

На правах рукописи

Кичатова Вера Сергеевна

КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ В БЕЛКАХ CORE И NS5A  
ВИРУСА ГЕПАТИТА С

03.02.02 – Вирусология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2020 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова»

**Научный руководитель:**

**Кюрегян Карен Каренович** – доктор биологических наук, профессор РАН

**Официальные оппоненты:**

**Ведущая организация:**

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_20\_\_\_ г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д001.043.01 при ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова 15/17.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17) и на сайте <http://www.influenza.spb.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_20\_\_\_ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат биологических наук

Амосова И.В.

## Общая характеристика работы

**Актуальность темы исследования.** Гепатит С (ГС) - социально значимая инфекция, для которой отсутствует специфическая иммунопрофилактика. Однако за последние несколько лет произошел принципиальный прорыв в терапии хронического гепатита С (ХГС) – появились высокоэффективные препараты прямого действия (ППД), при применении которых наблюдается достижение устойчивого вирусологического ответа (УВО) более чем в 95% случаев [EASL, 2018].

Неудачи терапии, по-видимому, обусловлены сочетанием нескольких неблагоприятных факторов, одним из которых является феномен лекарственной резистентности вируса гепатита С (ВГС). Анализ Европейской базы данных по резистентности к ППД продемонстрировал, что в 83% случаев отсутствия УВО в участках генома вируса, кодирующих белки мишени для ППД, обнаруживались 1 или несколько аминокислотных замен, ассоциированных с лекарственной резистентностью (Resistance Associated Substitution, RAS) [Vermehren J., 2016]. Наибольшее клиническое значение продемонстрировали RAS ВГС, связанные с резистентностью к ингибиторам белка NS5a (даклатасвир, ледипасвир, омбитасвир и элбасвир), являющимися препаратами первой линии [Wyles D.L., 2017].

По расчетным данным, в РФ проживает около 3 миллионов инфицированных ВГС лиц, однако эффективные схемы лечения, включающие ППД последнего поколения, применяются крайне редко (1,7% случаев) в виду высокой стоимости и низкой доступности данных препаратов [Никитин И.Г. 2015]. В результате этого, комбинированная терапия пегилированным интерфероном (ПЕГ-ИНФ) и рибавирином по-прежнему является актуальным, а иногда и единственно доступным видом терапии.

В нашей стране на долю ВГС-1b, хуже поддающегося интерферонотерапии по сравнению с другими генотипами, приходится около 55% случаев инфицирования ВГС [PetruzzIELLO A., 2016]. В ряде работ было показано, что замены аминокислот Q/H70R и M91L в core ВГС-1b ассоциированы с низкой частотой достижения УВО при лечении препаратами ИНФ, а также с повышенным риском гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) [Akuta N., 2005]. Стоит отметить, что в отличие от замен Q/H70R, клиническая значимость которых была неоднократно доказана, данные по 91 aa позиции носят весьма противоречивый характер [El-Shamy A., 2014].

Учитывая тот факт, что современные схемы лечения ХГС представляют собой существенное экономическое бремя для системы общественного здравоохранения, знания особенностей молекулярной эпидемиологии ВГС, полученные при изучении отечественных изолятов данного вируса, внесут свой вклад в выбор оптимальной схемы лечения пациентов с ВГС инфекцией.

### Степень разработанности темы

Несмотря на то, что первый ППД был зарегистрирован в РФ в 2013 году [Эсауленко Е.В., 2013], а в иностранных работах феномен лекарственной резистентности упоминается с 2011 года [Powdrill M.H., 2011], изучению распространенности RAS в РФ уделяется недостаточно внимания. Так, по опубликованному на момент обзора литературы данным, оценка распространенности RAS NS5a среди нелеченных пациентов проводилась в единственном исследовании, которое было ограничено изучением ВГС субтипа 1b (ВГС-1b) [Булатова К.В., 2017]. Той же группой отечественных исследователей был проведен анализ частоты распространенности RAS в двух других белках ВГС-1b, являющихся мишенями

ППД – NS3 и NS5b. Согласно полученным результатам, частота встречаемости RAS NS3 составила всего 5,5% (n=20/364), в то время как в белке NS5b единичные, двойные и даже тройные RAS встречались среди 55,4% исследованных образцов [Карандашова И. В., 2018, Булатова К. В., 2018].

Принимая во внимание высокую распространенность ВГС-1b на территории РФ (55% общей популяции ВГС), сохранение роли препаратов ИНФ в терапии, а также высокий риск развития ГЦК в исходе ХГС, представляется весьма существенным пробелом отсутствие данных о распространенности мутаций в белке core среди штаммов ВГС-1b в РФ до момента проведения настоящего исследования.

**Цель работы** - определение распространенности и спектра клинически значимых полиморфизмов в белках core и NS5a среди штаммов вируса гепатита С, циркулирующих на территории РФ.

#### **Задачи исследования**

- Сформировать рабочую коллекцию штаммов ВГС, выделенных в РФ на протяжении 2007-2014гг.
- Провести анализ распределения генотипов ВГС на момент проведения исследования и выявить возможные изменения в структуре генотипов вируса.
- Установить распространенность на территории РФ клинически значимых аминокислотных замен R70Q/Н и M91L в белке core ВГС и выявить возможные факторы, влияющие на распространение данных мутаций.
- Определить распространенность и спектр вариантов ВГС, ассоциированных с резистентностью к ингибиторам белка NS5a, среди изолятов, циркулирующих на территории г. Москвы, а также оценить факторы, способные оказывать влияние на их распространение.

#### **Научная новизна**

- В РФ впервые определена частота встречаемости прогностически неблагоприятных мутаций R70Q/Н и L91M в белке core ВГС-1b. Впервые установлено, что почти каждый третий человек (31,2%), инфицированный ВГС-1b в РФ, имеет мутантный вариант вируса по 70 аминокислотной позиции белка core, а значит, обладает повышенным риском развития ГЦК и является носителем потенциально устойчивого к ИНФ штамма вируса.
- Впервые показано, что как минимум некоторые широко распространенные в российской популяции аллели HLA I, такие как A02 и B07, способны связывать пептиды core ВГС-1b, несущие варианты 70R и 91L, но не способны связывать пептиды, содержащие замены R70Q/Н или L91M. Увеличение распространенности мутантных вариантов core ВГС-1b, выявленное в российской популяции, может быть связано с иммунологическим бегством вируса. Разная способность иммунной системы хозяина распознавать мутантные варианты ВГС может объяснять различия в распространенности этих мутаций в разных регионах мира.
- Впервые определена распространенность и спектр полиморфизмов в NS5a ВГС, связанных с лекарственной резистентностью, среди российских штаммов вируса генотипов 1a,1b и 3a.
- Впервые выявлена крайне высокая (57,9%) частота встречаемости RAS M28V NS5a среди ранее нелеченых пациентов Московского региона, инфицированных ВГС-1a. Установлено, что вероятной причиной широкого распространения одних и полного отсутствия других RAS в российских

последовательностях ВГС-1а является «эффект основателя» варианта ВГС-1а, импортированного на территорию РФ из США.

- Впервые показано, что наличие RAS в NS5a приводит к значительным изменениям ковариационного профиля в этом белке ВГС и сопровождается заменами в других аминокислотных позициях, не связанных с лекарственной резистентностью, что свидетельствует об изменениях в белке, направленных на сохранение его функциональности в присутствии RAS.

- Впервые показано, что присутствие RAS в NS5a может приводить к изменениям в предсказанном распознавании CD8 Т-клеточных эпитопов, в том числе к потенциальному иммунологическому бегству.

#### **Теоретическая и практическая значимость**

- В связи с высоким уровнем выявления мутаций R70Q/H core ВГС-1b (31,2%) среди населения РФ, представляется целесообразным введение скрининга пациентов, инфицированных ВГС-1b на наличие данного полиморфизма до начала предполагаемого лечения препаратами ИНФ. При полном переходе на безинтерфероновые схемы лечения, определение данных полиморфизмов позволит выявлять пациентов с повышенным риском развития ГЦК, нуждающихся в безотлагательном начале лечения ППД.

- Полученные данные о распространенности полиморфизмов в NS5a ВГС, связанных с лекарственной устойчивостью, составляют «нулевую точку» в изучении распространенности данных RAS, поскольку получены до внедрения в широкую практику терапии ХГС с применением ППД. Эти данные позволят в дальнейшем оценить, насколько определенные полиморфизмы в NS5a дают преимущество в сохранении и распространении ВГС в условиях широкого применения противовирусной терапии

- Широкая распространенность полиморфизма M28V среди российских последовательностей ВГС-1а указывает на целесообразность тестирования на наличие этого варианта отечественных пациентов, инфицированных ВГС-1а, перед назначением схем терапии, включающих ингибиторы NS5a.

- Умеренная распространенность наиболее клинически значимых RAS среди российских штаммов ВГС генотипов 1b и 3a указывает на отсутствие в настоящее время необходимости тестировать наличие генетических детерминант резистентности перед началом терапии у пациентов, инфицированных этими генотипами

#### **Методология и методы исследования**

Для достижения поставленных задач в работе были использованы общепризнанные вирусологические и молекулярно-биологические методы исследования. В ходе проведения работы строго соблюдались протоколы производителей используемых диагностических систем, наборов, а также оборудования.

Для получения качественных продуктов амплификации, учитывая необходимость прицельного поиска точечных нуклеотидных/ аминокислотных замен, использовались высокоточные ДНК-полимеразы, обеспечивающие отсутствие случайных ошибок в продуктах амплификации.

Анализ полученных ампликонов проводился методом секвенирования по Сенгеру с отсечкой в 15%, что соответствует рекомендациям Европейской Ассоциации по изучению заболеваний печени 2018 года.

При выборе методик проведения анализа в условиях *in silico* были учтены мнения ведущих специалистов в соответствующих областях. Более подробно методы проведения исследования описаны в разделе «Материалы и методы».

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

- Среди инфицированных ВГС-1b лиц, проживающих на территории РФ, частота обнаружения прогностически неблагоприятных мутаций R70Q/H core ВГС составляет 31,2%, что указывает на необходимость введения скрининга пациентов, инфицированных ВГС-1b на наличие данных полиморфизмов.

- Увеличение распространенности мутантных вариантов core ВГС-1b, выявленное в российской популяции, может быть связано с иммунологическим бегством вируса. Разная способность иммунной системы хозяина распознавать мутантные варианты ВГС может объяснять различия в распространенности этих мутаций в разных регионах мира.

- Среди ранее не получавших терапию ППД лиц, инфицированных ВГС-1a и проживающих на территории г. Москвы, частота обнаружения RAS NS5a составляет 57,9%, что указывает на целесообразность тестирования на наличие этого варианта отечественных пациентов, инфицированных ВГС-1a, перед назначением схем терапии, включающих ингибиторы NS5a.

- В то же время, частота выявления отдельных, имеющих наибольшую клиническую значимость RAS NS5a среди изолятов ВГС-1b и ВГС-3a, циркулирующих на территории г. Москвы, составляет не более 5,4%, что не превышает аналогичные показатели, наблюдаемые в других странах.

- Резистентные к ингибиторам NS5a варианты ВГС являются нормальной частью вирусной популяции, для которой характерны скоординированные изменения в белке NS5A, направленные на сохранение его структуры и функции, и, следовательно, фитнеса вируса. Большинство полиморфизмов в NS5A ВГС, связанных с резистентностью, расположены в полиморфных участках, содержащих кластеры Т-клеточных эпитопов. Присутствие этих полиморфизмов в некоторых случаях снижает предсказанное распознавание эпитопов CD8+ Т-клетками, то есть приводит к потенциальному иммунологическому бегству.

### **Степень достоверности и апробация работы.**

Достоверность и обоснованность результатов работы обеспечены использованием современных средств и методов проведения исследований, значительным объемом выполненных молекулярно-биологических исследований, а также применением методов статистического анализа.

Результаты исследований были доложены:

- на научной конференции молодых учёных ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова и ФГБНУ ИПВЭ им. М.П. Чумакова, Москва, 15-16 апреля 2014 г.

- 12 ежегодной международной научной конференции "Viral infections of regional significance", ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, 3-5 октября 2015 г.

- конференции молодых ученых и специалистов «Биология, эпидемиология и вакцинопрофилактика инфекционных заболеваний», ФГБУ «ИПВЭ им. М. П. Чумакова», Москва, 18-19 апреля 2016 г.

- международной научной конференции «Toolkits for DNA vaccine design, an update», ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, 17-20 ноября 2016 г.

- заседании научно-исследовательского центра ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва, 1 февраля, 2017 г.
- VIII конференции молодых ученых РМАНПО с международным участием «Горизонты медицинской науки», ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва, 19-20 апреля 2017 г.
- международной конференции "Vaccines and vaccination", ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, 27 сентября - 1 октября 2017 г.
- Научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний», ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, 17-18 апреля 2018 г.
- X конференции молодых ученых-медиков с международным участием «Трансляционная медицина: возможное и реальное», ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва, 18-19 апреля 2019 г.
- XII всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вирусные гепатиты - достижения и новые перспективы», Москва, 19-20 сентября 2019 г.

#### **Личный вклад автора в получение научных результатов**

Автор на базах ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова», ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова и ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России лично провел отбор сывороток крови, оценку эпиданамнеза пациентов, выделение нуклеиновых кислот и амплификацию фрагментов вирусного генома, выравнивание и анализ нуклеотидных и предсказанных аминокислотных последовательностей, обработку и анализ полученных результатов.

#### **Вклад соавторов**

В главе 2.3.1. использованы аминокислотные последовательности core ВГС, полученные коллективом соавторов в 2008-2011 гг.: Соболевой Н.В., Дмитриевым П.Н., Исаевой О.В., Кюрегяном К.К. (ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова», Москва, РФ). Филогенетический анализ, представленный в главах 2.2, 2.3.2, 2.4.2, проводился совместно с Карлсен А.А. (ФГБОУ ДПО РМАНПО, г. Москва, РФ). Ковариационный анализ, представленный в главе 2.4.4, был выполнен совместно с Dr. Stefan Petkov (Каролинский институт, Стокгольм, Швеция). Анализ Т-клеточных эпитопов, представленный в главе 2.4.5, проводился совместно с Dr. Morten Nielsen (Технический университет Дании, Конгенс Люнбю, Дания).

## Основное содержание работы

### Материалы и методы исследования

Исследование проводилось в несколько этапов на базах ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова», ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» и ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

Общее количество задействованных в исследовании пациентов составило 467. 190 образцов сывороток крови были получены в 2008, 2009, 2011 гг. из Гепатологического центра Инфекционной больницы №1 г. Москвы от пациентов с клинически подтвержденным хроническим гепатитом С и использованы для проведения ретроспективного анализа. Все образцы сывороток крови хранились в криопробирках при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  до момента проведения текущего исследования в 2017 году. В 2014 году были собраны сыворотки крови от 277 позитивных по анти-ВГС пациентов токсикореанимационного отделения НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. От всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследованиях. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ФГБНУ ИПВЭ им. М.П. Чумакова (заключение Этического комитета № 10 от 23 мая 2016 г.).

Определение вирусной РНК во всех исследуемых образцах проводили методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров к наиболее консервативному участку вирусного генома - 5'-нетранслируемой области (5'-НТО).

На некоторых этапах проведения работы наблюдается уменьшение количества исследуемого материала. В целом это связано с техническими причинами, такими как недостаточное количество сыворотки, исключение редких генотипов из последующих этапов анализа (4d, 2k/1b), неудовлетворительный уровень качества полученных ампликонов или неудача амплификации интересующего фрагмента.

### Генотипирование ВГС

1 этап исследования был посвящен определению структуры генотипов ВГС циркулирующих в Московском регионе на момент проведения исследования (2014 г.) среди двух контингентов пациентов: потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) и лиц с неустановленным путем инфицирования ВГС (Не ПИН).

Генотипирование ВГС проводили с помощью анализа нуклеотидных последовательностей белка core методом прямого секвенирования по Сенгеру. Впоследствии для образцов, относящихся к генотипу 2k, также проводилась амплификация участка генома, кодирующего фрагмент полимеразы вируса (NS5b) для исключения/подтверждения наличия рекомбинантной формы ВГС RF-2k/1b.

На основании полученных нуклеотидных последовательностей core было построено филогенетическое дерево с помощью программного обеспечения PhyML 3.0. методом максимального правдоподобия (maximum likelihood). Для визуализации использовались программы Fig Tree v.1.4.2. и Corel DRAW X7.



### **Анализ клинически значимых aa замен в белке core ВГС**

На втором этапе исследования была проведена оценка распространенности aa мутаций R70H/Q и L91M в белке core ВГС-1b по сравнению с изолятами циркулирующими в других регионах мира, а также изучение влияния данных замен на распознавание ВГС иммунной системой хозяина (Т-клеточными эпитопами, HLA I, HLA II).

Для анализа были использованы предсказанные aa последовательности core ВГС-1b, полученные на этапе проведения генотипирования (n=64), а также aa последовательности (n=76), полученные коллективом соавторов. Кроме того, в работу были включены последовательности core отечественных изолятов ВГС-1b из GenBank, для которых были известны регион и год выделения (n=49). В общей сложности было проанализировано 189 aa последовательностей core ВГС-1b. В качестве групп сравнения были использованы последовательности из Лос-Аламосской базы данных США (LANL, <https://hcv.lanl.gov/content/index>) полученные в Азии (n=224), США (n=218) и Европе (n=316).

Выравнивание исследуемых нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программного обеспечения MEGA7 по референсному штамму H77 субтипа 1a ВГС (GenBank AF011753).

Для 117 нуклеотидных последовательностей белка core отечественных изолятов ВГС-1b был проведен филогенетический анализ с временной шкалой при помощи пакета программ BEAST v1.8.2.

При изучении влияния замен R70H/Q и L91M в core ВГС-1b на распознавание ВГС иммунной системой хозяина в условиях *in silico* были использованы следующие онлайн-ресурсы:

- База данных EIDB (<http://www.iedb.org>, для поиска Т-клеточных эпитопов в белке core ВГС);
- Программное обеспечение EPITOPE VACCINE OPTIMIZATION SERVER (<http://bio.med.ucm.es/episopt.html>, для предсказания возможных аллелей HLA I способных связывать и презентировать регионы core, включающие в себя 70 или 91 aa позицию содержащие/не содержащие исследуемые замены);
- Программа NetMHCIIpan 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan-3.1>, для оценки возможности связывания исследуемых aa участков core молекулами класса HLA II).

Для проведения анализа *in silico* з отечественных aa последовательностей были взяты фрагменты варьирующей длины (согласно требованиям программного обеспечения от 17 до 49 aa остатков) включающие в себя исследуемые aa позиции 70 и 91.

### **Анализ RAS NS5a**

Распространенность RAS NS5a среди пациентов, ранее не получавших терапию ингибиторами NS5a (n=322, материал 2008, 2009, 2011 и 2014 гг.), оценивалась с помощью анализа амплифицированных участков генома NS5a ВГС субтипов 1a, 1b и 3a методом секвенирования по Сенгеру. Перечень клинически значимых RAS был сформирован на основании последних рекомендаций EASL 2018 гг.

Для всех выявленных вариантов RAS был рассчитан генетический барьер развития лекарственной резистентности.

На основании полученных нуклеотидных последовательностей NS5a было построено 3 филогенетических дерева отдельно для каждого исследуемого субтипа (1a, 1b, 3a).

Чтобы определить связаны ли наблюдаемые RAS с появлением специфических замен в других aa позициях белка NS5a, был проведен ковариационный анализ с использованием алгоритма Fastcov. Для визуализации результатов использовался пакет программ Rigraph.

В условиях *in silico* было выполнено предсказание вероятности присутствия Т-клеточных эпитопов CD8 и CD4 для последовательностей дикого типа и содержащих RAS, с использованием серверов NetMHCpan-4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/>) и NetMHCIIpan-3.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan-3.1>). Для каждой группы образцов, различающейся по субтипу вируса, были рассчитаны профили эпитопов последовательностей дикого типа и содержащих RAS. Для каждой аминокислотной позиции был рассчитан предсказанный показатель связывания Т-эпитопа с молекулами HLA. Максимальное значение связывания приравнивалось к единице. На следующем этапе была рассчитана разница величин связывания Т-эпитопов в последовательностях дикого типа и содержащих RAS.

Для получения экспериментальных подтверждений повышенной иммуногенности содержащего RAS участка NS5A между aa 24-93, был проведен поиск эпитопов в исследуемой области по базе данных IEDB (<http://www.iedb.org>).

**Статистическая обработка** полученных результатов проводилась с использованием Graphpad.com. Значимость результатов оценивалась с помощью F-критерия Фишера, при значении  $p < 0,05$  различия считались статистически достоверными.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

**Генотипирование.** Учитывая большое генетическое разнообразие ВГС, перед началом изучения генотип-специфичных полиморфизмов в вирусном геноме необходимым этапом исследования являлось определение структуры генотипов вируса в регионе исследования.

Как известно, среди когорты ПИН, ВГС циркулирует гораздо интенсивнее, чем в остальных группах населения, поэтому внедрение и распространение новых для конкретной территории субтипов вируса, зачастую происходит именно в данной группе риска [Nelson P. K., 2011]. Однако, полученные результаты продемонстрировали, что структура генотипов ВГС среди двух исследуемых групп на территории г. Москвы, остается стабильной с момента проведения предыдущего мониторинга в 2007-2011 гг. выполненного коллективом соавторов. [Кюрегян К.К., 2013]. Субтипы 3a и 1b по-прежнему являются доминантными, в то время как 1a и 2k/1b - минорными субтипами ВГС. Статистически достоверных отличий между двумя исследуемыми группами выявлено не было (рисунок 1).

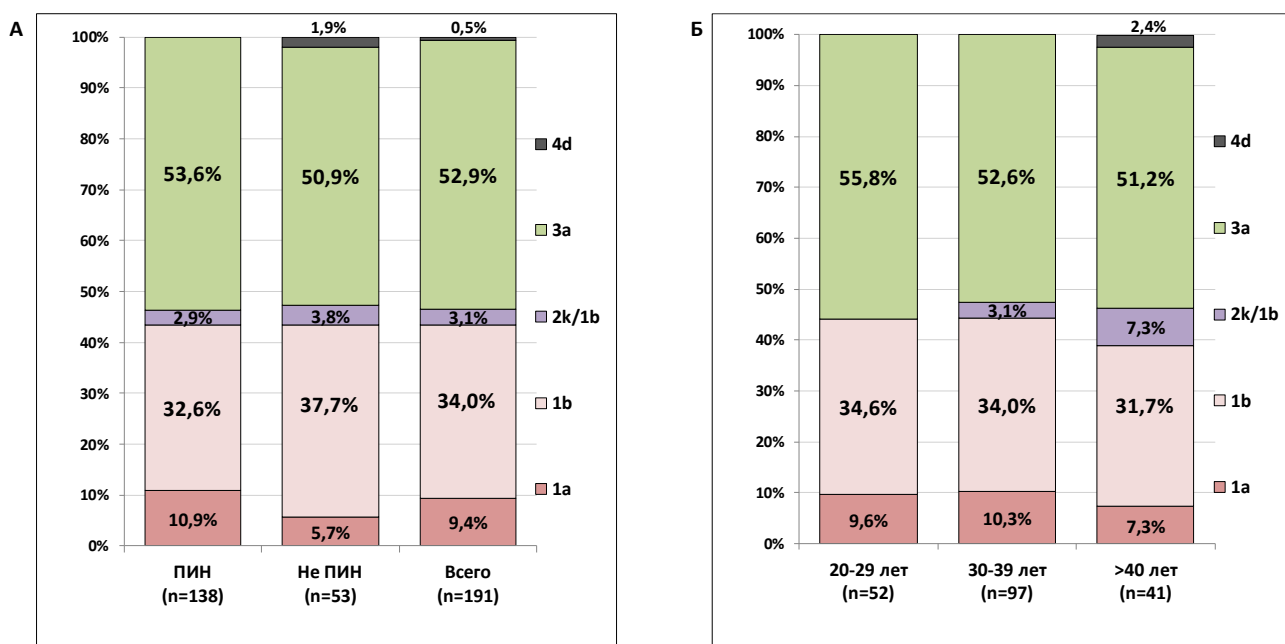


Рисунок 1 – Частота выявления субтипов ВГС среди пациентов ПИН и Не ПИН (А) и различных возрастных групп (Б)

**Анализ клинически значимых aa замен в белке core ВГС.** Среди изолятов ВГС-1b, циркулирующих на территории РФ, aa замена R70Q была выявлена в 27,0% (51/189) последовательностей, что достоверно чаще, чем в последовательностях из Европы (17,7% (56/316),  $p = 0,0179$ ) и реже, чем в последовательностях из США (59,6% (130/218),  $p < 0,0001$ ). Распространенность второй замены в этой же позиции, R70H, оказалась выше в РФ, чем в Европе (4,7% (8/189) и 0,3% (1/316) соответственно,  $p = 0,0021$ ). Aa замена L91M встречалась в 80,4% (152/189) российских последовательностей ВГС-1b, что достоверно чаще, чем в Азии (43,8% (98/224),  $p < 0,0001$ ). Остальные показатели распространенности исследуемых мутаций в РФ и в сравниваемых географических регионах статистически не различались (Табл. 1).

Таблица 1 – Сравнительная частота встречаемости полиморфизмов R70Q/H и L91M в последовательностях coreВГС-1b выделенных на территории РФ и в других регионах мира

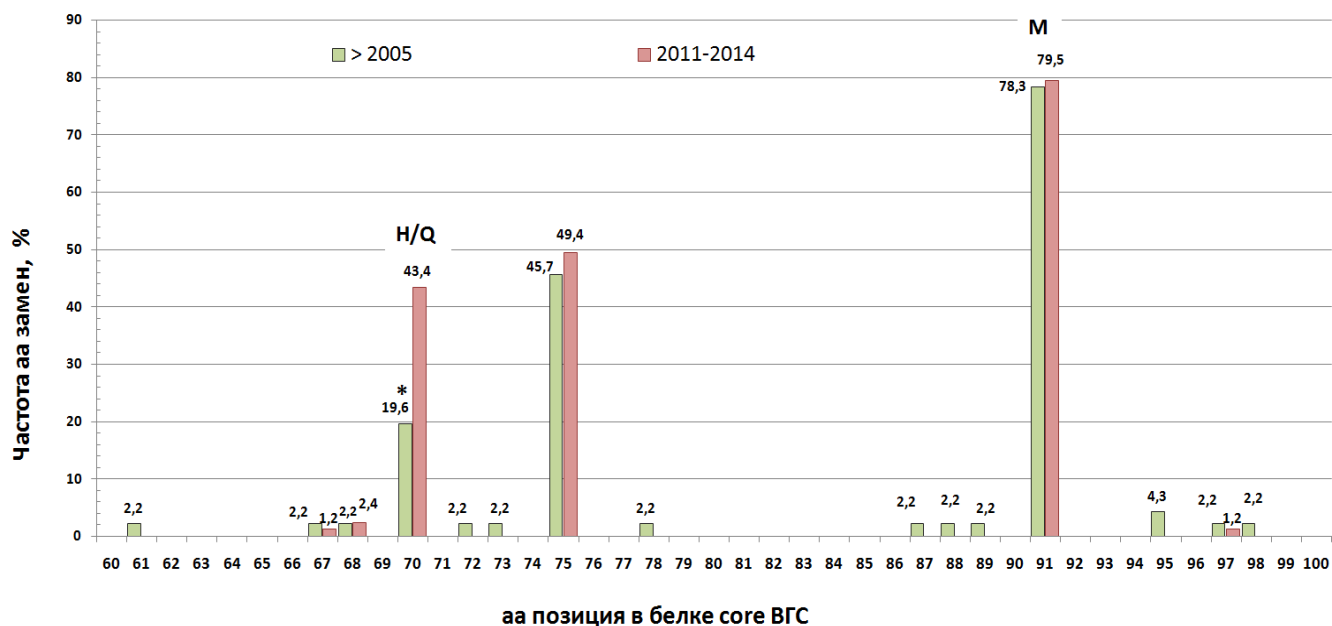
AA замена	Частота встречаемости				
	Россия	Европа	Азия	США	Всего
n образцов	n=189	n=316	n=224	n=218	n=947
R70Q	27,0	17,7	31,3	59,6	32,4
R70H	4,2	0,3	2,7	3,2	2,3
L91M	80,4	85,8	43,8	86,2	74,9
R70Q/H+L91M	27,5	15,5	16,1	54,6	27,0
Дикий тип	15,9	11,7	38,4	5,5	17,4

Замена L91M оказалась доминирующим вариантом среди отечественных изолятов ВГС (>80%). Однако, в отличие от мутации Q/H70R, клиническая значимость которых была неоднократно доказана, данные о замене L91M, носят весьма противоречивый характер: большая часть исследований указывает на отсутствие связи с резистентностью и влиянием на развитие ГЦК. [El-Shamy A., 2014]. Лекарственная резистентность для мутации L91M, описана в японских, а также в иранских исследованиях [Akuta N., 2005, Mori N., 2009, Bakharai-Salim F., 2016]. Неоднозначность результатов исследований, проведенных в различных странах, может являться косвенным подтверждением влияния индивидуальных особенностей иммунной системы организма-носителя, которые зачастую варьируются в различных этнических группах.

Филогенетический анализ отечественных изолятов ВГС-1b показал, что анализируемые последовательности core не участвуют в формировании монофилетических кластеров, в зависимости от аминокислоты в 70 и/или 91 позиции, а также получены спустя длительное время непрерывной циркуляции вируса на территории РФ. Подобная картина распределения изолятов, подчеркивает адекватность выборки задействованных образцов, а также указывает на то, что мутации R70Q/H и L91M появлялись неоднократно и не связаны с заносами из других стран.

В 2010 группа исследователей провела анализ частоты встречаемости полиморфизмов в 70 и 91 aa позиции core ВГС-1b среди aa последовательностей, имеющих на тот момент в базе данных LANL, вне зависимости от места сбора материала [Alestig E., 2011]. Аналогичный анализ 898 последовательностей core ВГС-1b, имеющих в базе данных LANL в 2016 году, был проведен в рамках данной работы. При сравнении результатов оказалось, что среди последовательностей, полученных до 2010 года, частота выявления R70Q/H была значительно выше, чем в 2016 (60% и 4% против 32,9% и 1,7% соответственно;  $p < 0,01$ ), тогда как полиморфизм L91M, в 2010 и в 2016 гг. выявлялся с одинаковой частотой (71% и 69% соответственно;  $p > 0,05$ ).

Примечательно, что в анализируемых отечественных образцах ВГС-1b было зафиксировано достоверное увеличение частоты выявления R70Q/H с течением времени: в период с 2005 по 2014 гг. с 19,6% до 43,4% ( $p = 0,0133$ ) (Рис. 2). По-видимому, это указывает на положительную селекцию данного варианта вируса среди популяции российского населения, в отличие от других географических регионов.



*Звездочкой отмечено достоверное увеличение частоты встречаемости замен R70Q/H в период до 2005г и 2011-2014гг ( $p = 0,0133$ ).*

Рисунок 2 – Частота встречаемости аа замен на участке с 60 по 100 аа позицию белка core ВГС, относительно консенсусной последовательности отечественных изолятов ВГС-1b среди образцов, собранных до 2005г., и в 2011-2014 гг.

Анализ базы данных EIDB (<http://www.iedb.org>) продемонстрировал, что 70 и 91 аа позиции приходится на кластер Т-клеточных эпитопов, следовательно, мутации в них могут оказывать влияние на иммунное распознавание вируса при интерферонотерапии.

Также было установлено, что наличие данных мутаций способно приводить к невозможности распознавания фрагмента генома core ВГС-1b некоторыми молекулами HLA I (A0202, A0205, A3101, B0702, B2705), но не HLA II. Стоит отметить, что некоторые другие предсказанные аллели молекул HLA I (B2701, B2703, B2704, B5102, B5401, B5502) оказались способны связывать фрагменты белка core ВГС-1b несущие в себе мутации, но не дикий тип аа в исследуемых аа позициях. Учитывая, что присутствие тех или иных аллелей крайне рознится в различных этнических группах, можно предположить, что в РФ процесс накопления штаммов, несущих замены R70Q/H со временем, ассоциирован с высокой распространенностью вариантов аллелей HLA I, для которых данные мутации имеют непосредственное значение. Подобные HLA аллель-специфичные вирусные мутации описаны для ВИЧ-1 [Ragonnet-Cronin M., 2012].

На момент проведения исследования, в доступных источниках отсутствовали данные о распространенности аллелей генов HLA I на высоком уровне разрешения среди популяции населения г. Москвы (как и среди других регионов РФ). В связи с этим, данные о частоте встречаемости предсказанных аллелей HLA I были взяты из исследования с наиболее репрезентативной выборкой ( $n=2000$ , г. Москва, 2015 г.), но с результатами типирования на низком уровне разрешения, представленные в базе данных Allele Frequency Net Database [Lebedeva L., 2015, González-Galarza F., 2015]. Предсказанные молекулы

HLAI, способные распознавать фрагменты с диким, но не с мутантным типом aa в анализируемых позициях - A0202, A0205 и B0702, относятся к группам аллелей A02 и B07 встречающихся довольно часто (в 50% и 20,7%, соответственно) среди населения московского региона. К сожалению, ограниченность данных о распространенности HLA1 не позволяет сделать однозначных выводов, однако, полученные данные указывают на имеющийся потенциал дальнейших исследований в данном направлении.

Таким образом, проведенный анализ *in silico* показал, что частота встречаемости замен R70Q/H и L91M может быть ассоциирована с позитивной селекцией под действием давления иммунного ответа и зависеть от этнических особенностей организма носителя.

**RAS NS5a ВГС.** В общей сложности, доля штаммов, несущих в белке NS5a те или иные RAS, составила 35,1% (71/202). Всего содержали RAS 57,9% (11/19) последовательностей субтипа 1a, 22,6% (21/93) – субтипа 1b, и 43,3% (39/90) – субтипа 3a. (Табл. 2).

Таблица 2 – Частота выявления RAS NS5a среди отечественных изолятов ВГС, полученных от пациентов, ранее не получавших терапиюППД

Генотип ВГС (кол-во последовательностей)	Распространенность RAS NS5a *			
	RAS	n	%	ППД
1a (19)	<b>M28V</b>	11	57.9%	<b>ОМБ, ЛЕД, ВЕЛ</b>
1b (93)	L28M	1	1.1%	ЭЛБ
	R30Q	7	7.5%	ДАК, ОМБ, ЭЛБ
	<b>L31M</b>	5	5.4%	<b>ДАК, ЛЕД, ЭЛБ, ОМБ, ВЕЛ</b>
	P58S	4	4.4%	ДАК, ОМБ
	P58T	1	1.1%	ВЕЛ
	A92T	1	1.1%	ЛЕД, ОМБ
	<b>Y93H</b>	5	5.4%	<b>ДАК, ЛЕД, ЭЛБ, ОМБ, ВЕЛ</b>
3a (90)	<b>A30K</b>	5	5.7%	<b>ПИБ, ДАК, ВЕЛ</b>
	A30S	26	31.0%	ДАК, ВЕЛ
	S62L	8	8.9%	ДАК
	<b>Y93H</b>	2	2.2%	<b>ПИБ, ДАК, ВЕЛ</b>

Среди доминантных субтипов 1b и 3a наиболее значимые полиморфизмы в NS5a, расположенные в aa позициях 30, 31 и 93, встречались относительно редко - доля каждого из этих составила не более 5,7%, что не превышает аналогичные показатели в Северной Америке, Европе и Китае [Zeuzem, S., 2017, Li Z., 2017, Hernandez D., 2013].

Однако была выявлена крайне широкая распространенность RAS M28V ВГС-1a (57,9%), связанная с умеренной или высокой устойчивостью ВГС-1a к омбитасвиру, ледипасвиру и велпатасвиру в зависимости от препарата, при полном отсутствии других вариантов RAS в данном субтипе. Филогенетический анализ образцов ВГС-1апоказал, что за исключением двух последовательностей, все проанализированные российские штаммы ВГС-1а формируют единый монофилетический кластер, наиболее близкий к последовательностям, выделенным на территории США. Таким образом, причиной широкого

распространения одних и полного отсутствия других RAS в NS5a в отечественных последовательностях ВГС-1a является эффект основателя т.е. несущий эти замены штамм, будучи импортированным в РФ, послужил предком для большинства российских штаммов этого субтипа (Рис. 3).

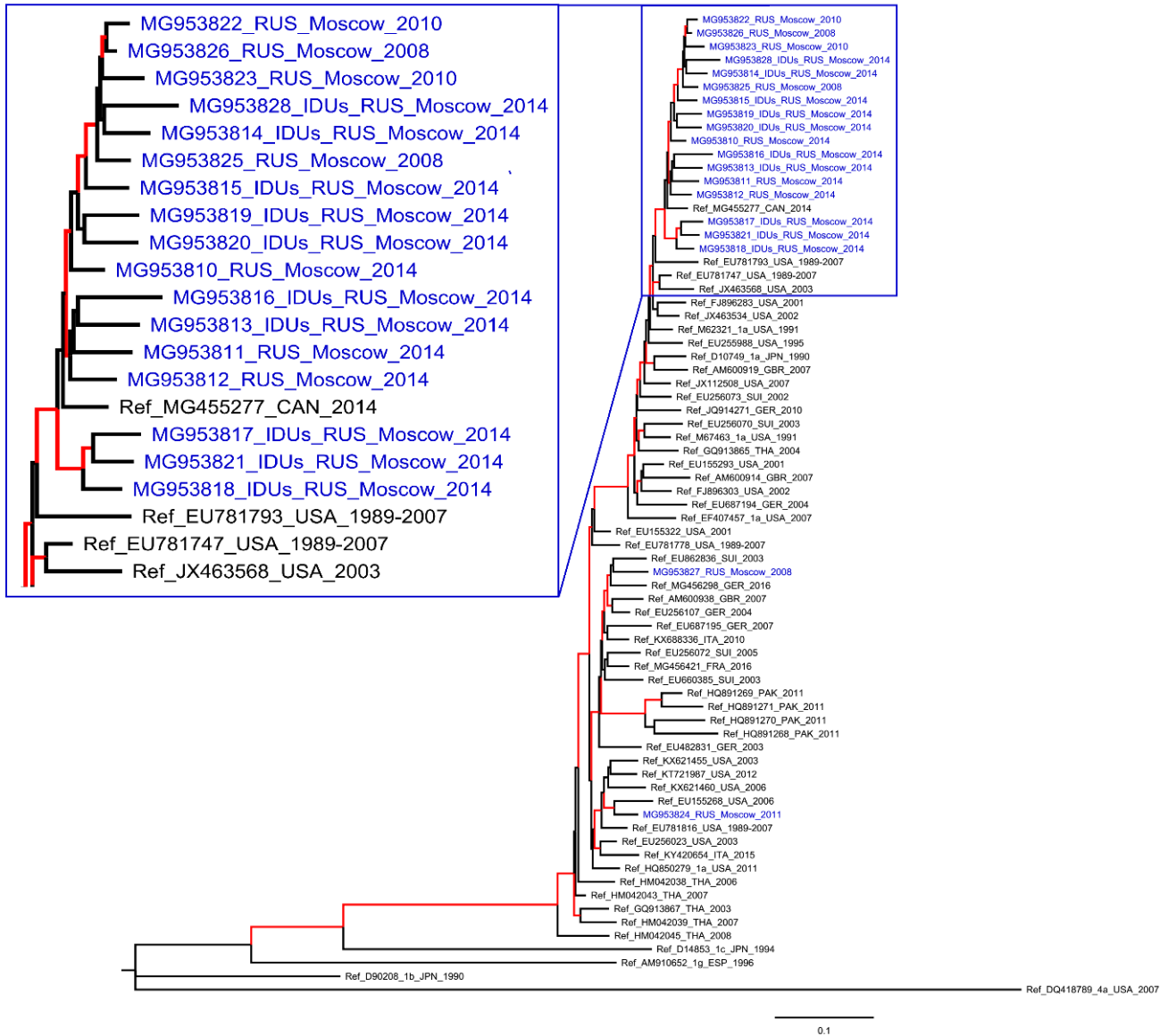


Рисунок 3 – Филогенетическое дерево построенное на основе последовательностей NS5a ВГС. Ветви с достоверностью >90% выделены красным; Последовательности, полученные в данном исследовании выделены синим

Филогенетический анализ последовательностей ВГС-1b показал равномерное распределение отечественных изолятов по дереву вне зависимости от группы риска, времени сбора материала или наличия RAS (данные не показаны). В то время как геноизоляты ВГС-3a образовали на дереве несколько кластеров, в одном из которых все последовательности содержали RAS A30S. Все 22 геноизолята вируса, вошедшие в кластер, были получены в различные временные интервалы (2009, 2010 и 2014 гг.), но являлись, судя по группированию на дереве, близкородственными вариантами. (Рис.4).

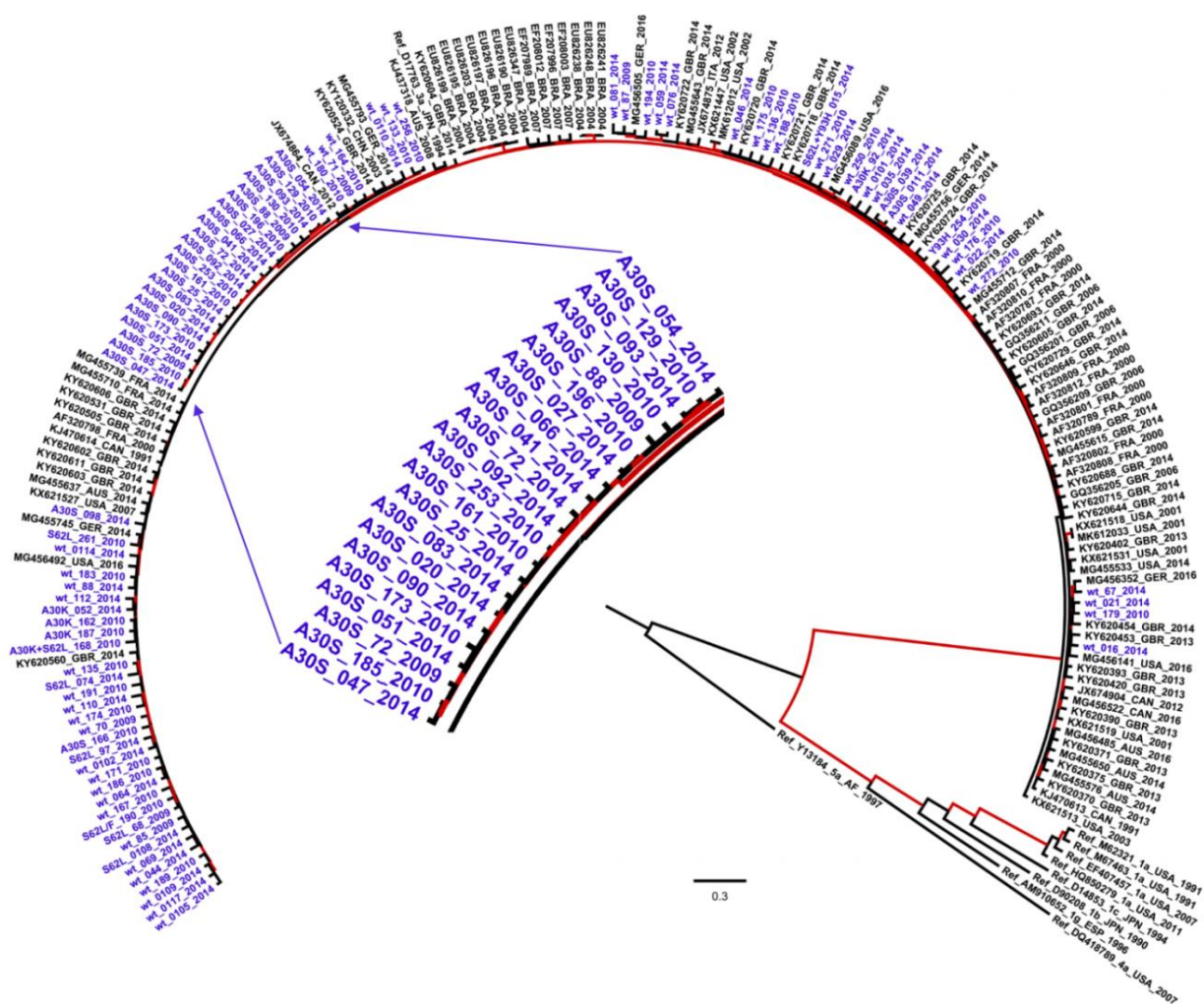


Рисунок 4 – Филогенетическое дерево построенное на основе последовательностей NS5a ВГС-3а. Ветви с достоверностью >90% выделены красным; Последовательности, полученные в данном исследовании выделены синим

Учитывая, что 9 из 22 носителей данных штаммов имели инъекционную наркоманию в анамнезе, вполне вероятно, что именно этот путь передачи мог послужить основной причиной быстрого и широкого распространения RAS A30S ВГС-3а (31,0%) в российской популяции. Стоит отметить, что, несмотря на упоминание RAS A30S в рекомендациях EASL 2018 и ряде небольших клинических исследований, клиническая значимость данной мутации не до конца ясна

Учитывая, что ВГС-1а довольно редко встречается на территории РФ, а RAS A30S ВГС-3а до настоящего времени не продемонстрировала серьезной клинической значимости при лечении ХГС, нет причин ожидать, что широкая частота встречаемости RAS M28V (57,9%) и A30S (31,0%) сможет стать преградой на пути успешного применения ингибиторов NS5a. С другой стороны, дальнейший мониторинг распространенности данных мутаций необходим для выяснения, способны ли они дать преимущество ВГС на фоне широкого применения ингибиторов NS5a. Стоит отметить, что все анализируемые последовательности NS5a ВГС, были выделены в мегаполисе с большим числом приезжего населения, поэтому могут вполне достоверно отражать генетическое разнообразие вируса в стране в целом. Так, исследование генетического разнообразия ВГС в нескольких крупных городах Китая продемонстрировало,



что такие мегаполисы могут являться местом концентрации разных генотипов и штаммов ВГС циркулирующих на территории всей страны [Qi, Y., 2016].

Согласно имеющимся литературным данным, RAS NS5a не задействованы в ковариационных связях с другими aa позициями в белках ВГС, за исключением R30Q ВГС-1b [Li Z., 2017]. В текущем исследовании было установлено, что некоторые aa позиции, содержащие RAS, входят в несколько ковариационных сетей внутри белка NS5a. При этом наличие вариантов RAS - R30Q ВГС-1b, а также A30S и S62L ВГС-3a приводит к кардинальному изменению ковариационного профиля в участках белка NS5a, не связанных с лекарственной резистентностью. (Рис. 5).

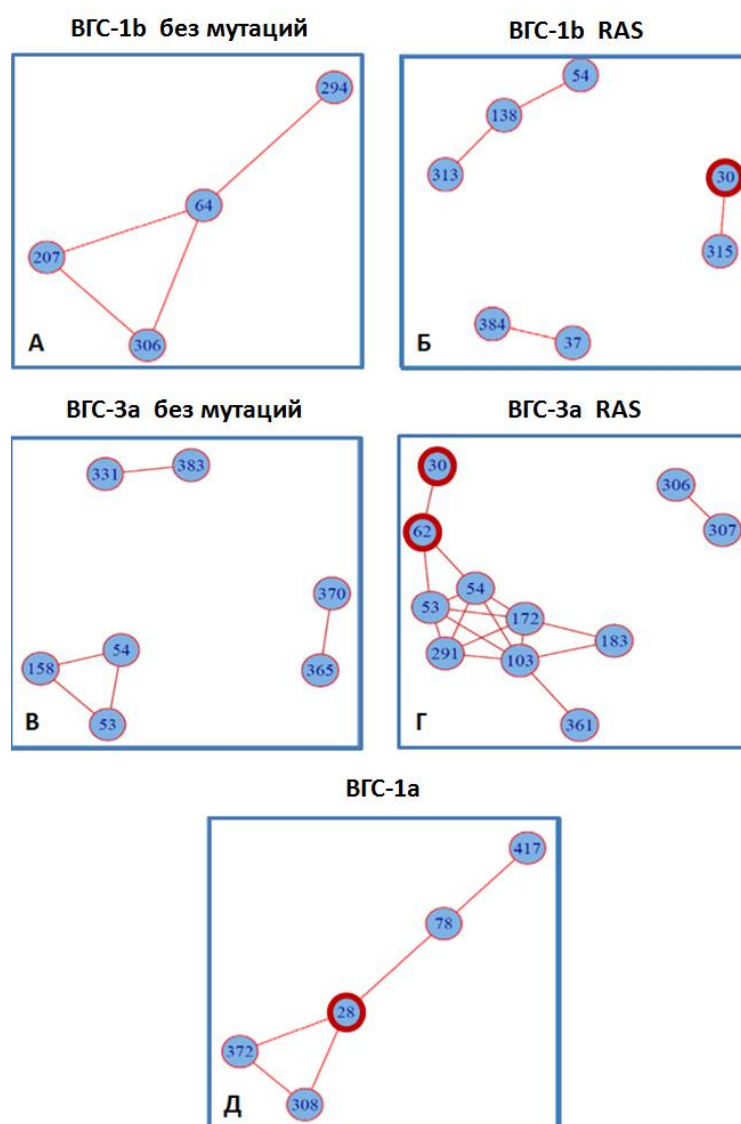


Рисунок 5 – Визуализация ковариационных сетей, выявленных среди aa последовательностей белка NS5a ВГС отечественных изолятов. Красными кругами обозначены клинически значимые RAS

Количество геноизолятов ВГС-1a (n=19) оказалось недостаточным для отдельного проведения ковариационного анализа образцов содержащих RAS и дикого типа. На рисунке 5Д показана ковариационная сеть для всех исследуемых последовательностей ВГС-1a вместе взятых. При их суммарном анализе было обнаружено, что 28 aa позиция, ассоциированная с лекарственной

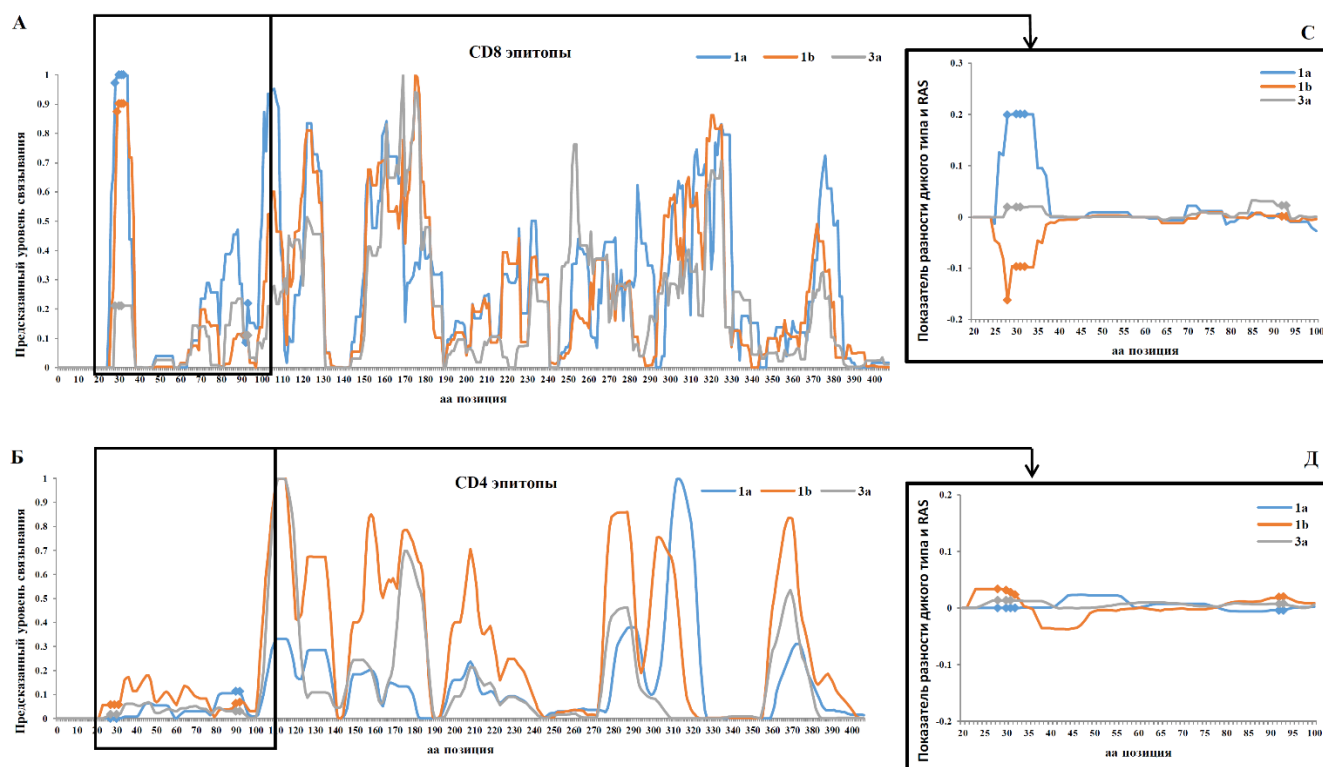
резистентностью, входит в состав ковариационного профиля белка NS5a и образует сразу три аминокислотные пары (28-78, 28-308, 28-372).

Таким образом, ковариационный анализ показал, что появление некоторых вариантов RAS приводит к заменам в позициях, не связанных с лекарственной резистентностью. По-видимому, эти согласованные изменения необходимы для сохранения структуры и функционирования белка в присутствии RAS, и, следовательно, способны обеспечивать фитнес вируса.

Расчет генетического барьера показал, что хоть большее количество выявленных RAS и происходит за счет более благоприятных («легких») транзиций, некоторые RAS (такие как L28M, L31M, P58T в HCV 1b и A30K или A30S в последовательностях HCV 3a) являются следствием менее благоприятных трансверсий (или даже их комбинаций) с генетическим барьером, достигающим 5-6 баллов (A30K и A30S). По-видимому, возникновение данных замен лежит за пределами биохимического преимущества и связано (как и в случае с M28V ВГС-1a) с их наличием или отсутствием в предковых штаммах ВГС, что подтверждает филогенетический анализ образцов ВГС-3a.

Как известно, одной из основных движущих сил эволюции (соответственно и силой, определяющей возникновение и закрепление aa замен) вируса является процесс его адаптации к организму-хозяину. Анализ Т-клеточных эпитопов в белке NS5a ВГС показал, что участок белка между 24 и 93 aa позицией, содержащий большинство известных RAS NS5a, также содержит кластер из CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеточных эпитопов. Анализ опубликованных данных в базе данных IEDB подтвердил, что участок между aa позициями 28-32 белка NS5A содержит кластер CD8<sup>+</sup> эпитопов. Несколько CD8<sup>+</sup> Т-клеточных эпитопов также присутствуют в содержащих RAS участках в aa 58-64 и 92-93, что подтверждает достоверность предсказаний *in silico* в текущем исследовании.

В последовательностях ВГС-1a присутствие RAS в участке с 28 по 32 аминокислоту приводило к снижению показателя иммуногенности эпитопов CD8 (но не CD4). Аналогичная картина, однако с меньшей выраженностью, наблюдалась в последовательностях ВГС-3a (CD8 и CD4). Напротив, появление RAS в участке 28-32 последовательностей субтипа 1b, продемонстрировало повышение предсказанного показателя иммуногенности эпитопов CD8, но понижение для CD4. В целом эпитопы для клеток CD4 обладали наименее выраженным уровнем иммуногенности (рис. 6).



*Позиции RAS выделены на кривых ромбами. Предсказание выполнено с помощью NetMHCpan-4.0 и NetMHCIIpan-3.2 для набора наиболее распространенных в мире аллелей HLA-A, HLA-B, HLA-C и HLA-DR, а также 5 HLA-DP и 6 HLA-DQ молекул*

Рисунок 6 – Эпитопные профили NS5A дикого типа ВГС генотипов 1a, 1b и 3a, предсказывающие локализацию CD8 Т-клеточных эпитопов (А) и CD4 Т-клеточных эпитопов в российских наборах последовательностей; Различия между показателями связывания эпитопов ВГС генотипов 1a, 1b и 3a при наличии и отсутствии RAS в участке между aa 20 и 100 для CD8 Т-клеточных эпитопов (С) и CD4 (Д).

Таким образом, было установлено, присутствие некоторых вариантов RAS снижает предсказанное распознавание Т-клеточных эпитопов клетками CD8, т.е. приводит к потенциальному иммунологическому бегству, вероятно, способному обеспечивать некоторое преимущество мутантным формам вируса. Полученные данные способны объяснить широкую распространенность некоторых RAS в белке NS5a ВГС и низкий барьер их появления в популяции не получавших терапию пациентов. Влияние мутаций в иммунодоминантных эпитопах на способность персистенции ВГС подтверждается и другими литературными данными, в том числе и за счет нарушения распознавания эпитопов клетками CD8 [Лобзин Ю.В. 2014, Ikram A., 2017, Klade C.S., 2009].

До недавнего времени, RAS оказывали значительное влияние на эффективность режима противовирусной терапии, а также выбор тактики лечения [EASL 2016, Sarrazin C., 2016]. Однако появление пангенотипических схем лечения с высоким барьером резистентности и уровнем противовирусной активности, возможно полностью исключат проблему существования RAS в скором времени. Тем не менее, до тех пор, пока новые ППД не станут широкодоступными во всех странах,

проведение тестирования на наличие RAS может являться одним из ключевых методов персонализации лечения ХГС. Индивидуальный подход к подбору противовирусной терапии во многом обусловлен экономической целесообразностью: так, по имеющимся литературным данным, стоимость курса лечения одного пациента в РФ при назначении современной безинтерфероновой схемы, составляет порядка 634,2-1428,7 тысяч рублей [Эсауленко Е.В. 2017, Нечаева О.Б. 2019].

В настоящее время, мировой опыт применения ППД для лечения ХГС пока измеряется несколькими годами и не столь велик, чтобы пренебрегать таким важным фактором, как генетическая изменчивость вируса. Не исключено, что по мере увеличения охвата терапией может произойти накопление в популяции резистентных штаммов ВГС, что в свою очередь приведет к необходимости развития системы диагностики резистентности.

Полученные в исследовании данные о частоте встречаемости RAS NS5a ВГС, составили «нулевую точку» в изучении распространенности первичной резистентности ВГС, поскольку получены до внедрения в широкую практику терапии ХГС ингибиторов NS5a. Следующим очевидным шагом будет являться определение распространенности данных мутаций через несколько лет после широкого применения данных препаратов. Эти исследования позволят оценить, насколько определенные замены в NS5a дают преимущество ВГС в сохранении и распространении вируса в условиях более широкого внедрения противовирусной терапии.

## **Заключение**

### **Выводы**

1. Впервые установлено, что 31,2% лиц, инфицированных ВГС-1b в РФ, имеют мутантный вариант вируса, несущий замену R70Q/H в белке core, а значит, обладают повышенным риском развития гепатоцеллюлярной карциномы и являются носителями потенциально устойчивого к ИФН штамма вируса. Выявленное достоверное увеличение с 2005 по 2014гг. доли мутантных штаммов, несущих замену R70Q/H, свидетельствует о накоплении данного варианта вируса в российской популяции вследствие положительного отбора.

2. Впервые продемонстрировано *in silico*, что такие широко распространенные в российской популяции аллели HLA I, как A02 и B07, способные связывать эпитопы core ВГС-1b дикого типа, не связывают пептиды, содержащие замены R70Q/H или L91M.

3. Частота выявления наиболее клинически значимых RAS NS5a среди ранее нелеченых пациентов, инфицированных широко распространенными в РФ субтипами ВГС 1b и 3a, составила не более 5,4%, что не превышает аналогичные показатели, наблюдаемые в других странах. Выявлена крайне высокая частота встречаемости RAS M28V (57,9%) среди геноизолятов ВГС-1a, а также RAS A30S среди геноизолятов ВГС-3a (31,0%). Филогенетический анализ показал, что возможной причиной широкого распространения данных RAS в NS5a является «эффект основателя».

4. Присутствие RAS в NS5a ВГС субтипов 1b и 3a приводит к полному изменению ковариационного профиля в данной белке. Кроме того, наличие вариантов RAS M28V, Q30R и S30R (ВГС субтипов 1a, 1b

и 3а, соответственно), приводит к согласованным заменам в других аминокислотных позициях, не связанных с лекарственной резистентностью.

5. Присутствие RAS в NS5a снижает предсказанное в условиях *in silico* распознавание CD8+ Т-клеточных эпитопов ВГС субтипов 1а и 3а.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы и рекомендации**

В связи с широкой распространенностью (31,2%) мутаций R70Q/H в белке core ВГС-1b среди населения РФ, представляется целесообразным введение скрининга пациентов, инфицированных этим субтипом вируса, на наличие данного полиморфизма до начала предполагаемого лечения препаратами ИНФ. При полном переходе на безинтерфероновые схемы лечения, определение данных полиморфизмов позволит выявлять пациентов с повышенным риском развития ГЦК, нуждающихся в безотлагательном начале лечения.

Широкая распространенность полиморфизма M28V в белке NS5a среди российских последователей ВГС-1a указывает на целесообразность тестирования на наличие этого варианта отечественных пациентов, инфицированных ВГС-1a, перед назначением схем терапии, включающих ингибиторы NS5a. Умеренная распространенность наиболее клинически значимых RAS среди российских штаммов ВГС генотипов 1b и 3а указывает на отсутствие в настоящее время необходимости тестировать наличие генетических детерминант резистентности перед началом терапии у пациентов, инфицированных этими генотипами. Полученные в исследовании данные о частоте встречаемости RAS NS5a ВГС, составили «нулевую точку» в изучении распространенности первичной резистентности ВГС, поскольку получены до внедрения в широкую практику терапии ХГС ингибиторов NS5a. Следующим очевидным шагом будет являться определение распространенности данных мутаций через несколько лет после широкого применения данных препаратов. Эти исследования позволят оценить, насколько определенные замены в NS5a дают преимущество ВГС в сохранении и распространении вируса в условиях более широкого внедрения противовирусной терапии.

### **Список опубликованных работ по теме диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК:**

1. Исаева, О.В. Многолетняя динамика распространения генотипов вируса гепатита С в Московском регионе. / О.В. Исаева, В.С. Кичатова, А.А. Карлсен, С.А. Солонин, П.Н. Дмитриев, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – №. 4. – С: 35-42.
2. Кичатова В.С., Карлсен А.А., Исаева О.В., Солонин С.А., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Лекарственно-резистентные варианты ВГС субтипа 1b, циркулирующие на территории Российской Федерации: анализ аминокислотных мутаций в белках NS5a и core. //Журнал инфектологии. – 2018. – Т. 10. – №. 4. – С. 30-36.
3. Кичатова В.С., Кюрегян К.К. Современный взгляд на резистентность к препаратам прямого противовирусного действия при лечении вирусного гепатита С. // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. – 2019. – Т. 8. – №. 2. – С. 64-71.

4. Михайлов М. И., Кюрегян К. К., Малинникова Е. Ю., Исаева О.В., Карлсен А. А., Потемкин И. А., Кичатова В.С., Аль-Шараби Ш. А., Догатов Д. И., Корзая Л. И., Игнатъева М. Е., Поляков А. Д. Вирусные гепатиты: прогнозы и проблемы // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2019. – Т. 9. – №. 1. – С. 71-80.

#### **Индексируемых в международных системах цитирования Web of Science и Scopus:**

1. Kichatova, V.S. Frequency of Interferon-Resistance Conferring Substitutions in Amino Acid Positions 70 and 91 of Core Protein of the Russian HCV 1b Isolates Analyzed in the T-Cell Epitopic Context. / V.S. Kichatova, К.К. Kyuregyan, N.V. Soboleva, A.A. Karlsen., O.V. Isaeva, M.G. Isaguliants, M.I. Mikhailov // Journal of immunology research. – 2018. – Vol. 2018. – P. 13.

2. Kyuregyan К.К., Kichatova V.S., Karlsen A.A., Isaeva O.V., Solonin S.A., Petkov S., Nielsen M., Isaguliants M.G., Mikhailov M.I. Factors Influencing the Prevalence of Resistance Associated Substitutions in NS5A Protein in Treatment-Naive Patients with Chronic Hepatitis C // Biomedicines. – 2020. – 8. – 80.

#### **Статьи в других изданиях:**

1. Кичатова В.С., Соболева Н.В., Карлсен А.А., Исаева О.В., Солонин С.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Клинически значимые полиморфизмы в геноме вируса гепатита С среди генотипов вируса, наиболее распространенных на территории Российской Федерации. //Сборник трудов конференций молодых ученых «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний». – 2019. –С.29-4

#### **Тезисы:**

1. Kichatova V.S., Karlsen A.A., Isaeva O.V., Solonin S.A., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Hepatitis C virus seroprevalence in Russian Federation: results of population based study //Медицинская вирусология. Материалы ежегодной конференции Балтийского сообщества по контролю и профилактике вирусных инфекций "Вирусные инфекции регионального значения" 3–5 октября 2015 г., – Москва. – Приложение, Т. – 30. – С. 72.

2.Кичатова В.С., Карлсен А.А., Исаева О.В., Солонин С.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Распределение генотипов ВГС среди потребителей инъекционных наркотиков в г. Москве. // Сборник тезисов конференции молодых учёных "Биология, эпидемиология и вакцинопрофилактика инфекционных заболеваний" 18–19 апреля 2016 г., – Москва. – С. 17.

3. Kichatova V.S., Soboleva N.V., Karlsen A.A., Isaeva O.V., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Analysis of prevalence of substitutions in amino acid positions 70 and 91 of viral nucleocapsid associated with sustained virologic response to interferon therapy in chronic hepatitis C. // International conference "Toolkits for DNA Vaccine design, an update" November 17-21, 2016. – Moscow. –Abstract book. – p.40.

4. Кичатова В.С., Соболева Н.В., Карлсен А.А., Исаева О.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Сравнительный анализ распространенности аминокислотных полиморфизмов в позициях 70 и 91 белка core вируса гепатита С на территории России и в других регионах мира. // IX Всероссийская научно-

практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» 18-20 апреля 2017 г., – Москва. – Сборник трудов конференции, Т.– 1. – С. 59.

5. Кичатова В.С., Карлсен А.А., Соболева Н.В. Клинически значимые полиморфизмы в геноме вируса гепатита С. //VIII Конференция молодых ученых РМАНПО с международным участием «Горизонты медицинской науки» 19-20 апреля 2017 г., – Москва. – Сборник трудов конференции, Т.– 1. – С. 215-217.

6. Kichatova V.S., Kyuregyan K.K., Soboleva N.V., Karlsen A.A., Isaeva O.V., Isagulians M.G., Mikhailov M.I. Frequency of interferon-resistance conferring mutations in amino acid positions 70 and 91 of the core protein of Russian HCV 1b isolates analyzed in the T-cell epitopic context. //International conference "Vaccines & vaccination" september 27- october 1, 2017. – Moscow. –Abstract book– p.34.

7. Кичатова В.С., Карлсен А.А., Исаева О.В., Солонин С.А., Исагулянц М.Г., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Частота выявления мутаций в белке NS5a вируса гепатита С, ассоциированных с лекарственной резистентностью, среди ранее нелеченных пациентов. // Научно-практическая конференция молодых ученых "Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний" 17-18 апреля 2018 г., – Москва. – Тезисы докладов. – С. 27-28.

8. Кичатова В.С., Карлсен А.А., Исаева О.В., Солонин С.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Частота выявления мутаций в белке NS5A вируса гепатита С, ассоциированных с лекарственной резистентностью, среди ранее нелеченных пациентов. X Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2018» 27-28 сентября 2018 г., – Минск. – Сборник трудов конференции, Т.– 1. – С. 279-280.

9. Кичатова В.С., Соболева Н.В., Карлсен А.А., Исаева О.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Клинически значимые полиморфизмы в геноме вируса гепатита С. // XII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Вирусные гепатиты- достижения и новые перспективы» 19-20 сентября 2019 г., – Москва. – Материалы конференции. – С. 42.

### **Благодарности**

Хочу выразить глубокую благодарность моему научному руководителю, **Карену Кареновичу Кюрегяну** за неоценимый вклад не только в исполнение данной работы, но и в формирование автора как специалиста, за личный пример научного азарта, придающего сил в непростых ситуациях. От всей души выражаю благодарность д.м.н., профессору, член-корр. РАН **Михаилу Ивановичу Михайлову** за неизменную поддержку и помощь не только на всех этапах работы, но и жизни автора. Работать под Вашим руководством настоящая честь для меня. Хочу выразить искреннюю благодарность **Марии Георгиевне Исагулянц** за возможность проведения совместных научных работ и неожиданное расширение границ восприятия научных задач и их решений. Огромное спасибо за активную помощь, вклад в исследование и моральную поддержку **Анастасии Андреевне Карлсен, Людмиле Юрьевне Ильченко, Ольге Владиславовне Исаевой, Наталье Васильевне Соболевой, Сергею Александровичу Солонину, Илье Владимировичу Гордейчуку**. Большое спасибо ученому секретарю ФГБУ «Научно-исследовательского института гриппа имени А.А. Смородинцева», к.б.н. **Ирине Викторовне Амосовой** за помощь при подготовке к защите данной работы.