

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-90>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Мутации в гене *UL97* цитомегаловируса (*Herpesvirales: Herpesviridae: Cytomegalovirus: Human betaherpesvirus 5*), ассоциированные с устойчивостью к ганцикловиру, у реципиентов аллогенных стволовых гемопоэтических клеток

Демин М.В.¹, Тихомиров Д.С.¹, Бидерман Б.В.¹, Дроков М.Ю.¹, Судариков А.Б.¹, Туполева Т.А.¹, Филатов Ф.П.^{2,3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 125167, Москва, Россия;²

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;

³ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия

Введение. Инфекция, вызываемая цитомегаловирусом (*Herpesvirales: Herpesviridae: Cytomegalovirus: Human betaherpesvirus 5*) (ЦМВ), является серьезной проблемой для пациентов с ослабленной системой иммунной защиты, в число которых входят лица с депрессиями кроветворения. В случае возникновения ЦМВ-ассоциированных осложнений возникает необходимость в проведении противовирусной терапии. Однако в ходе естественного мутационного процесса, особенно при длительном использовании препаратов в субоптимальных дозах, могут возникнуть штаммы ЦМВ, устойчивые к действию противовирусных препаратов (таких, как ганцикловир, валганцикловир). Гипотетически возникновение устойчивости у вируса может являться причиной более агрессивного течения инфекции, неэффективности противовирусной терапии и, как следствие, увеличения количества смертельных исходов. В связи с этим своевременное выявление мутаций, которые потенциально могут привести к устойчивости вируса к противовирусным препаратам при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), а также при трансплантации органов и тканей, может оказаться важным при принятии терапевтического решения. Мы приводим описание трех клинических случаев, для которых проанализирована динамика появления мутантного штамма ЦМВ по гену *UL97*, коррелирующая с вирусной нагрузкой и клинической картиной.

Цель исследования – определение периода возникновения в гене *UL97* фосфотрансферазы ЦМВ мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, у пациентов с гемобластозами после трансплантации аллогенных стволовых гемопоэтических клеток (алло-ГСК).

Материал и методы. В исследование вошли 48 образцов ДНК ЦМВ, выделенной из периферической крови 3 реципиентов алло-ГСК с ЦМВ-инфекцией, находившихся на лечении в клиниках ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» («НМИЦ гематологии») Минздрава России с онкогематологическими заболеваниями в 2015–2017 гг. Пациенты получили условные коды (ПР, ПД и ФС). У всех исследуемых выявлены мутации, ассоциированные с резистентностью к противовирусной терапии (ПВТ). Для поиска мутаций применялся метод секвенирования по Сэнгеру. Полученные последовательности ДНК подвергались анализу с помощью программного обеспечения Nucleotide BLAST и Genome compiler. Поиск мутаций осуществлялся в программе MRA mutation resistance analyzer. При помощи данной программной среды нуклеотидные последовательности сравнивались с референсной последовательностью *UL97* штамма ЦМВ Merlin.

Результаты и обсуждение. Для всех пациентов, у которых обнаружены штаммы вируса, содержащие мутации С592G (ПР), С607F (ПД) и С603W (ФС), определены моменты возникновения мутационных изменений – на 187, 124 и 1184 день после трансплантации соответственно. Показано, что появление мутаций с высоким фактором резистентности сопровождается ростом вирусной нагрузки (ВН), появлением характерной клинической картины и отсутствием адекватного ответа на лечение ганцикловиром и его производными.

Заключение. С использованием полученных результатов предполагается разработка тест-системы на основе полимеразной цепной реакции (рПЦР; random polymerase chain reaction, rPCR) для детекции мутаций в наиболее часто встречающихся кодонах: М460I/V, С592G, А591V, А594T/V, L595F/S, С603W. Учитывая, что данные по распространенности мутационных изменений получены из зарубежных источников, целесообразно проведение аналогичных исследований о частоте встречаемости мутаций в гене *UL97* среди популяции РФ с целью повышения качества и точности тест-систем.

Ключевые слова: цитомегаловирус (ЦМВ) человека; трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК); вирусная хемотрезистентность; ганцикловир; противовирусная терапия (ПВТ)

Для цитирования: 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; 67(1): 37–47.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-90>

Для корреспонденции: Демин Михаил Валерьевич, биолог, научный сотрудник лаборатории вирусологической безопасности, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 125167, Москва, Россия. E-mail: memindisha@gmail.com

Участие авторов: Демин М.В. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи; Тихомиров Д.С. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи; Бидерман Б.В. – сбор, анализ и интерпретация данных; Дроков М.Ю. – интерпретация данных, подготовка текста статьи; Судариков А.Б. – одобрение окончательного варианта статьи для публикации; Туполева Т.А. – одобрение окончательного варианта статьи для публикации; Филатов Ф.П. – одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным Этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России (Протокол № 160 от 23.12.2021).

Поступила 17.12.2021

Принята в печать 14.01.2022

Опубликована 28.02.2022

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-90>

Mutations in the *UL97* gene of cytomegalovirus (*Herpesvirales: Herpesviridae: Cytomegalovirus: Human betaherpesvirus 5*) associated with ganciclovir resistance in recipients of allogeneic hematopoietic stem cells

Mikhail V. Demin¹, Dmitry S. Tikhomirov¹, Bella V. Biderman¹, Mikhail Yu. Drovkov¹, Andrey B. Sudarikov¹, Tatiana A. Tupoleva¹, Felix P. Filatov^{2,3}

¹FSBI «National Medical Research Center for Hematology» of the Ministry of Health of Russia, 125167, Moscow, Russia;

²FSBRI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia;

³FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia

Introduction. Infection caused by cytomegalovirus (CMV) is a serious problem for patients with weakened immunity, including patients with hematopoietic depression. The cases of complications associated with cytomegalovirus require antiviral therapy. However, during the natural mutation process, especially with prolonged use of drugs in suboptimal doses, CMV strains resistant to the action of antiviral drugs (such as ganciclovir, valganciclovir) may occur. Hypothetically, the emergence of resistance in the virus may cause a more aggressive course of infection, the ineffectiveness of antiviral therapy and, as a result, an increase in the number of deaths. In this regard, timely detection of mutations that can potentially lead to the resistance of the virus to antiviral drugs during hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), as well as during organ and tissue transplantation, may be important when making a therapeutic decision. We describe three clinical cases for which the dynamics of the appearance of a mutant strain of CMV by the *UL97* gene, which correlates with the viral load and clinical picture, is analyzed. The **aim** of the study was to determine the timing of the occurrence of mutations in CMV phosphotransferase *UL97* gene associated with resistance to antiviral drugs in patients with hemoblastoses after allogeneic hematopoietic stem cell (allo-HSCs) transplantation.

Material and methods. The study included 48 samples of CMV DNA isolated from the peripheral blood of three allo-HSCs recipients with CMV infection who were treated in the clinics of the FSBI «National Medical Research Center for Hematology» of the Ministry of Health of Russia with oncohematological diseases during 2015–2017. Patients received conditional codes (PR, PD, and FS). Mutations associated with antiviral therapy (AVT) resistance were identified in all patients. Sanger sequencing was used for mutation detection. The obtained DNA sequences were analyzed using Nucleotide BLAST and Genome compiler software. Mutations were searched in MRA mutation resistance analyzer software. The nucleotide sequences were compared with the *UL97* reference sequence of the Merlin CMV strain using this software environment.

Results and discussion. For all patients in whom the virus strains containing C592G (PR), C607F (PD) and C603W (FS) mutations were detected, the timing of the mutation occurrence was determined at days 187, 124 and 1184, respectively. The emergence of mutations with a high resistance factor was shown to be accompanied by an increase in viral load (VL), the appearance of a clinical picture characteristic of CMV infection and a lack of an adequate response to therapy with ganciclovir and its derivatives.

Conclusion. Using these results, it is proposed to develop the test system based on random polymerase chain reaction (rPCR) to detect mutations in the most frequently encountered codons: M460I/V, C592G, A591V, A594T/V, L595F/S, C603W. Given that the data on the prevalence of these mutations were obtained from foreign sources, it is advisable to conduct similar studies on the frequency of mutations in the *UL97* gene among the population of the Russian Federation in order to improve the quality and accuracy of test systems.

Keywords: *human cytomegalovirus (CMV), hematopoietic stem cells (HSCs) transplantation, viral chemoresistance, ganciclovir; antiviral therapy*

For citation: Demin M.V., Tikhomirov D.S., Biderman B.V., Drovkov M.Yu., Sudarikov A.B., Tupoleva T.A., Filatov F.P. Mutations in the *UL97* gene of cytomegalovirus (*Herpesvirales: Herpesviridae: Cytomegalovirus: Human betaherpesvirus 5*) associated with ganciclovir resistance in recipients of allogeneic stem hematopoietic cells. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(1): 37–47 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-90>

For correspondence: Mikhail V. Demin, Biologist, Researcher of the Virological Safety Laboratory, FSBI «National Medical Research Center of Hematology» of the Ministry of Health of Russia, 125167, Moscow, Russia. E-mail: memindisha@gmail.com

Information about the authors:

Demin M.V., <https://orcid.org/0000-0002-7579-3442>

Tikhomirov D.S., <https://orcid.org/0000-0002-2553-6579>

Biderman B.V., <https://orcid.org/0000-0002-6253-3334>

Drovkov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-9431-8316>

Sudarikov A.B., <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>

Tupoleva T.A., <https://orcid.org/0000-0003-4668-9379>

Filatov F.P., <https://orcid.org/0000-0002-2385-9251>

Contribution: Demin M.V. – research concept and design, conducting experiments, data collection, analysis and interpretation, text preparation; Tikhomirov D.S. – research concept and design, data analysis and interpretation, text preparation; Biderman B.V. – data collection, analysis and interpretation; Drovkov M.Yu. – data interpretation, text preparation; Sudarikov A.B. – approval of the final version of the article for publication; Tupoleva T.A. – approval of the final version of the article for publication; Filatov F.P. – approval of the final version of the article for publication.

Funding. The research was funded by the State budget.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the local Ethics Committee of the FSBI «National Medical Research Center for Hematology» of the Ministry of Health of Russia (Protocol No. 160 dated December 23, 2021).

Received 17 December 2021

Accepted 14 January 2022

Published 28 February 2022

Введение

Инфекция, вызываемая цитомегаловирусом (*Herpesvirales: Herpesviridae: Cytomegalovirus: Human betaherpesvirus 5*) (ЦМВ), является серьёзной проблемой для пациентов с ослабленной системой иммунной защиты, в число которых входят инфицированные вирусом иммунодефицита человека (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) (ВИЧ) на стадии синдрома приобретённого иммунодефицита (СПИД) [1], пациенты с опухолевыми заболеваниями, депрессиями кроветворения, а также реципиенты органов и тканей. При возникновении ЦМВ-ассоциированных осложнений возникает необходимость в проведении противовирусной терапии (ПВТ). Наиболее часто рассматриваются препараты, действующими веществами которых являются ганцикловир, фоскарнет либо цидофовир [2]. На территории Российской Федерации из препаратов прямого действия для кли-

нического применения зарегистрированы только ганцикловир и его аналоги, модифицированные для повышения биодоступности. Среди последних можно выделить валиновый эфир – валганцикловир, который широко используется в медицинской практике в связи с лучшими адсорбционной способностью и биодоступностью в сравнении с ганцикловиром. Его применяют перорально; в ситуациях, когда пациенты не способны принимать препараты внутрь, вводится ганцикловир. Тем не менее действующим веществом во всех случаях выступает ганцикловир, и основной механизм противовирусного действия этих препаратов заключается в ингибировании вирусной ДНК-полимеразы, что в свою очередь прекращает репликацию возбудителя [3]. Фосфорилированный ганцикловир (ганцикловир трифосфат), являющийся аналогом дезоксигуанозина, накапливается в инфицированной клетке и встраивается в растущую цепь реплицирующейся вирусной ДНК. После этого становится невозможным присоеди-

ние следующих нуклеотидов, в результате чего вирусная репликация ингибируется [4].

Однако в ходе естественного мутационного процесса на фоне длительного применения ганцикловира или валганцикловира, особенно при использовании препаратов в субоптимальных дозах [5], могут возникнуть штаммы ЦМВ, устойчивые к их действию. В основе молекулярных механизмов выработки устойчивости лежит возникновение мутационных изменений в генах, кодирующих вирусную фосфотрансферазу (*UL97*) и ДНК-полимеразу (*UL54*) [6]. В случае длительной ПБТ может произойти отбор штамма с несколькими мутациями, обеспечивающими резистентность. Мутации, понижающие сродство того или иного фермента к препаратам, обладают разными показателями фактора устойчивости (резистентности) (resistance factor, RF), который вычисляется следующим образом:

$$RF = \frac{IC_{50 \text{ мутанта}}}{IC_{50 \text{ дикого типа}}}, \quad (1)$$

где IC_{50} – концентрация, снижающая на 50% число вирусных бляшек в культуре клеток человека [3].

Большинство случаев формирования резистентных штаммов обусловлены мутационными изменениями в вирусном гене *UL97*. Мутации, вызывающие устойчивость к действию фоскарнета и цидофовира, локализованы в гене *UL54* [7], однако указанные препараты не зарегистрированы для клинического применения на территории РФ. Мутации, ответственные за резистентность к терапии ганцикловиром/валганцикловиром, представляют собой однонуклеотидные замены или короткие (от 1 до 17 аминокислот) делеции [8], которые затрагивают АТФ-связывающий регион или сайты переноса фосфата, изменяющие способность фермента к фосфорилированию действующего вещества препарата. При этом не возникает значительных препятствий для вирусной репликации [2]. Примерно 95% ганцикловир-устойчивых штаммов ЦМВ содержат 1 или более мутаций в гене *UL97*. Обычно они локализованы в специфических кодонах – 460, 520 и 590–607; в 70% случаев – в кодонах 450, 594 и 595 [9]. Мутации в кодонах 460 и 520 расположены в консервативных киназных доменах и с большей вероятностью оказывают влияние на киназную функцию белка, что объясняет незначительную степень разнообразия таких изменений [10]. Сегмент гена 590–607 не играет большой роли в репликации патогена, однако мутации в нём нарушают способность к связыванию с ганцикловиром, не затрагивая естественные биологические функции фермента. Поэтому именно в этом регионе наблюдается большое количество аминокислотных замен и делеций, ответственных за резистентность [10].

У иммунокомпрометированных пациентов (реципиенты органов и тканей, ВИЧ-инфицированные) наиболее частыми являются следующие мутации: M460I/V, C592G, A591V, A594T/V, L595F/S, C603W.

Все они ведут к увеличению показателя RF в пределах от 5 до 16 [11].

Формирование у возбудителя устойчивости может служить причиной более агрессивного течения инфекции, неэффективности ПБТ и, как следствие, увеличения количества смертельных исходов. Показано, что частота возникновения резистентности вируса к ганцикловиру у реципиентов трансплантата стволовых клеток довольно высока и оценивается как ~3,8% [12]. Описаны случаи, когда появление мутантного штамма сопровождалось повышением вирусной нагрузки (ВН) и приводило к летальному исходу [13].

С учётом изложенного своевременное выявление мутационных изменений, потенциально способных вызвать устойчивость вируса к ганцикловиру при трансплантации стволовых гемопоэтических клеток (СГК), а также органов и тканей может иметь существенное значение при принятии терапевтического решения. В статье приведено описание 3 клинических случаев, для которых проанализирована динамика появления мутантного штамма ЦМВ по гену *UL97*.

Цель настоящей работы – определение времени возникновения штамма ЦМВ с мутацией в гене фосфотрансферазы *UL97*, ассоциированной с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, у пациентов с гемобластомами после трансплантации аллогенных стволовых гемопоэтических клеток (алло-СГК).

Материал и методы

В результате ранее выполненного исследования обнаружены мутации в гене *UL97* ЦМВ у 3 реципиентов алло-ГСК, находившихся на лечении в клиниках ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России с онкогематологическими заболеваниями (острые лейкозы; неходжкинская лимфома) в период с 2016 по 2017 гг. [14]. С целью анализа времени возникновения мутантного штамма изучали архивные образцы ДНК ЦМВ, выделенного от данных пациентов как до, так и после обнаружения мутационных изменений. Пациенты получили условные коды (ПР, ФС, ПД). В работу были взяты 47 образцов вирусной ДНК, выделенной из периферической крови (ПР – 17 проб, ФС – 20 и ПД – 10 проб). Данные пациентов представлены в **табл. 1**. Наличие ЦМВ в крови и показатели ВН определяли с помощью набора «АмплиСенс EBV/ЦМВ/HHV6-скрин-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия).

Для всех пациентов была известна дата первичной регистрации мутантного штамма. В поиск были включены образцы ДНК, выделенной из периферической крови пациентов за 2 мес. до указанной даты и 2 мес. спустя. Оценены показатели ВН и объём полученной пациентами ПБТ. Характеристики исследованного материала представлены в **табл. 2**.

Амплификацию и секвенирование участка гена *UL97* проводили согласно описанной ранее методике [14]. Полученную последовательность ДНК анализировали с помощью программного обеспечения Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih>).

gov/Blast.cgi) и Genome compiler (<https://designer.genomecompiler.com>). Поиск мутаций осуществляли в программе MRA mutation resistance analyzer (<http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/mitarbeiter/HKestler/mra/app/index.php?plugin=form>). При помощи данной программной среды сравнивали нуклеотидные последовательности с референсной последовательностью гена UL97 штамма Merlin (GenBank № AY446894.2).

Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Протокол № 160 от 23.12.2021).

Результаты

У всех исследуемых в крови до проведения трансплантации обнаружены анamnестические антитела класса к ЦМВ класса IgG. Таким образом, все эпизоды развития инфекционного процесса не могут быть классифицированы как первичное инфицирование.

Анализ последовательностей участка гена *U97*, полученной из образцов, включённых в исследование, показал, что обладающие потенциалом резистентности мутационные изменения обнаруживались не во всех доступных образцах, а регистрировались лишь в определённый момент времени после трансплантации. Далее отдельно рассмотрен каждый клинический случай.

1. Пациент ПР

Клинический диагноз: лимфома из клеток мантийной зоны. Трансплантация аллогенных стволовых гемопоэтических клеток от 18.03.2016 г.

У пациента зафиксирована описанная ранее в литературе мутация, обладающая потенциалом резистентности, – С592G. Она впервые выявлена 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 также в течение всего срока наблюдения. После появления С592G мутация А628Е не элиминировалась, что видно на **рис. 1**. Это свидетельствует о том, что с наибольшей долей вероятности речь идёт об одном вирусном штамме, в котором на фоне уже имеющейся мутации появилась дополнительная.

Из графика на **рис. 2** видно, что появление мутации С592G зафиксировано на фоне роста ВН >10 000 копий геном-эквивалент на 100 000 ядродержащих клеток. Для оценки влияния мутации на резистентность вируса к действию противовирусных препаратов проанализирована ПВТ, проводимая пациенту за время наблюдения. Полученные данные представлены на **рис. 2**.

Из **рис. 2** видно, что эффективного снижения значения ВН удалось добиться только на фоне приме-

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика включённых в исследование реципиентов аллогенных стволовых гемопоэтических клеток

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of allogenic hematopoietic stem cells recipients included in the study

Код пациента Patient code	Пол Gender	Возраст Age	Основной диагноз Main diagnosis	Источник трансплантата Transplant source
ПР PR	Мужской Male	51	Лимфома из клеток мантийной зоны Mantle cell lymphoma	Неродственный полностью совместимый донор, стволовые кроветворные клетки Unrelated fully compatible donor, hematopoietic stem cells
ФС FS	Женский Female	64	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukemia	Неродственный частично совместимый донор, стволовые кроветворные клетки Unrelated partially compatible donor, hematopoietic stem cells
ПД PD	Женский Female	37	Острый лимфобластный лейкоз Acute lymphoblastic leukemia	Неродственный полностью совместимый донор, стволовые кроветворные клетки Unrelated fully compatible donor, hematopoietic stem cells

Таблица 2. Условия проведения эксперимента

Table 2. Conditions of the study conducting

Код пациента Patient code	Количество образцов до обнаружения мутации Number of samples before mutation detection	Количество образцов после обнаружения мутации Number of samples after mutation detection	Количество дней от трансплантации до обнаружения мутации Days number from transplantation to mutation detection	Период наблюдения за динамикой возникновения мутации (количество дней до/после мутации) Period of observation of the dynamics of mutation occurrence (days number before/after mutation)
ПР PR	9	14	187	306 (184/122)
ФС FS	17	5	1184	243 (157/86)
ПД PD	15	6	124	150 (124/26)

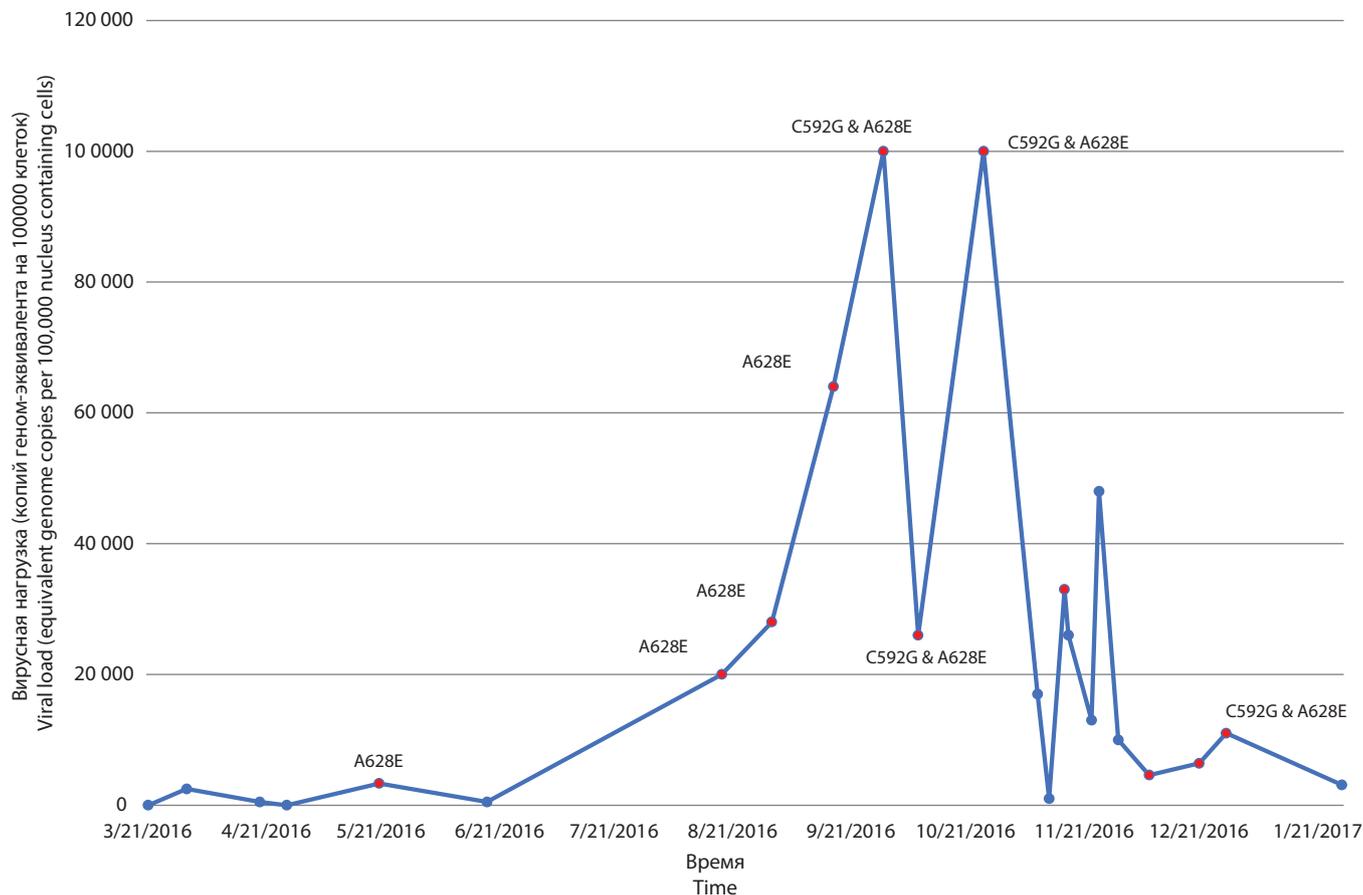


Рис. 1. Динамика вирусной нагрузки до и после появления мутантного штамма у пациента ПР.

Fig. 1. Dynamics of viral load before and after the appearance of the mutant strain in the patient PR.

нения фоскарнета, что дополнительно подтверждает наличие проявлений резистентности (отсутствие динамики этого показателя в течение 2 нед на фоне адекватной ПВТ). Данный препарат является структурным имитатором пирофосфат-аниона, который избирательно ингибирует место связывания пирофосфата в вирусных ДНК-полимеразах в концентрациях, не влияющих на активность ДНК-полимеразы человека. Таким образом, наличие мутации в гене *U97* не изменяет степень его активности.

2. Пациентка ФС

Клинический диагноз: острый миелоидный лейкоз. Трансплантация аллогенных стволовых гемопоэтических клеток от 21.12.2013 г.

У этой пациентки обнаружены 2 ранее описанные в литературе мутации: C592G и C603W. При этом более агрессивная C603W впервые выявлена спустя 1184 дня после трансплантации. На основании изучения архивных образцов установлено, что мутация C592G возникла ещё до начала исследования (см. рис. 3). В указанной временной точке одновременно детектировались обе мутации. Однако позднее мутация C592G элиминировалась, что может указывать на смену мажорного вирусного штамма в ходе наблюдения и проведения ПВТ (в т.ч. фоскар-

нетом). Приведённые факты с высокой степенью вероятности позволяют предполагать имевший место процесс селекции штамма под давлением препаратов, что видно на рис. 4.

3. Пациент ПД

Клинический диагноз: острый лимфобластный лейкоз. Аллогенная трансплантация стволовых гемопоэтических клеток от 28.06.2017 г.

В данном случае обнаружена 1 ранее описанная в литературе мутация – C607F. Исследование архивных образцов показало, что моментом её возникновения можно считать 124 день после трансплантации (см. рис. 5).

Анализ проводимой ПВТ в зависимости от ВН и выявления мутационных изменений представлен на рис. 6.

Обсуждение

Ограниченность выбора противовирусных препаратов прямого действия, зарегистрированных в Российской Федерации, накладывает ограничения на выбор терапевтической тактики. Проблема усугубляется вероятностью возникновения в вирусном геноме мутаций, ассоциированных с устойчивостью к ПВТ.

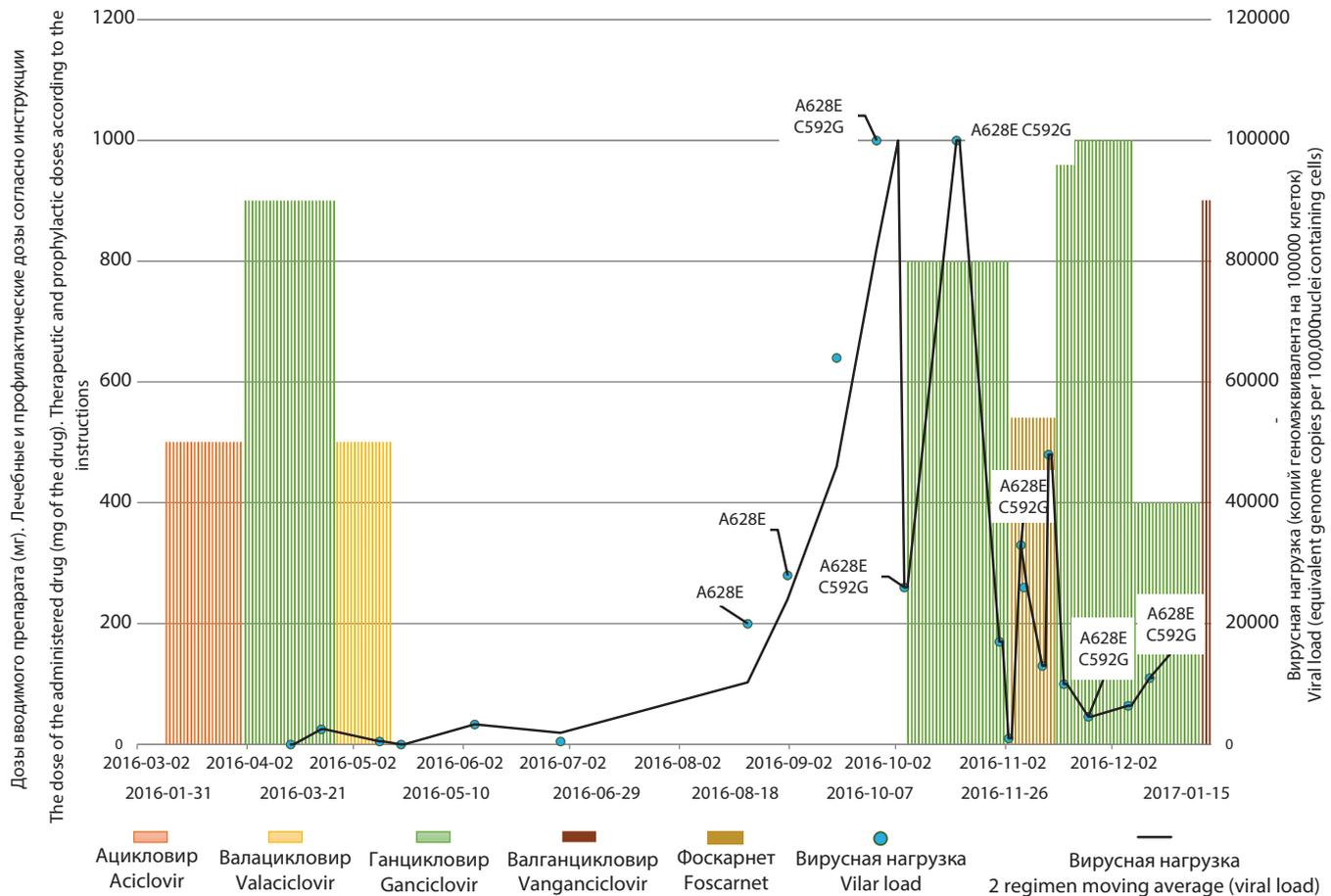


Рис. 2. Динамика введения противовирусных препаратов на фоне вирусной нагрузки у пациента ПР. Ганцикловир, ацикловир и фоскарнет вводились внутривенно; валацикловир и валганцикловир – перорально.

Fig. 2. Dynamics of antiviral drugs administration against the background of viral load in a patient PR. Ganciclovir, acyclovir, and foscarnet were administered intravenously; and valaciclovir, valganciclovir were given orally.

Особое значение подобный сценарий имеет для реципиентов алло-СГК. В ранний посттрансплантационный период в организме одновременно функционируют две иммунные системы – донора и пациента, что, в свою очередь, способствует установлению перекрёстных взаимодействий между вирусом и двумя этими системами. Данная ситуация может влиять на возможность образования или селекции штаммов, резистентных к проводимому лечению.

Принимая во внимание, что все включённые в исследование реципиенты были инфицированы ЦМВ ещё до трансплантации (на что указывает наличие анамнестических антител в крови), можно предполагать несколько путей появления в организме реципиента устойчивого штамма. В первую очередь мутация может возникнуть как результат естественной эволюции патологического агента. Вторая возможность заключается в попадании подобного штамма при трансплантации от донора-носителя. Однако реализация данного пути представляется маловероятной, поскольку все доноры были обследованы на наличие в крови ДНК ЦМВ до сбора и заготовки СГК. Другим фактором, свидетельствующим против этой теории, является преобладание в крови здорового не предле-

ченного человека дикого типа возбудителя (в связи с отсутствием давления со стороны противовирусных препаратов). Процесс отбора штаммов с мутациями резистентности возможен также на фоне длительной терапии ганцикловиром в субоптимальных дозах, о чём имеются сообщения в литературе [15].

Следует также отметить, что обнаруженные мутационные изменения в подавляющем большинстве описаны в зарубежных источниках и, вероятно, действительно наиболее распространены. Однако в настоящем исследовании, несмотря на малый объём выборки, зафиксированы ранее не описанные мутации с неопределённым фактором резистентности. Это может свидетельствовать о наличии популяционных различий в разных географических зонах и требует дальнейшего изучения.

Изучение динамики появления мутантных штаммов показало, что все эпизоды возникновения мутации с высоким показателем фактора резистентности ассоциировались с ростом ВН в крови. При этом её существенное повышение либо предшествует моменту регистрации новой мутации, либо совпадает с этой временной точкой. Пик ВН детектировался у пациентов в разные периоды: у пациентов ФС и ПД он имел

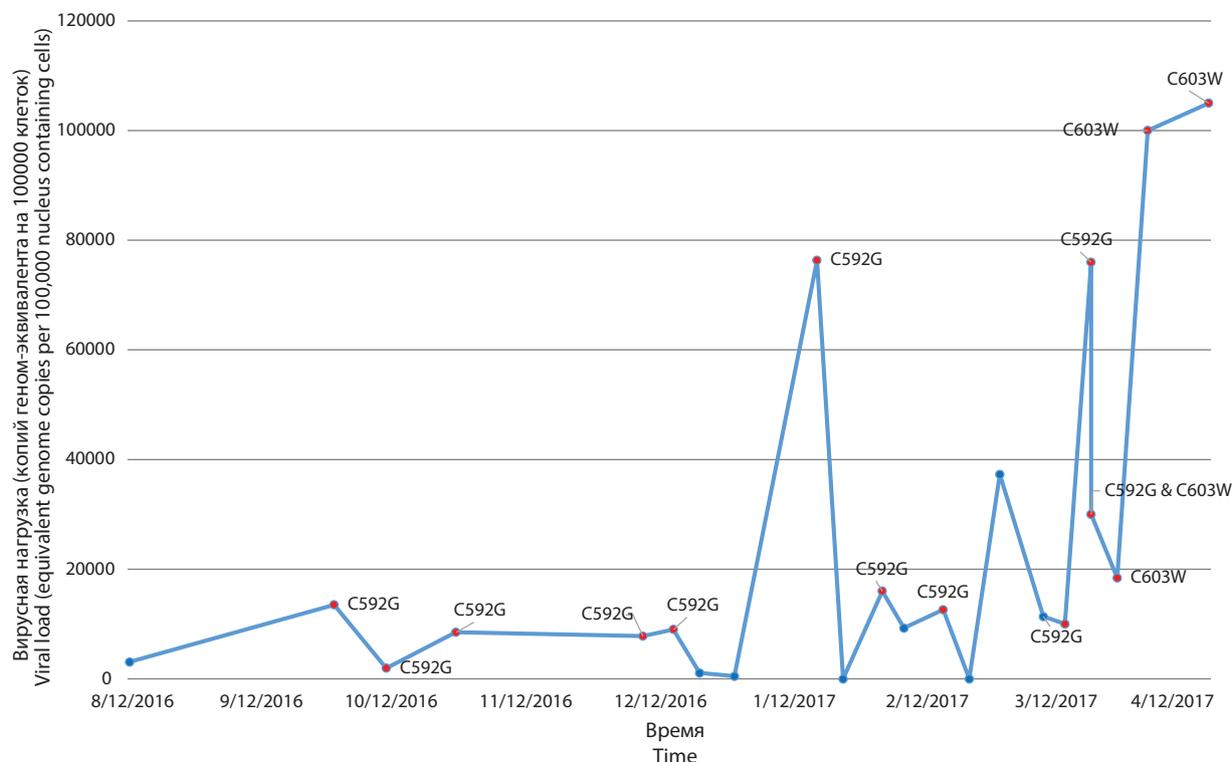


Рис. 3. Динамика вирусной нагрузки до и после появления мутантного штамма у пациентки ФС. Показатель вирусной нагрузки представлен в виде количества копий геном-эквивалента на 100 000 клеток в крови.

Fig. 3. Dynamics of viral load before and after the appearance of a mutant strain in the patient FS. The viral load index is presented as the number of copies of the genome equivalent per 100,000 nucleus containing cells in the blood.

место после появления новой мутации, а в случае пациента ПР совпал с моментом её непосредственного обнаружения. В целом наблюдаемые феномены на данном этапе могут быть объяснены как недостаточной чувствительностью выбранного метода, так и взаимовлиянием штаммов в плане репликации каждого из них. В литературе встречается информация о том, что в организме одновременно может присутствовать более 1 штамма ЦМВ [13]. При этом используемая для идентификации методика (секвенирование по Сэнгеру), несмотря на точность обнаружения однонуклеотидных замен, предоставляет информацию лишь о преобладающем на момент взятия материала геноме.

Возможная причина указанного явления заключается в том, что мутантный штамм образуется в организме до того, как его удаётся зарегистрировать выбранным методом, поскольку секвенирование по Сэнгеру позволяет получать последовательность мажорного штамма. Тем не менее, появляясь раньше момента регистрации, мутантный штамм начинает вносить свой вклад в ВН, из-за чего наблюдается её рост. В ходе естественного отбора на фоне проводимой ПВТ мажорным становится штамм, обладающий репликативным преимуществом, а не обладающий устойчивостью элиминируется. После элиминации чувствительного к ганцикловиру штамма резистентный штамм начинает активно реплицироваться, что приводит к наблюдаемым пикам ВН. Подобная тен-

денция особенно ярко наблюдается у пациентки ФС. В её случае на протяжении длительного времени регистрировался штамм с мутацией C592G, а в марте 2017 г. в одной из контрольных точек одновременно детектированы 2 мутации – C592G и C603W. После этого наблюдалась постепенная смена с C592G на C603W. Данная последовательность событий, наиболее вероятно, свидетельствует об одновременном присутствии 2 штаммов, несущих по 1 мутации. На рис. 6 видно, что имели место отдельные эпизоды повышения ВН до появления C603W, однако непосредственно перед обнаружением новой мутации зарегистрировано перманентное увеличение показателя наблюдаемой ВН.

У пациента ПР пик значения ВН совпал с моментом регистрации дополнительной мутации, после чего стали одновременно детектироваться 2 мутации. Данный феномен, вероятно имеет в своей основе не появление нового штамма, становящегося в результате мажорным, а возникновением новой мутации в рамках одного штамма. Таким образом, совпадение пика ВН с временной точкой регистрации вновь возникшей мутации может быть объяснено отсутствием антагонистических взаимодействий между разными вирусными штаммами.

Показаны статистически значимые различия в показателях ВН до и после возникновения мутации на фоне проводимой ПВТ ганцикловиrom у исследуемых ПД и ПР. Для пациентки ФС такая зависимость

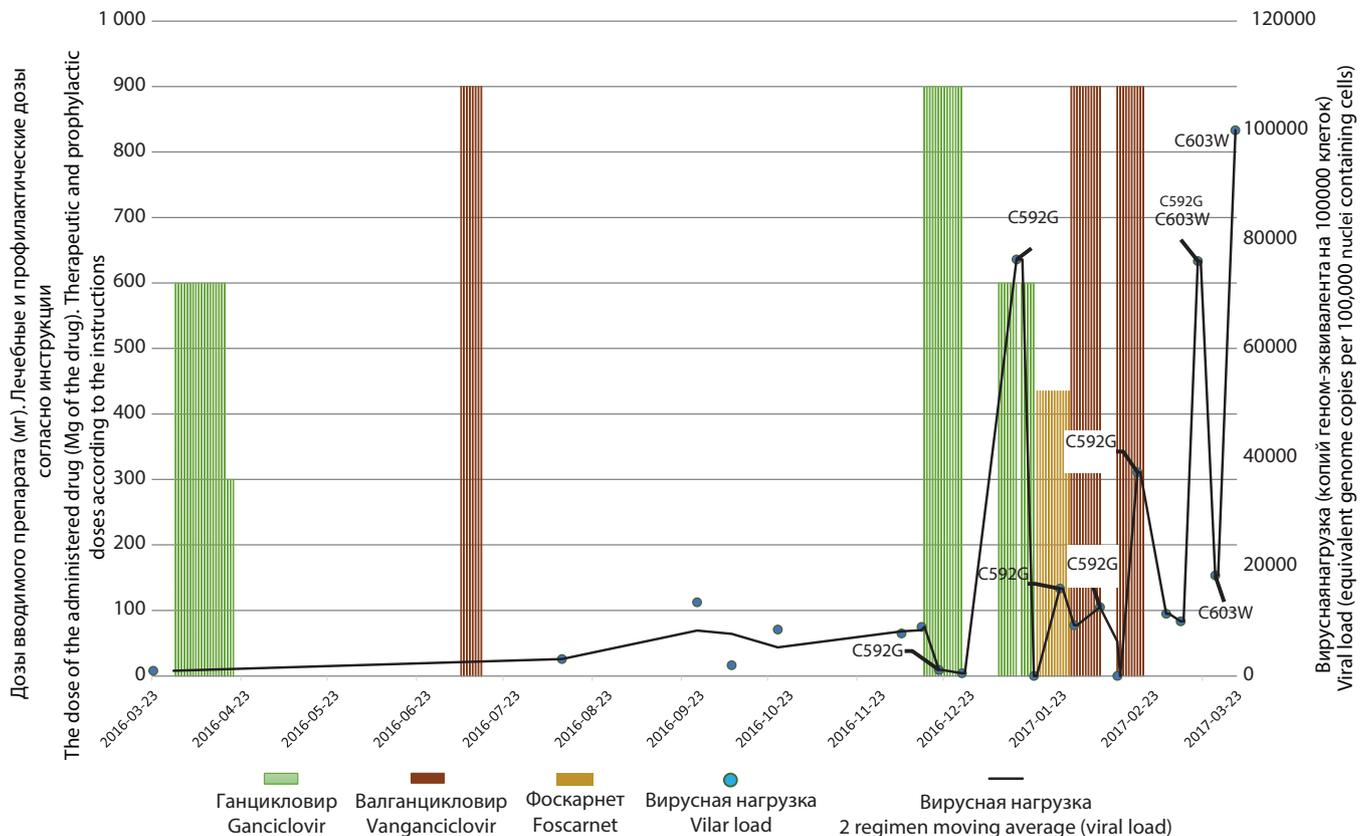


Рис. 4. Динамика введения противовирусных препаратов на фоне вирусной нагрузки у пациентки ФС. Ганцикловир и фоскарнет вводились внутривенно, валганцикловир – перорально. Дозы препарата (лечебные и профилактические согласно инструкции) приведены в миллиграммах.

Fig. 4. Dynamics of administration of antiviral drugs against the background of viral load in the patient FS. Ganciclovir and foscarnet were administered intravenously, and valganciclovir was given orally. Doses (therapeutic and prophylactic according to the instructions) are given in milligrams.

не была доказана. Однако этот факт может обусловлен недостаточной выборкой образцов, взятых после появления мутации С603W, поскольку вскоре после её обнаружения пациентка скончалась от септического шока. Среди выявленных мутаций С603W обладает наибольшим фактором резистентности и ассоциируется (согласно литературным данным) с высокой летальностью. Пациенты ПР и ПД на период наблюдения были живы, что, возможно, связано как с меньшим фактором устойчивости выявленных мутационных изменений, так и с различиями в течении основного заболевания и проводимой ПВТ.

В случае с 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 препаратами иммуноглобулинов. Тем не менее показатели ВН на фоне терапии не достигали столь высоких значений, как у остальных исследуемых. Это может быть объяснено тем, что мутация С607F обладает наиболее низким фактором устойчивости, что действительно 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, способствовало достижению 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.

Оценивая в целом данные о состоянии исследуемых 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: время ответа на терапию либо оказы-

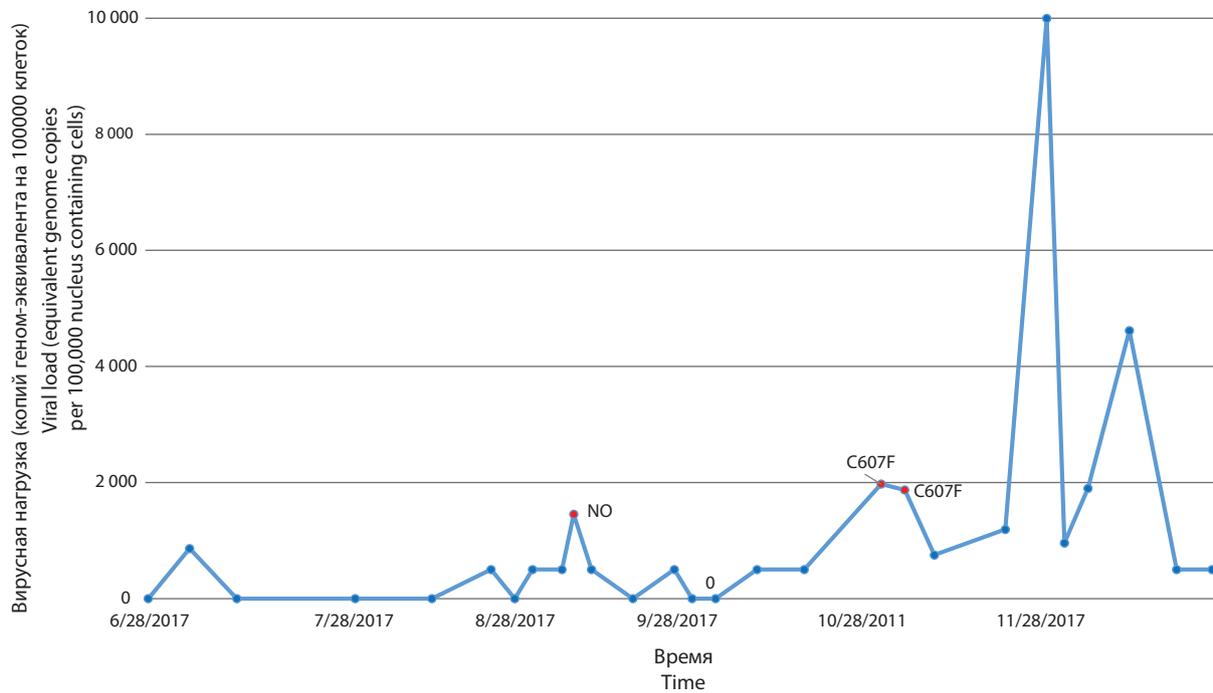


Рис. 5. Динамика вирусной нагрузки до и после появления мутантного штамма у пациента ПД. Показатель вирусной нагрузки представлен в виде количества копий геном-эквивалента на 100 000 ядросодержащих клеток в крови.

Fig. 5. Dynamics of viral load before and after the appearance of a mutant strain in the patient PD. The viral load index is presented as the number of copies of the genome equivalent per 100,000 nucleus containing cells in the blood.

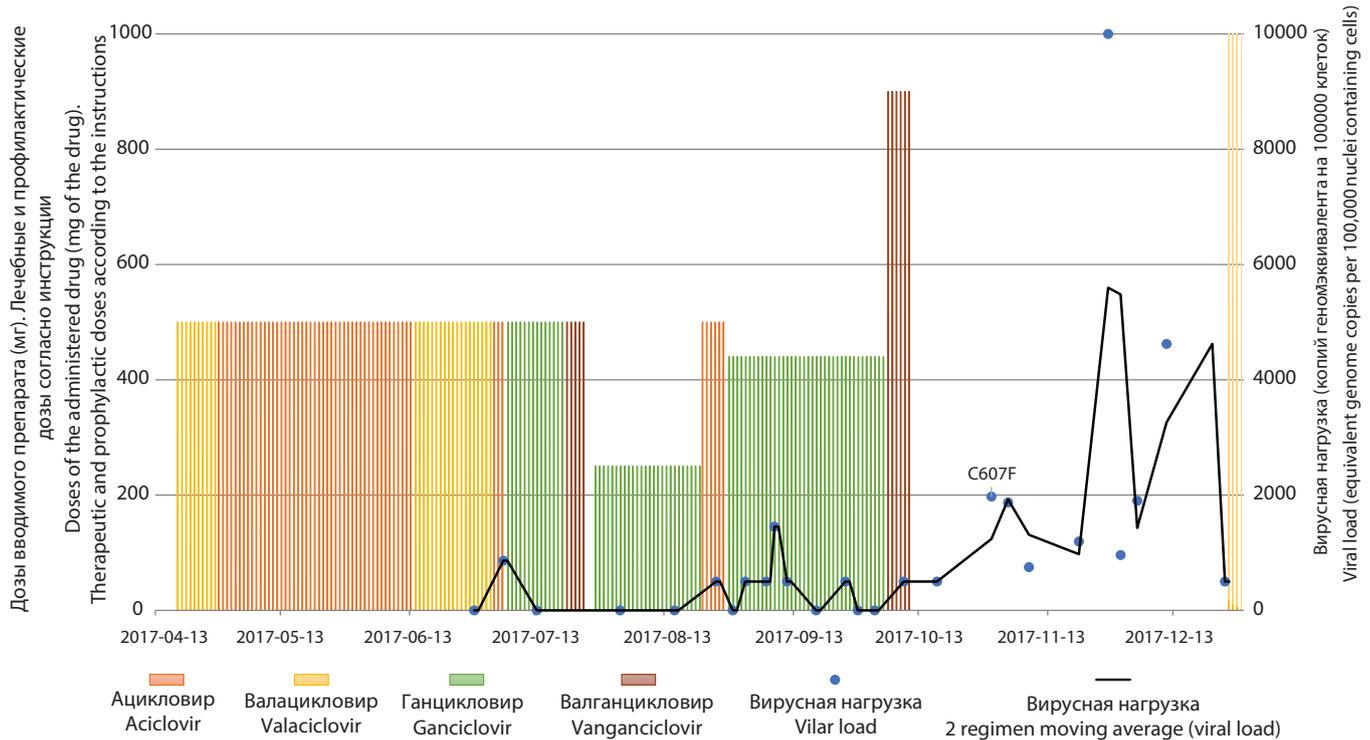


Рис. 6. Динамика введения противовирусных препаратов на фоне вирусной нагрузки у пациента ПД. Ганцикловир и ацикловир вводились внутривенно, валацикловир, валганцикловир – перорально. Дозы препарата (лечебные и профилактические согласно инструкции) приведены в миллиграммах.

Fig. 6. Dynamics of administration of antiviral drugs against the background of viral load in the patient PD. Ganciclovir and aciclovir were administered intravenously; and valaciclovir, valganciclovir were given orally. Doses (therapeutic and prophylactic according to the instructions) are given in milligrams.

ваются отложенным, либо он не наступает, 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.

Таким образом, продемонстрировано, что выявление мутационных изменений, потенциально приводящих к устойчивости, возможно до непосредственного возникновения клинических проявлений острой ЦМВ-инфекции. Это свидетельствует в пользу необходимости проведения скрининга реципиентов алло-ГСК на наличие мутаций в геноме ЦМВ с целью выявления субпопуляции, в которой терапия ганцикловиром может оказаться малоэффективной. Учитывая высокую нефротоксичность этого препарата, а также его миелосупрессивное действие, своевременная идентификация мутаций может существенно повлиять на выбор терапевтической тактики.

Заключение

С использованием полученных результатов предполагается разработка тест-системы на основе полимеразной цепной реакции (рПЦР; random polymerase chain reaction, rPCR), способной идентифицировать наиболее часто встречающиеся мутации с высоким фактором резистентности: M460I/V, C592G, A591V, A594T/V, L595F/S, C603W. Учитывая, что данные о распространённости мутаций получены из зарубежных источников, целесообразно также изучение частоты мутаций в гене *UL97* среди популяции РФ, что могло бы способствовать повышению качества и точности тест-систем.

Возможен алгоритм лечения, который может быть введён в ближайшее время. Он заключается в том, что в случае отсутствия ответа на ПВТ осуществляются генотипирование и определение наличия мутаций. При обнаружении мутационных изменений и после установления их характера врач принимает решение об увеличении дозы ганцикловира/валганцикловира или назначении другого препарата.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gerna G., Zavattoni M., Baldanti F., Furione M., Chezzi L., Revello M.G., et al. Circulating cFytomegalic endothelial cells are associated with high human cytomegalovirus (HCMV) load in AIDS patients with late-stage disseminated HCMV disease. *J. Med. Virol.* 1998; 55(1): 64–74.
- Göhrling K., Hamprecht K., Jahn G. Antiviral drug- and multidrug resistance in cytomegalovirus infected SCT patients. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2015; 13: 153–9. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.01.003>
- Piret J., Boivin G. Clinical development of letermovir and maribavir: Overview of human cytomegalovirus drug resistance. *Antiviral Res.* 2019; 163: 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.011>
- Schaeffer H.J., Beauchamp L., de Miranda P., Elion G.B., Bauer D.J., Collins P. 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature.* 1978; 272(5654): 583–5. <https://doi.org/10.1038/272583a0>
- Chou S. Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir. *Rev. Med. Virol.* 2008; 18(4): 233–46. <https://doi.org/10.1002/rmv.574>
- Göhrling K., Wolf D., Bethge W., Mikeler E., Faul C., Vogel W., et al. Dynamics of coexisting HCMV-UL97 and UL54 drug-resistance associated mutations in patients after haematopoietic cell transplantation. *J. Clin. Virol.* 2013; 57(1): 43–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.01.003>
- Britt W. Cytomegalovirus. In: Remington J.S., ed. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. Elsevier; 2011: 706–55.
- Komatsu T.E., Pikis A., Naeger L.K., Harrington P.R. Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir/valganciclovir: A comprehensive review of putative resistance pathways. *Antiviral Res.* 2014; 101: 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.10.011>
- Biron K.K. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* 2006; 71(2–3): 154–63. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.05.002>
- Fischer L., Imrich E., Sampaio K.L., Hofmann J., Jahn G., Hamprecht K., et al. Identification of resistance-associated HCMV UL97- and UL54-mutations and a UL97-polymorphism with impact on phenotypic drug-resistance. *Antiviral Res.* 2016; 131: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.04.002>
- Volfova P., Lengerova M., Lochmanova J., Dvorakova D., Ricna D., Palackova M., et al. Detecting human cytomegalovirus drug resistant mutations and monitoring the emergence of resistant strains using real-time PCR. *J. Clin. Virol.* 2014; 61(2): 270–4. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.07.008>
- Eckle T., Jahn G., Hamprecht K. The influence of mixed HCMV UL97 wildtype and mutant strains on ganciclovir susceptibility in a cell associated plaque reduction assay. *J. Clin. Virol.* 2004; 30(1): 50–6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2003.08.010>
- Göhrling K., Feuchtinger T., Mikeler E., Lang P., Jahn G., Handgretinger R., et al. Dynamics of the emergence of a human cytomegalovirus UL97 mutant strain conferring ganciclovir resistance in a pediatric stem-cell transplant recipient. *J. Mol. Diagnostics.* 2009; 11(4): 364–8. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2009.080153>
- Demin M.V., Biderman B.V., Glinshchikova O.A., Sudarikov A.B., Filatov F.P., Tikhomirov D.S., et al. Mutations in the cytomegalovirus UL97 gene associated with ganciclovir resistance in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Clin. Microbiol. Antimicrob. Chemother.* 2019; 21(4): 352–7. <https://doi.org/10.36488/cmacc.2019.4.352-357>
- Chou S., Waldemer R.H., Senters A.E., Michels K.S., Kemble G.W., Miner R.C., et al. Cytomegalovirus UL97 phosphotransferase mutations that affect susceptibility to ganciclovir. *J. Infect. Dis.* 2002; 185(2): 162–9. <https://doi.org/10.1086/338362>