при использовании ламивудина — M204I, L180M и L80V/I, поэтому между обоими препаратами существует перекрестная резистентность [21]. Частота развития резистентных к телбивудину штаммов HBV составляет около 15% при 2-летнем приеме препарата и существенно отличается у больных с HBeAg-положительным и негативным хроническим гепатитом В — 21,6% и 8,6% соответственно [22].

Перекрестная резистентность

Перекрестная резистентность характеризуется снижением чувствительности нуклеоз(т)идных аналогов к мутантному штамму вируса, образовавшемуся при лечении другим нуклеоз(т)идным аналогом. При этом выделяют низкую, умеренную и высокую степень ре-

зистентности, которую определяют как *in vitro*, так и *in vivo* [23]. Как правило, более высокий риск перекрестной резистентности наблюдается между препаратами со сходной структурой молекулы, например ламивудином, телбивудином и энтекавиrom или адефовиrom и тенофовиrom. Наиболее изучена перекрестная резистентность к самым распространенным ламивудин-индуцированным мутантным штаммам вируса (табл. 3).

Однако данные, полученные *in vitro*, не всегда можно полностью экстраполировать на клинику — так, несмотря на перекрестную резистентность ламивудина и энтекавира, последний сохраняет противовирусную активность в отношении ламивудин-резистентных штаммов вируса.

Мультирезистентность

Мультирезистентность характеризуется появлением мутантных штаммов вируса резистентных к двум или более нуклеоз(т)идным аналогам. Так, при последовательном применении ламивудина и затем адефовира описано развитие мутантного штамма (V173L+L180M+A181T+N236T) резистентного к обоим препаратам [24]. Кроме того, у больных с исходной резистентностью к ламивудину при последующем лечении энтекавиrom отмечено развитие мутантных штаммов вируса, резистентных к обоим препаратам [20, 25].

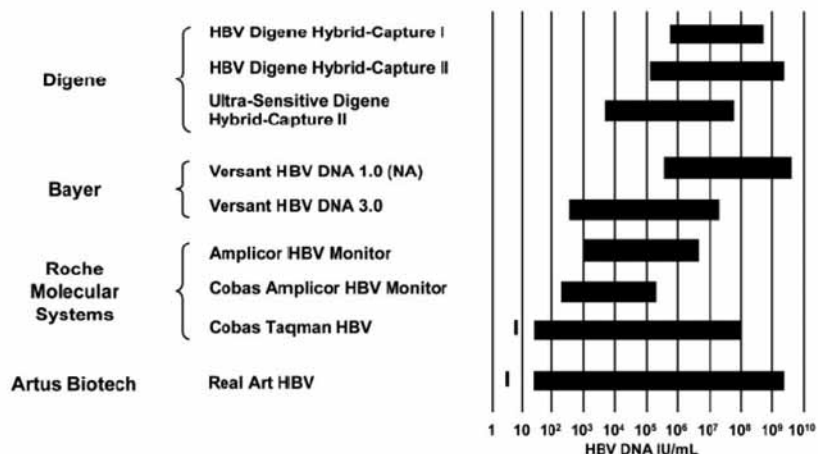


Рис. 7. Тест-системы для оценки уровня вирусии HBV

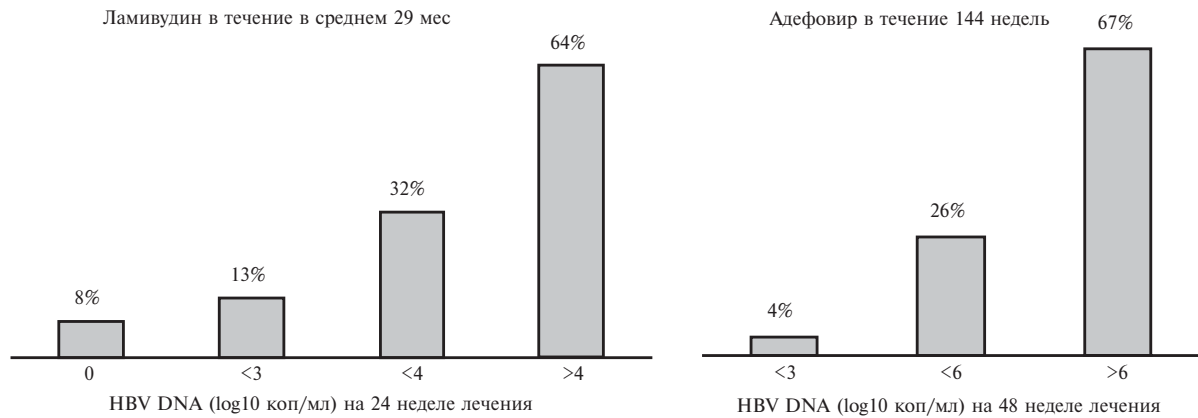


Рис. 8. Риск развития резистентности при лечении ламивудином и адефовиром в зависимости от уровня виремии в ходе терапии

Диагностика резистентности

Тщательный контроль уровня виремии (качественный и количественный уровень HBVDNA в сыворотке крови) в ходе лечения с помощью высокочувствительных тестов является основным условием ранней диагностики появления и селекции резистентных штаммов HBV, что позволяет своевременно изменить схему лечения и предотвратить обострение заболевания. Для качественной и количественной оценки уровня виремии используются различные методики (рис. 7), при этом наиболее эффективными являются тесты с использованием полимеразной цепной реакции в “реальном времени”, в частности тест-системы Roche – Cobas Amplicor HBV Monitor и Cobas Tagman 48 HBV – с нижним порогом определения HBVDNA до 300 и 30 ME/мл соответственно.

При мониторинге уровня виремии в ходе лечения рекомендуется применение одной методики, при этом частота мониторинга определяется как профилем резистентности препарата (при использовании ламивудина и телбивудина каждые 3 мес после 6 месяца лечения, адефовира и энтекавира – каждые 6 мес после года лечения), так и тяжестью поражения печени (при хроническом гепатите – каждые 6 мес, при выраженном фиброзе или циррозе печени – каждые 3 мес).

После выявления виремии необходима генетическая идентификация HBV (исходный или мутантный штамм), ответственного за рецидив. В первом случае можно говорить о нарушении больным режима приема препарата, во втором – о лекарственной резистентности. С целью генотипического исследования используют различные методики ДНК секвенирования или гибридизации. Методы секвенирования ДНК, в частности RFLP-тест, способны выявлять мутантный штамм, если его содержание превышает 5% от общей популяции вируса. Эти методики также могут использоваться для исходной оценки популяции вируса, так как мутантный штамм может присутствовать еще до начала лечения, вследствие спонтанной мутации или инфицирования смешанной популяцией вируса.

Одновременно с уровнем виремии рекомендуется

исследование активности печеночных ферментов сыворотки, прежде всего, АЛТ и АСТ.

Профилактика резистентности

Профилактику резистентности и ее клинических последствий обеспечивает правильная стратегия лечения, которая основывается на следующих положениях:

- выбор препарата с наибольшей противовирусной активностью (“нет репликации” – “нет резистентности”);
- выбор препарата с наилучшим профилем резистентности;
- комбинированная терапия
- своевременная модификация схемы лечения (добавление или переход на другой препарат) с учетом перекрестной резистентности при развитии мутантных штаммов вируса;

Как показали исследования эффективности ламивудина и адефовира, риск развития резистентных штаммов вируса зависит от выраженности подавления репликации вируса в ходе лечения (рис. 8). Так, в исследовании Yuen M. et al., показано, что если на 6 мес лечения уровень виремии снижается до неопределяемого, то частота развития резистентных штаммов при лечении в среднем около 3 лет составляет 8%, а при

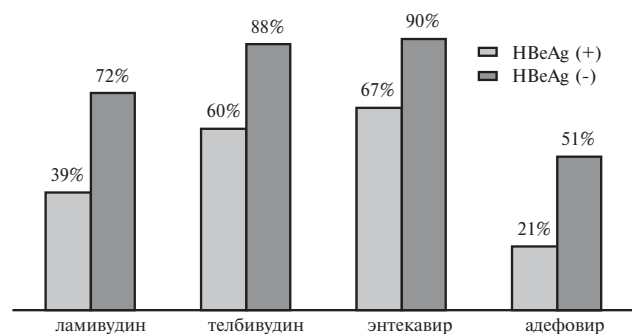


Рис. 9. Частота клиренса HBV DNA при лечении в течение года различными противовирусными препаратами при HBeAg-позитивном и негативном гепатите В

Таблица 4. Чувствительность резистентных штаммов HBV к противовирусным препаратам (in vitro)

	Ламивудин-резистентные (L180M + M204V)	Адефовир-резистентные (N236T)	Адефовир-резистентные (A181V)
Противовирусная активность снижена	Энтекавир Телбивудин	Тенофовир	Энтекавир Ламивудин
Противовирусная активность сохранена	Адефовир Тенофовир	Энтекавир Ламивудин Телбивудин	Тенофовир

уровне виремии $>4 \log_{10}$ – 64% [26]. При лечении адефовиром в течение 5 лет наибольший риск резистентности (почти 67%) у больных, у которых уровень виремии превышает $6 \log_{10}$ после первого года приема препарата [27]. Аналогичные данные получены в ходе изучения эффективности и профиля резистентности телбивудина [22].

Поэтому выбор препарата с максимальным подавлением репликации вируса является условием профилактики и минимизации риска резистентности. Среди всех нуклеоз(т)идных аналогов, наиболее выраженное подавление репликации вируса как при HBeAg-положительном, так и HBeAg-негативном хроническом гепатите В отмечено при лечении энтекавиром и телбивудином (рис. 9).

Другим важным аспектом выбора лечения является использование препаратов с наилучшим профилем резистентности. При лечении интерфероном- α , в том числе пегилированным интерфероном- α , развития резистентных мутантных штаммов вируса не отмечено, при лечении энтекавиром (у больных, не получавших ранее нуклеозидные аналоги) этот риск минимальный (менее 1% при 4-летнем опыте применения препарата).

Комбинированная терапия ламивудином и пэгинтерфероном α -2а, не показала преимуществ по сравнению с монотерапией пэгинтерфероном α -2а в плане противовирусной активности, аналогичные данные были получены при сравнении сочетания адефовира и ламивудина с монотерапией каждым из препаратов [28]. Однако в этих исследованиях отмечен более низкий риск развития резистентных штаммов вируса в группе больных, получавших комбинированную терапию. Так, в исследовании Sung J. et al., частота развития ламивудин-резистентных штаммов вируса у больных, получавших ламивудин и адефовир, и монотерапию ламивудином в течение года составила 2% и 20% соответственно [28].

Лечение резистентных штаммов вируса

Тактика лечения при развитии резистентности определяется вариантом мутантного штамма и его чувствительностью к другим противовирусным препаратам. Как правило, в зависимости от варианта мутации ряд препаратов сохраняют противовирусную активность, некоторые – утрачивают частично или полностью (таблица 4). При этом необходимо подчеркнуть, что препараты интерферона- α сохраняют противовирусную активность в отношении всех мутантных штам-

мов, обусловленных лечением нуклеоз(т)идными аналогами, в том числе мультирезистентных.

При развитии ламивудин-резистентных штаммов вируса предпочтительно применение адефовира или тенофовира (последний, по видимому, обладает более выраженной активностью по сравнению с адефовиром), а также энтекавира (в этом случае необходимо помнить о риске развития резистентных штаммов вируса). При этом адефовир или тенофовир рекомендуют присоединять к ламивудину, а энтекавир использовать вместо ламивудина. При адефовир-резистентных штаммах вируса наиболее оправдано применение энтекавира или ламивудина (предпочтительно их присоединять к адефовиру) либо замена адефовира комбинацией эмтрицитабина и тенофовира. При энтекавир-резистентных штаммах наиболее оправданным является добавление к энтекавиру адефовира или тенофовира.

Таким образом, наибольшее значение для профилактики или снижения риска развития резистентных штаммов вируса имеет выбор адекватной схемы лечения, в качестве первой линии рекомендуется монотерапия препаратами с максимальной противовирусной активностью (энтекавир, телбивудин) и наилучшим профилем резистентности (пегилированный интерферон- α , энтекавир). Важным условием предотвращения клинического обострения заболевания при развитии резистентности к лечению является раннее обнаружение мутантных штаммов вируса и модификация схемы лечения с учетом перекрестной резистентности. При монотерапии рекомендуется, в большинстве случаев, избегать последовательного назначения нуклеоз(т)идных аналогов для профилактики селекции мультирезистентных штаммов вируса.

Литература

1. Nowak M.A., Bonhoeffer S., Hill A.M. et al. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci., U S A.* 1996, 93, 4398-4402.
2. Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol.*, 2001, 82, 693-712.
3. Locarnini S., Hatzakis A., Heathcote J. et al. Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther.*, 2004, 9, 679-693.
4. Allen M.I., Deslauriers M., Andrews C.W. et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology*, 1998, 27, 1670-1677.
5. Ling R., Mutimer D., Ahmed M. et al. Selection of mutations in hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology*, 1996, 24, 711-713.
6. Tipples G.A., Ma M.M., Fisher K.P. et al. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology*, 1996, 24, 714-718.
7. Lau D.Y., Khokhar F., Doo E. et al. Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology*, 2000, 32, 838-844.