

И.А. Габдрахманов, К.В. Козлов, В.С. Сукачев,
Ю.И. Ляшенко, К.С. Иванов,
Т.М. Зубик, К.В. Жданов

Взаимосвязь ковалентно-замкнутой кольцевидной дезоксирибонуклеиновой кислоты и клиничко-вирусологических показателей у больных хроническим вирусным гепатитом В

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. Представлен обзор литературных данных, касающихся ковалентно-замкнутой кольцевидной дезоксирибонуклеиновой кислоты вируса гепатита В и ее взаимосвязи с другими клиничко-вирусологическими показателями в различных фазах естественного течения хронического вирусного гепатита В. Среди госпитализируемых пациентов с хроническим вирусным гепатитом В в Российской Федерации абсолютное большинство составляют больные в фазе иммунного контроля и реактивации. Изменения клиничко-вирусологических показателей в этих фазах носят сложный и иногда противоречивый характер. В настоящее время одна из ключевых ролей в развитии хронического вирусного гепатита В отводится ковалентно-замкнутой кольцевидной дезоксирибонуклеиновой кислоте, которая представляет собой способ организации генома вируса гепатита В. Основными этапами биосинтеза ковалентно-замкнутой кольцевидной дезоксирибонуклеиновой кислоты, транспортировка релаксированной линейной дезоксирибонуклеиновой кислоты в ядро и ее превращение в ковалентно-замкнутую кольцевидную дезоксирибонуклеиновую кислоту. Помимо ковалентно-замкнутой кольцевидной дезоксирибонуклеиновой кислоты в качестве анализируемых клиничко-вирусологических показателей выбраны поверхностный антиген гепатита В, дезоксирибонуклеиновая кислота вируса гепатита В, степень активности воспалительного процесса и фиброза. Исходя из современных представлений, дезоксирибонуклеиновая кислота вируса гепатита В, а не поверхностный антиген гепатита В, содержащийся в сыворотке крови, коррелирует с уровнями ковалентно-замкнутой кольцевидной и общей дезоксирибонуклеиновой кислоты в ткани печени у нелеченных, отрицательных по е-антигену пациентов с хроническим вирусным гепатитом В. В то же время уровень ковалентно-замкнутой кольцевидной дезоксирибонуклеиновой кислоты в ткани печени не коррелирует со степенью активности воспалительного процесса и фиброза.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит В, ковалентно-замкнутая кольцевидная дезоксирибонуклеиновая кислота, дезоксирибонуклеиновая кислота вируса гепатита В, поверхностный антиген гепатита В, е-антиген гепатита В, фиброз, индекс гистологической активности, взаимосвязь.

В настоящее время в мире проживает не менее 360 млн человек, страдающих хроническим гепатитом В (ХГВ), и ежегодно от различных клинических форм этой инфекции умирает свыше 1 млн человек. Поэтому ХГВ-инфекция представляет собой глобальную медико-социальную проблему, которая обусловлена стабильным уровнем заболеваемости и высокими затратами на диагностический и лечебный процессы [14].

В естественном течении ХГВ выделяют 4 фазы: иммунной толерантности, клиренса, иммунного контроля, реактивации. Однако в Российской Федерации среди госпитализируемых пациентов абсолютное большинство составляют больные в фазе иммунного контроля и реактивации. Несмотря на то, что вирусологическая характеристика данных фаз достаточно хорошо изучена, в последнее время были получены новые научные данные, в частности, организация генома вируса гепатита В в

виде ковалентно-замкнутой кольцевидной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ккзДНК), позволяющие оптимизировать диагностику и лечение больных с ХГВ-инфекцией. Также представляет интерес изучение и оценка взаимосвязи вирусологических и морфологических показателей у больных ХГВ [1, 13, 20, 24].

Уникальной особенностью генома вирусного гепатита В (ВГВ) является то, что только «-» цепь дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) является полной, с обратной полярностью по отношению к матричной рибонуклеиновой кислоте (мРНК), в то время как «+» цепь представлена в виде нескольких молекул меньшей длины; 5'-конец «-» цепи ковалентно связан с протеином вирусной ДНК-полимеразы; 5'-конец «+» цепи содержит РНК-олигонуклеотид, являющийся затравкой для синтеза «+» цепи [3, 8, 30]. Эти структурные особенности помогают понять отличие репликации ВГВ от полуконсервативной ре-

пликации ретровирусов, заключающееся в запуске синтеза рибонуклеиновой кислоты (РНК) на матрице ДНК с помощью ДНК-полимеразы и образовании промежуточной РНК, называемой прегеномной РНК (пгРНК) [9, 36, 40]. Тем не менее, в отличие от ретровирусов, интеграция генома вируса гепатита В в хромосомный аппарат клетки хозяина не является обязательным компонентом в жизненном цикле ВГВ [34]. Вместо этого, релаксированная линейная ДНК (рлДНК) в нуклеокапсиде транспортируется в ядро и преобразуется в эписомальную кзкДНК, которая служит матрицей для транскрипции вирусных мРНК [34, 36].

На матрице пгРНК осуществляется не только обратная транскрипция, но и трансляция С-протеина и вирусной ДНК-полимеразы. ДНК-полимераза связывается с эпсилон-структурой, находящейся на 5'-конце пгРНК и запускает синтез вирусной ДНК, а также образование нуклеокапсида [34, 38]. Инкапсидированная пгРНК затем подвергается обратной транскрипции посредством вирусной ДНК-полимеразы с образованием «-» цепи вирусной ДНК. «-» цепь является матрицей для синтеза «+» цепи. Нуклеокапсид созревает как только образуется рлДНК и может либо покинуть клетку, либо пополнить ядерный пул кзкДНК [39, 45].

Основными этапами биосинтеза кзкДНК являются: декапсидация нуклеокапсида, содержащего рлДНК, транспортировка рлДНК в ядро и ее превращение в кзкДНК [9, 34]. Были исследованы различные молекулярные механизмы декапсидации рлДНК. Воздействие на сигнал ядерной локализации, расположенный на карбоксильном конце белка сердцевины, позволяет зрелым капсидам взаимодействовать с кариоферинами гепатоцита и вводить безбелковую рлДНК в ядро для образования кзкДНК [12].

Превращение рлДНК в кзкДНК требует удаления белка полимеразы и РНК праймеров с 5'-конца «-» цепи и «+» цепи ДНК, соответственно, а также удаление концевых фрагментов ДНК, заполнение пробелов и лигирование обеих цепей ДНК. Предполагается, что все эти реакции, скорее всего, катализируются клеточными механизмами репарации ДНК гепатоцита, необходимо точное определение белков репарации ДНК, участвующих в этих реакциях. Так, тирозил-ДНК-фосфодиэстераза-2 (ТДФ-2), фермент, ответственный за расщепление связей тирозил-5'-ДНК, образованных между топоизомеразой II и клеточной ДНК, также специфически расщепляет уникальную ковалентную связь белок-РНК [17, 41]. Поскольку вирусная ДНК-полимераза и ДНК соединены посредством 5'-ДНК-фосфотирозил связи, выглядит правдоподобным то, что ТДФ-2 может выполнять удаление вирусной полимеразы, связанной с ДНК, и что она необходима для синтеза кзкДНК. Однако роль этого фермента при образовании кзкДНК в реплицирующих вирусах клетках остаётся спорной [6]. Исследования D. Cai и H. Guo [13] также не под-

тверждают роли ТДФ-2 при образовании кзкДНК ВГВ, поскольку необратимое разрушение ТДФ-2 в стабильной клеточной линии с индуцируемым ВГВ вызывало повышенную транскрипцию трансгенной вирусной РНК и последующую репликацию ДНК, а уровни безбелковой рлДНК и кзкДНК также пропорционально повышались. Случайные нарушения при транслокации затравки приводят к запуску синтеза "+" цепи ДНК *in situ* на 3'-конце «-» цепи ДНК с образованием содержащей терминальные повторы двухцепочечной линейной формы ДНК (длДНК). Показано, что содержащая терминальные повторы длДНК служит прямой предшественницей встроенного в хромосомный аппарат ВГВ [22, 46].

Общепризнано, что белки репарации ДНК распознают два пробела в рлДНК как разрывы ДНК, и прямо восстанавливают рлДНК до кзкДНК. Однако допускается также, что рлДНК может сперва преобразовываться в содержащую терминальные повторы длДНК, путём удлинения «+» и «-» цепей полимеразой вируса или хозяина, а затем путём внутримолекулярной гомологичной рекомбинации образуется кзкДНК. Несмотря на то, что эписомная содержащая терминальные повторы длДНК не была обнаружена в инфицированных вирусами гепатоцитах обычными методами гибридизации, анализы последовательности рекомбинантных соединений кзкДНК и объединений ДНК вируса и хозяина в печени инфицированных уток и инфицированных лесных сурков, указывали на предположительное существование содержащей терминальные повторы длДНК, которая могла бы преобразоваться в кзкДНК и встроиться в хромосому хозяина путём репарации ДНК через присоединение негомологичных концов [12, 28, 36, 46].

Как и другие ядерные вирусные эписомные ДНК, молекулы кзкДНК гепатовирусов в ядрах инфицированных клеток объединяются с нуклеосомами и собираются в структуры, подобные клеточному хроматину хозяина, называемые мини-хромосомами [4]. Картирование распределения нуклеосом вдоль кзкДНК утиного вирусного гепатита В (УВГВ) показало, что нуклеосомы расположены не в случайном порядке на кзкДНК. Так, несколько защищённых нуклеосомами участков в области генома УВГВ, известной как место расположения различных элементов регуляции транскрипции *cis* (нуклеотиды с 2000 по 2700), неизменно определялись в образцах печени, инфицированных УВГВ. Эти наблюдения показывают, что как и в клеточном хроматине хозяина, положение нуклеосом и модификация гистонов в мини-хромосомах могут играть важную роль в регуляции транскрипции кзкДНК [35]. Действительно, активность репликации HBV в печени пациентов коррелирует с состоянием ацетилирования гистонов H3 и H4, связанных с кзкДНК ВГВ [31]. Также обнаружено, что некоторые ингибиторы деацетилазы гистонов тормозили транскрипцию кзкДНК УВГВ и ВГВ, а также подавленную ИФН- α транскрипцию

кзкДНК посредством замедления ацетилирования лизина 9 (H3K9) и 27 (H3K27) в гистоне H3, связанном с кзкДНК [22].

Кроме того было показано, что помимо нуклеосом, факторы транскрипции, коактиваторы, корепрессоры, модифицирующие хроматин ферменты клетки хозяина, а также белки вируса, такие как белки сердцевин и НВх, в некоторых случаях, регулировали при поступлении в мини-хромосомы кзкДНК ее транскрипционную активность [20]. Показано, что Х протеин вируса гепатита лесных суруков необходим вирусу для того, чтобы произошла инфекция *in vivo*. Инфекция вирионами ВГВ с геномом, дефицитным по экспрессии НВх, привела к образованию таких же количеств кзкДНК в культурах первичных гепатоцитов человека, как и в клетках, которые были инфицированы вирионами ВГВ с геномом дикого типа [25]. Однако ДНК ВГВ обнаруживалась только в клетках, инфицированных вирионами ВГВ дикого типа. Интересно, что транс-комплементацией НВх оказалось возможно вызвать транскрипцию мРНК ВГВ в клетках, инфицированных дефицитными по НВх вирионами, даже спустя несколько недель после первичной инфекции. Дальнейшие эпигенетические анализы показали, что НВх поступал в мини-хромосомы кзкДНК и модулировал модификации гистонов, которые способствовали ацетилированию гистонов на мини-хромосоме кзкДНК и благоприятствовали образованию транскрипционно-активной структуры хроматина. Кроме того, было показано, что НВх усиливает транскрипцию кзкДНК, противодействуя активности репрессоров транскрипции. Недавно стало известно, что Спиндлин 1, клеточный белок домена Тюдор, более эффективно привлекался на кзкДНК НВВ в отсутствие НВх, и подавлял активность транскрипции кзкДНК. Остановка экспрессии Спиндлин 1 восстанавливала транскрипцию кзкДНК в отсутствие экспрессии НВх. Напротив, экспрессия НВх сокращала привлечение Спиндлин 1 на кзкДНК и активировала транскрипцию [20, 25].

Ряд свидетельств от независимых исследовательских групп указывает, что белок капсида ВГВ также связан с мини-хромосомами кзкДНК [26]. Представляет интерес сообщение о том, что гепатоциты утки, которые были инфицированы УВГВ с геномом, дефицитным по экспрессии капсидного белка, накапливали такие же количества кзкДНК, но значительно меньшие количества вирусной мРНК, по сравнению с клетками, которые были инфицированы диким типом УВГВ в присутствии фоскарнета, блокирующего репликацию вирусной ДНК и внутриклеточное размножение кзкДНК. Этот факт показывает, что капсидный белок УВГВ может регулировать транскрипцию кзкДНК и/или оборот вирусной мРНК [33, 48].

кзкДНК НВВ содержит три главных островка CpG, которые могут подвергаться метилированию в различной степени. Недавние исследования метилирования кзкДНК у пациентов с ВГВ обнаружили,

что островок I CpG метилируется редко, а метилирование островков II и III было связано с низкими вирусными нагрузками. Кроме того, было показано, что метилирование островка II CpG значительно уменьшало транскрипционную активность кзкДНК [15, 47].

Очевидно, что структура мини-хромосомы и эпигенетические модификации регулируют поддержание и транскрипционную активность кзкДНК. Дальнейшее изучение эпигенетической регуляции и её взаимосвязи с генетической устойчивостью и функцией кзкДНК позволит открыть молекулярные мишени для новых терапевтических средств, дестабилизирующих кзкДНК или специфически тормозящих её транскрипцию [13].

Количество кзкДНК в инфицированном вирусом гепатоците предположительно определяется эффективностью пути внутриклеточного размножения кзкДНК. Для многих вирусов животных, декапсидация генома происходит строго на внеклеточной фазе вириона, поскольку нуклеокапсиды этих вирусов становятся зрелыми только в процессе сборки и секреции. Декапсидация генома дочерних нуклеокапсидов в инфицированных клетках – это уникальное свойство гепатовирусов. Учитывая то, что большие количества вирусной рДНК – предшественника образования кзкДНК – присутствуют в цитоплазме и, относительно, малое число кзкДНК накапливается в ядре, декапсидация генома зрелых нуклеокапсидов и образование кзкДНК должны строго контролироваться факторами хозяина и/или вируса. Кроме того, преждевременный выход вирусной ДНК в цитоплазму может привести к распознаванию инфекции ВГВ с помощью врождённых иммунных механизмов в клетках хозяина, с последующим развитием иммунного ответа, установление контроля над декапсидацией генома ВГВ важно не только для образования кзкДНК, но и для защиты вируса от подавления организмом хозяина [29, 32].

Ряд исследований указывает на то, что крупный белок оболочки УВГВ регулирует образование кзкДНК. Когда уровень крупного белка оболочки на ранней фазе инфекции низок, доставка зрелых нуклеокапсидов в ядро облегчается, что способствует быстрому образованию пула кзкДНК и обеспечивает устойчивую колонизацию инфицированных клеток. Когда кзкДНК реплицируется и достигает уровня, который поддерживает синтез достаточного количества крупного белка оболочки для сборки вирионов, зрелые нуклеокапсиды покрываются оболочкой и секретируются уже в качестве вирионов. Контроль размножения кзкДНК УВГВ, посредством крупного белка оболочки, показан *in vivo* на инфицированных УВГВ гепатоцитах утки. К примеру, инфекция рекомбинантным УВГВ, с дефицитом белков оболочки, приводит к примерно 20-кратному накоплению кзкДНК по сравнению с инфицированием нормальным ВГВ и последующей смерти инфицированных гепатоцитов [18]. Однако исследования на клетках

гепатомы человека показали, что дефицит белков оболочки ВГВ повышал уровень кзкДНК только в два раза, хотя приводил к обильному накоплению безбелковой рлДНК. Влияние белков оболочки ВГВ на репликацию кзкДНК указывает на то, что другие факторы вируса и клетки хозяина регулируют синтез кзкДНК ВГВ. Выявление факторов вируса и хозяина, определяющих метаболизм кзкДНК в инфицированных ВГВ гепатоцитах, позволит открыть новые мишени для противовирусной терапии [7, 19].

кзкДНК ВГВ может накапливаться в различных типах клеток человека и животных, но завершённый цикл образования кзкДНК ВГВ наблюдается только в инфицированных гепатоцитах человека. В частности, ВГВ не может синтезировать кзкДНК в гепатоцитах трансгенных по ВГВ мышей, несмотря на присутствие большого количества нуклеокапсидов с рлДНК [10]. Более того, трансгенная экспрессия полипептида совместного транспорта с таурохолатом натрия человека в гепатоцитах мыши (считающегося рецептором ВГВ и его спутника, вируса гепатита D) вызывает восприимчивость гепатоцитов мыши к инфицированию вирусом гепатита D, но не к инфицированию ВГВ. Этот факт указывает на то, что невосприимчивость гепатоцитов мыши к инфицированию ВГВ, помимо отсутствия функционального рецептора, может быть обусловлена невозможностью поддерживать достаточное образование кзкДНК [10, 12]. Исследования показали, что содержание кзкДНК на различных фазах ВГВ-инфекции у пациентов с сероконверсией по е-антигену значительно изменяется. Снижение вiremии, обычно наблюдаемое у отрицательных по е-антигену пациентов, по-видимому, обусловлено не только уменьшением количества кзкДНК ($>1 \log$), но и ослабленной эффективностью репликации, которая определялась как сумма рлДНК вируса, образованной на 1 молекулу кзкДНК [13, 20, 43].

Устойчивая положительная корреляция, наблюдаемая между числом копий пгРНК и рлДНК, свидетельствует о том, что ослабление репликативной активности у отрицательных по е-антигену пациентов не обусловлено изменениями эффективности обратной транскрипции. В то же время была отмечена слабая корреляция между вiremией и количеством кзкДНК в печени [20, 42]. Это указывает на то, что продуктивность вирусов может специфически снижаться в отрицательной по е-антигену фазе ХГВ с низкой репликацией, и подтверждает мнение о том, что определение вiremии у отрицательных пациентов по е-антигену непригодно как прогностический маркер инфекции в печени. Тот факт, что уровни *preS/S* транскриптов РНК и концентрация поверхностного антигена гепатита В одну молекулу кзкДНК незначительно различаются в двух группах по е-антигену, указывает на то, что только репликативный путь специфично ослабляется у таких отрицательных по е-антигену пациентов, и что продукция вирусных и субвирус-

ных частиц может регулироваться разными способами в течении ХГВ [42].

Тем не менее, молекулярные механизмы, отвечающие за снижение репликативной активности ВГВ, которое обнаружено у нелеченых отрицательных по е-антигену пациентов, требуют дальнейшего прояснения.

Течение ХГВ сопровождается разнообразными колебаниями вирусологических и морфологических показателей. Взаимосвязь этих изменений до сих пор продолжает интенсивно изучаться. В качестве анализируемых клинко-вирусологических показателей нами выбраны поверхностный антиген гепатита В, ДНК ВГВ, кзкДНК и степень фиброза. В настоящее время установлено, что связь гистопатологических изменений, уровня ДНК ВГВ в сыворотке и маркеров репликации ВГВ более сложна, чем полагали ранее [2, 16].

В некоторых работах указывается на то, что содержание поверхностного антигена гепатита В в сыворотке наряду с возрастом, уровнем фиброза служит надежным маркером в прогнозировании уровня кзкДНК у отрицательных по е-антигену пациентов. У данной группы наблюдается умеренная корреляция между ДНК ВГВ в сыворотке и тканевыми маркерами репликации ВГВ [21, 27]. L. Lin и V. Wong [27] предположили, что ДНК ВГВ в крови отражает количество кзкДНК ВГВ у отрицательных по е-антигену пациентов. У положительных по е-антигену пациентов наблюдается слабая корреляция количественных показателей поверхностного антигена гепатита В в сыворотке с уровнем, определяемым в ткани печени.

Другие авторы показывают, что ДНК ВГВ, а не поверхностный антиген гепатита В, содержащийся в сыворотке крови, коррелирует с уровнями кзкДНК и общей ДНК в ткани печени у нелеченых отрицательных по е-антигену пациентов с ХГВ. Причины отсутствия связи между уровнем поверхностного антигена гепатита В в сыворотке и вирусной нагрузкой в печени у отрицательных по е-антигену пациентов с ХГВ пока неясны. Как уровень кзкДНК, так и эффективность репликации (определяемая как отношение \log ДНК ВГВ в сыворотке к \log кзкДНК) были значительно выше у пациентов в фазе реактивации, чем у находящихся в фазе иммунного контроля. Напротив, не наблюдалось связи между уровнем образования поверхностного антигена гепатита В и фазой болезни. В противоположность ДНК ВГВ, поверхностный антиген гепатита В в сыворотке образуется встроенным вирусным геномом, в дополнение к кзкДНК [5]. Установлено, что содержание поверхностного антигена гепатита В в сыворотке зависит, главным образом, от трансляции специфических мРНК для гена «s», образованных на ковалентно-замкнутой кольцевидной ДНК в дополнение к встраиванию ДНК ВГВ в геном хозяина.

Таким образом, уровни поверхностного антигена гепатита В, коррелируя с общим содержанием ДНК ВГВ

в печени, скорее могут отражать транскрипционно-активную кзкДНК, а не её абсолютное количество [2]. Вероятно, что HBsAg в сыворотке лучше отражает количество кзкДНК, когда уровень кзкДНК достаточно высок. У отрицательных по е-антигену пациентов с хроническим гепатитом В количество кзкДНК невелико вследствие иммунного клиренса, и относительный вклад кзкДНК в образование поверхностного антигена гепатита В может быть ниже такового у положительных по е-антигену пациентов [42].

Исходя из современных данных, образование поверхностного антигена гепатита В не связано с количеством кзкДНК и не зависит от репликативной активности вируса (общая ДНК ВГВ в печени). Таким образом, поверхностный антиген гепатита В в сыворотке у отрицательных по е-антигену пациентов не является надёжным маркером для определения вирусной нагрузки в печени и репликативной активности вируса. Напротив, содержание ДНК ВГВ в сыворотке умеренно коррелирует с кзкДНК и хорошо коррелирует с общей ДНК ВГВ внутри печени. Уровень общей ДНК ВГВ в печени складывается из количества матричной ДНК, т.е. кзкДНК, и эффективности репликации вируса, т.е. рлДНК ВГВ. У отрицательных по е-антигену пациентов как количество кзкДНК, так и эффективность репликации вируса контролируется состоянием иммунитета хозяина. Следовательно, содержание ДНК ВГВ в сыворотке отражает иммунный статус хозяина и степень клиренса [42].

У отрицательных по е-антигену пациентов с высокими уровнями ДНК ВГВ в сыворотке, судя по гистологическим данным, отмечается большая выраженность воспалительного процесса в печени, а также повышенный риск биохимических обострений при дальнейшем наблюдении [5].

Что касается соотношения между уровнем ДНК ВГВ в сыворотке и стадиями некротического воспаления и фиброза печени, то оно не установлено определённно. Несколько исследований показали положительную корреляцию уровней ДНК ВГВ с некротическим воспалением и фиброзом у отрицательных по е-антигену пациентов. Однако было также показано, что низкие уровни ДНК ВГВ в сыворотке не всегда коррелируют со степенью некротического воспаления у отрицательных по е-антигену пациентов [11]. С. Zhu и М. Hussain [49] сообщили, что колеблющиеся уровни ДНК ВГВ в сыворотке отрицательных по е-антигену пациентов затрудняют определение порогового значения, отделяющего их от неактивных носителей. В этом исследовании не было обнаружено корреляции между уровнями кзкДНК ВГВ, ДНК ВГВ и поверхностный антиген гепатита В в сыворотке и активностью воспалительного процесса. Такой результат показывает, что у отрицательных по е-антигену пациентов установление надежных маркеров активности воспалительного процесса затруднительно. Причина отсутствия какой-либо корреляции между степенью активности воспалительного процесса и уровнем маркеров репликации ВГВ в ткани печени и сыворотке может заключаться в том, что повреждение

печени будет развиваться со временем, или же на него влияет реактивность иммунной системы.

Роль зависимых от иммунной системы механизмов подтверждается более слабыми проявлениями некротического воспаления, несмотря на высокие уровни репликации ВГВ в фазе иммунного контроля. D. Wong и M. Yuen [44] показали слабую корреляцию между уровнем кзкДНК ВГВ в сыворотке и в ткани печени с уровнем АЛТ. В то же время уровень АЛТ положительно коррелирует со степенью активности воспалительного процесса, поскольку их определяют общие патогенетические механизмы.

С вышеприведенными данными согласуются результаты, полученные Z. Tajik и H. Keyvani [37]. Они исследовали биопсийный материал, взятый у 22 пациентов и установили, что уровень кзкДНК ВГВ в ткани печени положительно коррелирует с уровнем ДНК ВГВ в ткани печени и сыворотке, но не коррелирует со степенью активности воспалительного процесса и фиброза. Интересные данные были получены H. Chan и M. Wong [5], которые выявили положительную корреляцию между уровнем кзкДНК в сыворотке и уровнем АЛТ у пациентов в фазе реактивации ВГВ, но не в фазе иммунного контроля. Эти результаты показывают, что присутствие кзкДНК в сыворотке – это ранний признак повреждения печени.

Как было показано выше, изменения вирусологических и морфологических показателей при хроническом гепатите В носят сложный и, подчас, противоречивый характер, исследования в этой области все еще малочисленны и зачастую дают результаты, которые не позволяют составить четкие представления о механизме развития данных изменений. В этой связи интерес к этой проблеме не снижается, что и предопределяет необходимость дальнейших исследований.

Литература

1. Жданов, К.В. Вирусные гепатиты / К.В. Жданов [и др.]. – СПб.: ИКФ «Фолиант», 2011. – 26 с.
2. Alghamdi, A. Correlation between Hepatitis B surface antigen titers and HBV DNA levels / A. Alghamdi [et al.] // Saudi Journal of Gastroenterology. – 2013. – Vol. 19. – № 6. – P. 252–256.
3. Bartenschlager, R. The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription / R. Bartenschlager [et al.] // The EMBO journal. – 1988. – Vol. 7. – № 13. – P. 4185.
4. Bock, C.T. Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell / C.T. Bock [et al.] // Virus genes. – 1994. – Vol. 8. – № 2. – P. 215–229.
5. Chan, H.L.Y. Use of hepatitis B virus DNA quantitation to predict hepatitis B e antigen reversion in cases of chronic hepatitis B / H.L.Y. Chan [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 2003. – Vol. 41. – № 10. – P. 4793–4795.
6. Cui, X. Maturation-associated destabilization of hepatitis B virus nucleocapsid / X. Cui [et al.] // Journal of virology. – 2013. – Vol. 87. – № 21. – P. 11494–11503.
7. Gao, W. Formation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: removal of genome-linked protein / W. Gao [et al.] // Journal of virology. – 2007. – Vol. 81. – № 12. – P. 6164–6174.
8. Gerlich, W.H. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand / W.H. Gerlich [et al.] // Cell. – 1980. – Vol. 21. – № 3. – P. 801–809.

9. Glebe, D. The molecular virology of hepatitis B virus / D. Glebe [et al.] // *Seminars in liver disease*. – 2013. – Vol. 33. – № 2. – P. 103–112.
10. Guidotti, L.G. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice / L.G. Guidotti [et al.] // *Journal of virology*. – 1995. – Vol. 69. – № 10. – P. 6158–6169.
11. Guner, R. Correlation between intrahepatic hepatitis B virus cccDNA levels and other activity markers in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B infection / R. Guner R. [et al.] // *European journal of gastroenterology & hepatology*. – 2011. – Vol. 23. – № 12. – P. 1185–1191.
12. Guo, H. Characterization of the intracellular deproteinized relaxed circular DNA of hepatitis B virus: an intermediate of covalently closed circular DNA formation / H. Guo [et al.] // *Journal of virology*. – 2007. – Vol. 81. – № 22. – P. 12472–12484.
13. Guo, J.T. Metabolism and function of hepatitis B virus cccDNA: Implications for the development of cccDNA-targeting antiviral therapeutics / J.T. Guo [et al.] // *Antiviral research*. – 2015. – Vol. 122. – P. 91–100.
14. Hwang, E.W. Global epidemiology of hepatitis B virus (ВГВ) infection / E.W. Hwang [et al.] // *N Am J Med Sci*. – 2011. – Vol. 4. – № 1. – P. 7–13.
15. Kim, J.W. Replicative activity of hepatitis B virus is negatively associated with methylation of covalently closed circular DNA in advanced hepatitis B virus infection / J.W. Kim [et al.] // *Intervirolgy*. – 2011. – Vol. 54. – № 6. – P. 316–325.
16. Kim, Y.J. The change of the quantitative HBsAg level during the natural course of chronic hepatitis B / Y.J. Kim [et al.] // *Liver International*. – 2011. – Vol. 31. – № 6. – P. 817–823.
17. Ledesma, F.C. A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage / F.C. Ledesma [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 461. – № 7264. – P. 674–678.
18. Lenhoff, R.J. Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus / R.J. Lenhoff [et al.] // *Journal of virology*. – 1994. – Vol. 68. – № 7. – P. 4565–4571.
19. Lentz, T.B. Roles of the envelope proteins in the amplification of covalently closed circular DNA and completion of synthesis of the plus-strand DNA in hepatitis B virus / T.B. Lentz [et al.] // *Journal of virology*. – 2011. – Vol. 85. – № 22. – P. 11916–11927.
20. Levrero, M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection / M. Levrero [et al.] // *Journal of hepatology*. – 2009. – Vol. 51. – № 3. – P. 581–592.
21. Lin, L.Y. Relationship between serum hepatitis B virus DNA and surface antigen with covalently closed circular DNA in HBeAg-negative patients / L.Y. Lin [et al.] // *Journal of medical virology*. – 2010. – Vol. 82. – № 9. – P. 1494–1500.
22. Liu, F. Alpha-interferon suppresses hepadnavirus transcription by altering epigenetic modification of cccDNA minichromosomes / F. Liu [et al.] // *PLoS pathogens*. – 2013. – Vol. 9. – № 9. – P. 3613.
23. Liu, N. Base pairing among three cis-acting sequences contributes to template switching during hepadnavirus reverse transcription / N. Liu [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 100. – № 4. – P. 1984–1989.
24. Locarnini, S. Molecular virology of hepatitis B virus / S. Locarnini [et al.] // *Seminars in liver disease*. – 2004. – Vol. 24. – P. 3–10.
25. Lucifora, J. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection / J. Lucifora [et al.] // *Journal of hepatology*. – 2011. – Vol. 55. – № 5. – P. 996–1003.
26. Lucifora, J. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA / J. Lucifora [et al.] // *Science*. – 2014. – Vol. 343. – № 6176. – P. 1221–1228.
27. Manesis, E.K. Hepatitis B surface antigen: relation to hepatitis B replication parameters in HBeAg-negative chronic hepatitis B / E. K. Manesis [et al.] // *Journal of hepatology*. – 2011. – Vol. 55. – № 1. – P. 61–68.
28. Mason, W. S. Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: Free minus-strand DNA / W. S. Mason [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1982. – Vol. 79. – № 13. – P. 3997–4001.
29. Mettenleiter, T.C. Herpesvirus assembly: an update / T.C. Mettenleiter [et al.] // *Virus research*. – 2009. – Vol. 143. – № 2. – P. 222–234.
30. Molnar-Kimber, K.L. Protein covalently bound to minus-strand DNA intermediates of duck hepatitis B virus / K.L. Molnar-Kimber [et al.] // *Journal of virology*. – 1983. – Vol. 45. – № 1. – P. 165–172.
31. Pollicino, T. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones / T. Pollicino T. [et al.] // *Gastroenterology*. – 2006. – Vol. 130. – № 3. – P. 823–837.
32. Rasaiyaah, J. HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment / J. Rasaiyaah [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 503. – № 7476. – P. 402–405.
33. Schultz, U. Elimination of duck hepatitis B virus RNA-containing capsids in duck interferon-alpha-treated hepatocytes / U. Schultz [et al.] // *Journal of virology*. – 1999. – Vol. 73. – № 7. – P. 5459–5465.
34. Seeger, C. Molecular biology of hepatitis B virus infection / C. Seeger [et al.] // *Virology*. – 2015. – Vol. 479. – P. 672–686.
35. Shi, L. Characterization of nucleosome positioning in hepadnaviral covalently closed circular DNA minichromosomes / L. Shi [et al.] // *Journal of virology*. – 2012. – Vol. 86. – № 18. – P. 10059–10069.
36. Summers, J. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate / J. Summers [et al.] // *Cell*. – 1982. – Vol. 29. – № 2. – P. 403–415.
37. Tajik, Z. Detection of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA in the Plasma of Iranian HBeAg-Negative Patients With Chronic Hepatitis B / Z. Tajik [et al.] // *Hepatitis monthly*. – 2015. – Vol. 15. – № 9. – P. 4–6.
38. Tavis, J.E. RNA sequences controlling the initiation and transfer of duck hepatitis B virus minus-strand DNA / J.E. Tavis [et al.] // *Journal of virology*. – 1995. – Vol. 69. – № 7. – P. 4283–4291.
39. Tuttleman, J.S. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells / J.S. Tuttleman [et al.] // *Cell*. – 1986. – Vol. 47. – № 3. – P. 451–460.
40. Urban, S. The replication cycle of hepatitis B virus / S. Urban [et al.] // *Journal of hepatology*. – 2010. – Vol. 52. – P. 282–284.
41. Virgen-Slane, R. An RNA virus hijacks an incognito function of a DNA repair enzyme / R. Virgen-Slane [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109. – № 36. – P. 14634–14639.
42. Volz, T. Impaired intrahepatic hepatitis B virus productivity contributes to low viremia in most HBeAg-negative patients / T. Volz [et al.] // *Gastroenterology*. – 2007. – Vol. 133. – № 3. – P. 843–852.
43. Werle-Lapostolle, B. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy / B. Werle-Lapostolle [et al.] // *Gastroenterology*. – 2004. – Vol. 126. – № 7. – P. 1750–1758.
44. Wong, D.K.H. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients / D.K.H. Wong [et al.] // *Hepatology*. – 2004. – Vol. 40. – № 3. – P. 727–737.
45. Wu, T.T. In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway / T.T. Wu [et al.] // *Virology*. – 1990. – Vol. 175. – № 1. – P. 255–261.
46. Yang, W. Integration of hepadnavirus DNA in infected liver: evidence for a linear precursor / W. Yang [et al.] // *Journal of virology*. – 1999. – Vol. 73. – № 12. – P. 9710–9717.
47. Zhang, Y. Comparative analysis of CpG islands among ВГВ genotypes / Y. Zhang [et al.] // *PLoS one*. – 2013. – Vol. 8. – № 2. – P. 56711.

48. Zhang, Y. Transcription of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Is Regulated by CpG Methylation during Chronic Infection / Y. Zhang [et al.] // PloS one. – 2014. – Vol. 9. – № 10. – P. 110442.
49. Zhu, C.J. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection / C.J. Zhu [et al.] // Hepatology. – 2002. – Vol. 36. – № 6. – P. 1408–1415.

I.A. Gabdrakhmanov, K.V. Kozlov, V.S. Sukachev, Yu.I. Lyashenko, K.S. Ivanov, T.M. Zubik, K.V. Zhdanov

Connection between covalently closed circular deoxyribonucleic acid and both clinical and virological indicators in patients with chronic viral hepatitis B

Abstract. We present an overview of published data relating to the covalently closed circular deoxyribonucleic acid of hepatitis B virus and its relationship to other clinical and virological indicators in the various phases of the infectious process in chronic hepatitis B. Patients in the phase of immune control and the phase of reactivation make up the vast majority among hospitalized patients with chronic viral hepatitis B in Russian Federation. Recent clinical and virological indicators in these phases are complex and sometimes contradictory. Currently, one of the key roles in the development of chronic hepatitis B is given to covalently closed circular deoxyribonucleic acid, which is a way of organizing the genome of the hepatitis B virus. The main stages of the biosynthesis of covalently closed circular deoxyribonucleic acid are uncoating of the nucleocapsid containing the relaxed linear deoxyribonucleic acid, transportation relaxed linear deoxyribonucleic acid to the nucleus and its transformation into a covalently closed annular deoxyribonucleic acid. In addition to the covalently closed circular deoxyribonucleic acid in this study as analyzed clinical and virological indicators selected, hepatitis B virus deoxyribonucleic acid, the degree of inflammatory activity and fibrosis. Based on the current concepts, hepatitis B virus deoxyribonucleic acid, not hepatitis B surface antigen, contained in serum correlates with the levels of the covalently closed circular deoxyribonucleic acid and total deoxyribonucleic acid in the liver of untreated e-negative antigen patients with chronic hepatitis B. At the same time the level of covalently closed circular deoxyribonucleic acid in the liver is not correlated with the degree of inflammatory activity and fibrosis.

Key words: chronic viral hepatitis B, covalently closed circular deoxyribonucleic acid, the deoxyribonucleic acid of the virus of hepatitis B, hepatitis B surface antigen, hepatitis B e antigen, fibrosis, histological activity index, interconnection.

Контактный телефон: 8-921-885-37-57; e-mail: ilnur87rahmanov@yandex.ru