

На правах рукописи

Рябов Григорий Сергеевич

**ВЛИЯНИЕ МУТАНТНЫХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ *CCR5*, *CCR2* И *SDF1*
ЧЕЛОВЕКА НА ВИЧ-ИНФЕКЦИЮ**

03.00.03 - молекулярная биология

**Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва 2004

Работа выполнена в ГУ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН.

Научные руководители:

доктор биологических наук
Бобков Алексей Филиппович
кандидат медицинских наук
Зверев Сергей Яковлевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Куш Алла Александровна
кандидат биологических наук
Шадрин Мария Игоревна

Ведущая организация - ГУ ЦНИИ эпидемиологии Минздрава РФ

Защита диссертации состоится « 1 » сентября 2004 г. в 12 часов на заседании
Диссертационного совета Д 001.020.01 в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского
РАМН по адресу: Москва, 123098, ул. Гамалеи, 16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института вирусологии им. Д.И.
Ивановского РАМН.

Автореферат разослан « 21 » сентября 2004 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

доктор медицинских наук

Косякова Н.П.

Актуальность проблемы. Вирус иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) активно изучается исследователями разных стран с момента его открытия в 1983 г. Однако, несмотря на это, на сегодняшний день эффективные способы борьбы с этим опасным заболеванием отсутствуют. В то же время, начиная с 1996 г., в литературе стали появляться данные о генетической устойчивости некоторых индивидов к заражению ВИЧ-1. Было показано, что мутации в генах хемокиновых рецепторов, используемых вирусом как корецепторы при проникновении в клетку, влияют на вероятность заражения. Первой обнаруженной мутацией была делеция в гене CCR5 (CCR5A32). Было установлено, что люди, гомозиготные по этому делеционному аллелю, обладают повышенной устойчивостью к заражению ВИЧ-1 (Dean et al. 1996; Liu et al., 1996; Samson et. al., 1996). Позднее появились сообщения о других мутациях, потенциально способных влиять не только на вероятность заражения, но и на течение заболевания (McDermott et al., 1998; Magierowska et al., 1999; Winkler et al., 1998). Однако необходимо отметить, что данные о возможной роли большинства мутаций (за исключением делеции CCR5A32) зачастую противоречивы. Более того, связь между сочетаниями мутантных аллелей в разных генах, отвечающих за функционирование иммунной системы человека, и возможностью инфицирования ВИЧ-1 практически не исследована.

Основным подходом к изучению влияния мутаций или аллельных полиморфизмов на возможность заражения ВИЧ-1 служит анализ генотипов предварительно отобранных и тщательно охарактеризованных групп лиц, подвергавшихся опасности заражения, но оставшихся не зараженными. В настоящий момент существуют такие группы неинфицированных людей, вступавших в половые контакты с ВИЧ-инфицированными без использования презервативов (Aarons et al. 1997, Dean et al., 1996; Winkler et al., 1998), а также реципиентов крови или ее продуктов, контаминированных вирусом (Dean et al. 1996; Salkowitz et al., 2001; Wilkinson et al. 1998). Необходимо отметить, что во всех перечисленных выше работах исследовалось влияние мутаций в геноме человека на возможность заражения ВИЧ-1 подтипа В. В связи с этим, представляло интерес выяснить возможную роль мутаций в генах хемокиновой системы CCR5, CCR2 и SDF1 при парентеральном пути передачи вируса в среде лиц, практикующих внутривенное применение психоактивных препаратов. При этом изучаемая группа подвергалась риску заражения вирусом подтипа А, что особенно важно в условиях распространяющейся в Российской Федерации эпидемии ВИЧ-1 среди наркоманов, вызванной именно этим вариантом ВИЧ-1 (Бобков и др., 1998).

Цель и задачи исследования. Основной целью настоящей работы явилось изучение влияния мутаций генов CCR5, CCR2 и SDF1 и их сочетаний на возможность заражения ВИЧ-1 лиц, практикующих внутривенное введение психоактивных веществ. В связи с этим в задачи исследования входило:

1. Выявление группы лиц с общим источником заражения, основным фактором риска заражения которых явилось внутривенное употребление психоактивных препаратов.

2. Генетическая характеристика вируса, вызвавшего эпидемию.

3. Наблюдение за ходом эпидемии, выделение группы наркоманов, неоднократно подвергавшихся риску заражения вирусом, но остававшихся не заразившимися («контактной» группы), и мониторинг этой группы на протяжении трех лет.

4. Изучение частот встречаемости аллельных состояний и сочетаний мутантных аллелей CCR5A32, CCR2-64I, SDF1-3'A и полиморфизма CCR5-59029A/G в группе здоровых доноров.

5. Изучение частот встречаемости, аллельных состояний и сочетаний мутантных аллелей CCR5A32, CCR2-64I, SDF1-3'A и полиморфизма CCR5-59029A/G среди «контактных» лиц и ВИЧ-инфицированных наркоманов.

6. Сравнение значений частот встречаемости, аллельных состояний и сочетаний мутантных аллелей CCR5A32, CCR2-64I, SDF1-3'A и полиморфизма CCR5-59029A/G, полученных в группах ВИЧ-инфицированных и здоровых доноров, с аналогичными значениями, полученными для группы «контактных» наркоманов.

Научная новизна работы. В результате проведенной работы были определены частоты встречаемости аллелей CCR5A32, CCR2-64I, SDF1-3'A и полиморфизма CCR5-59029A/G среди здоровых доноров на территории Российской Федерации. Была обнаружена и охарактеризована группа «контактных» наркоманов, неоднократно подвергавшихся риску заражения ВИЧ-1 подтипа А парентеральным путем, но остававшихся не зараженными. Получены данные о влиянии мутаций CCR5A32, CCR2-64I, SDF1-3'A и CCR5-59029A/G полиморфизма, а также их сочетаний на вероятность заражения при парентеральном пути передачи ВИЧ-1 подтипа А.

Практическая ценность.

1. Полученные частоты встречаемости мутаций CCR5A32, CCR2-64I, SDF1-3'A и полиморфизма CCR5-59029A/G среди здоровых доноров могут быть использованы в качестве стандартных значений при дальнейшем изучении различных групп,

подвергавшихся риску заражения ВИЧ-1, а также для оценки генетической устойчивости популяции.

2. Обнаруженная и охарактеризованная группа наркоманов, неоднократно подвергавшихся риску заражения ВИЧ-1, но оставшихся неинфицированными, может быть использована для дальнейшего изучения генетических факторов, влияющих на вероятность заражения ВИЧ-1.

3. Полученные данные о протективной роли гомозиготного состояния аллеля CCR5A32 и сочетаний мутантных аллелей CCR5A32 и CCR2-64I в гетерозиготном состоянии на фоне: полиморфного варианта CCR5-59029A/CCR5-59029A при парентеральном пути передачи вируса на заражение ВИЧ-1 могут использоваться при оценке генетической устойчивости популяции при передаче ВИЧ-1 парентеральным путем.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Вспышка ВИЧ-инфекции в г.Лысьва. среди лиц, практикующих внутривенное применение психоактивных препаратов, возникла из одного источника и была вызвана вариантом ВИЧ-1 подтипа А, характерным для этой группы риска в России.
2. Выявлена и охарактеризована группа лиц (n=75), подвергавшихся риску заражения ВИЧ-1 парентеральным путем, но оставшихся не инфицированными.
3. Генотип CCR5A32/CCR5A32 сообщает высокий уровень устойчивости к заражению ВИЧ-1 подтипа А при парентеральном пути передачи.
4. Сочетание мутаций CCR5A32 и CCR2-64I в гетерозиготном состоянии сообщает высокий уровень устойчивости к заражению ВИЧ-1 подтипа А при парентеральном пути передачи.

Апробация работы состоялась 18 декабря 2003 года на совместном заседании отдела молекулярной вирусологии и совета по предварительной экспертизе диссертационных работ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. Материалы диссертации были доложены на 8-й Европейской конференции по клиническим аспектам и лечению ВИЧ-инфекции (г. Афины, 2001 г.) и на научно-практической конференции "ВИЧ-инфекция и вирусные гепатиты с парентеральным механизмом заражения: Эпидемиология, Профилактика, Диагностика, Клиника, Лечение" (г. Суздаль, 2001 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения, заключения, выводов и

списка литературы, включающего 213 библиографических ссылок. Работа изложена на 132 страницах, включая 21 рисунок и 14 таблиц.

Экспериментальная часть

Материалы и методы. В данной работе нами было сформировано и исследовано три группы лиц. Первую группу составили ВИЧ-инфицированные (n=114) выявленные на территории Пермской области в период с 1996 г. по 2000 г. Вторую группу составили здоровые доноры (n=186). Третья группа была обнаружена во время проведения эпидемиологического расследования вспышки ВИЧ-инфекции в г. Лысьва Пермской области среди лиц, практикующих внутривенное употребление психоактивных веществ. В данную группу, вошли наркоманы, употреблявшие психоактивные вещества совместно с ВИЧ-инфицированными, но оставшиеся не зараженными (группа «контактных» наркоманов; n=75).

Для всех трех исследуемых групп были определены аллельные состояния мутаций CCR5A32, CCR2-64I, SDF1-3'A и полиморфизма CCR5-59029A/G. Детекция мутаций CCR5A32 проводилась с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Присутствие мутантного аллеля CCR5 оценивали по появлению меньшего фрагмента, размером 157 нуклеотидных пар, который выявлялся либо одновременно с фрагментом дикого типа (гетерозиготное состояние мутантного аллеля) либо без него (гомозиготное состояние мутантного аллеля).

В случае мутаций CCR2-64I, SDF1-3'A и полиморфизма CCR5-59029A/G, представляющих собой точковую замену одного нуклеотида на другой, полученные ПЦР фрагменты обрабатывались специфической эндонуклеазой, вносящей или не вносящей разрыв в зависимости от наличия или отсутствия замены. В случае мутации CCR2-64I использовалась эндонуклеаза Fok I, SDF1-3'A - MspI и в случае полиморфизма CCR5-59029A/G - эндонуклеаза Mhl.

Для серологического анализа сывороток крови ВИЧ-инфицированных наркоманов были использованы 2 синтетических олигопептида, гомологичные основному нейтрализующему эпитопу gp120 ВИЧ-1 - PI (RKSINIGPGRAFYATGD), реагирующий с сыворотками, полученными от пациентов, инфицированных вариантами вируса подтипа В и P2 (RTSVRIGPGQVFYKTGD), реагирующий с сыворотками, полученными от пациентов, инфицированных вариантами вируса подтипа А (Cheingsong-Popov, et al., 1994). Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием синтетических пептидов проводили по ранее описанному методу (Bobkova et al., 2001).

Для определения подтипов генов env и gag ВИЧ-1 использовали метод оценки электрофоретической подвижности гетеродуплексов. Оценку результатов проводили, сравнивая электрофоретическую подвижность гетеродуплексов, образованных в результате отжига анализируемого образца со стандартными продуктами ПЦР подтипов А-Н (Delwart et al., 1993; Heyndrickx et al, 2000).

Фрагменты ДНК, соответствующие области гена gag ВИЧ-1, с координатами 1348- 1881 (координаты приведены для нуклеотидной последовательности гена gag ВИЧ-1 штамма HXB2) были амплифицированы с помощью ПЦР с использованием двух пар праймеров: 5'-GACACCAAGGAAGCTCTAGATAA-3'/5'-AGACAGGCTAATTTTTAGGGA-3' – для первого раунда и 5'-ATGCTGAACATAGTGGGGGGACACC-3'/5'-AGCAAGGGTTTTGGCTTGAGGC-3' – для второго.

Для определения нуклеотидных последовательностей обеих цепей ДНК ВИЧ-1 использовали коммерческий набор dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Великобритания). Нуклеотидные последовательности определялись с помощью автоматического секвенатора (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Perkin Elmer, Великобритания). Полученные нуклеотидные последовательности обрабатывали с помощью Editview 1.0.1 программы (Macintosh, США). Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью метода «ближайших соседей» с использованием программы Mega2 (Arizona State University, США).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программ «Basic Statistics» и «Nonparametric Statistics» из пакета STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Первая программа использовалась при описании полученных распределений близких к нормальным, а также расчета среднего значения, медианы распределения, стандартного отклонения и 95% доверительного интервала. Вторая программа использовалась для определения статистической достоверности отличия полученных долей мутантных генотипов в исследуемых группах. Для оценки использовался односторонний критерий Фишера, уровень статистической значимости был определен как 0,05.

Сбор и обработку эпидемиологических данных, проводили совместно с заведующим лабораторией Пермского областного центра по профилактике и борьбе со СПИДом кандидатом медицинских наук С.Я.Зверевым и врачом лаборатории Ю.И-Аликиной. Выявление факторов риска, возможных мест заражения, а также эпидемиологических связей между ВИЧ-инфицированными проводили на основе опроса пациентов при сборе эпидемиологического анамнеза. Во время исследования

проводилась регистрация всех случаев ВИЧ-инфекции, выявленных в г.Лысьва, с указанием Ф.И.О., даты рождения, пола, места жительства, причин обследования, дат первого положительного результата на антитела к ВИЧ методом ИФА и иммуноблота, потенциального источника заражения, также фиксировались факторы риска заражения и сопутствующие заболевания (гепатиты В и С и др.). На основе полученных данных были составлены цепочки, отражающие эпидемиологические связи между пациентами.

1. Изучение вспышки ВИЧ-инфекции в г.Лысьва Пермской области

1.1. Эпидемиологическая характеристика вспышки ВИЧ-инфекции в г.Лысьва, среди лиц практикующих внутривенное введение психоактивных препаратов.

Нами была обнаружена и исследована вспышка ВИЧ-инфекции в городе Лысьва Пермской области. В результате проведенного эпидемиологического расследования был установлен первый ВИЧ-инфицированный житель города, им стал пациент № 62 (номера лиц с диагнозом "ВИЧ-инфекция" даны в порядке их регистрации на территории Пермской области), мужчина 1978 г. рождения. Предположительным местом инфицирования № 62 была Тверь, где он употреблял наркотики совместно с местными жителями в период службы в армии с ноября 1996 г. по ноябрь 1998 г. Одновременно с ним, по-видимому, заразился его сослуживец, выявленный 27 ноября 1998 г. под № 59. После прохождения воинской службы пациенты № 59 и № 62 возвратились в Лысьву, где пациент № 62, продолжая внутривенное употребление психоактивных веществ, явился источником инфекции еще для двух человек (пациенты № 77 и № 84). Далее эпидемия продолжала распространяться, и на начало июня 1999 г. количество ВИЧ-инфицированных в Лысьве составило 26 человек. Схема распространения эпидемии ВИЧ-инфекции на начало июня 1999 г. в г.Лысьва представлена на рисунке 1А. Поскольку до регистрации этих пациентов случаи ВИЧ-инфекции в г.Лысьва не выявлялись, по-видимому, все последующие случаи ВИЧ-инфекции были связаны между собой. Эпидемия ВИЧ-инфекции в городе продолжала развиваться, и в мае-июне 1999 г. было зарегистрировано максимальное количество ВИЧ-инфицированных. Затем в эпидемии наметился спад, а, начиная с апреля 2000 г., выявлялось уже не более одного инфицированного в месяц. Общее число ВИЧ-инфицированных в городе к 30 ноября 2000 г. составило 72 человека, из которых, по крайней мере, 60 были, по данным эпидемического расследования, инфицированы из одного источника. Схема распространения эпидемии, по данным на конец ноября 2000 г., представлена на рисунке 1Б.

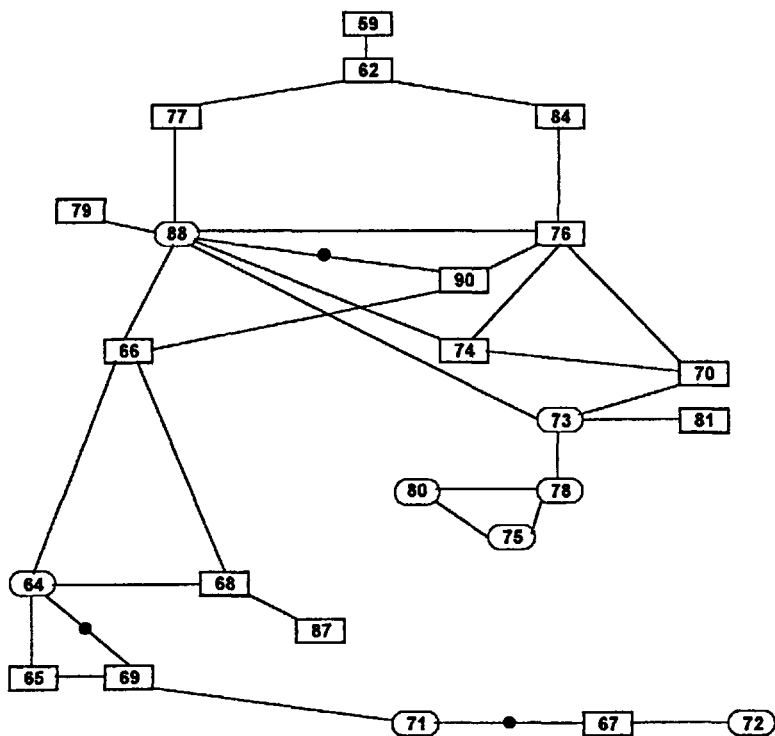


Рис. 1А. Схема распространения эпидемии ВИЧ-инфекции в г.Лысьва на начало июня 1999 г. ВИЧ-инфицированные.

○ - ВИЧ-инфицированная женщина

□ - ВИЧ-инфицированный мужчина

— - совместное употребление наркотиков

● - половые контакты

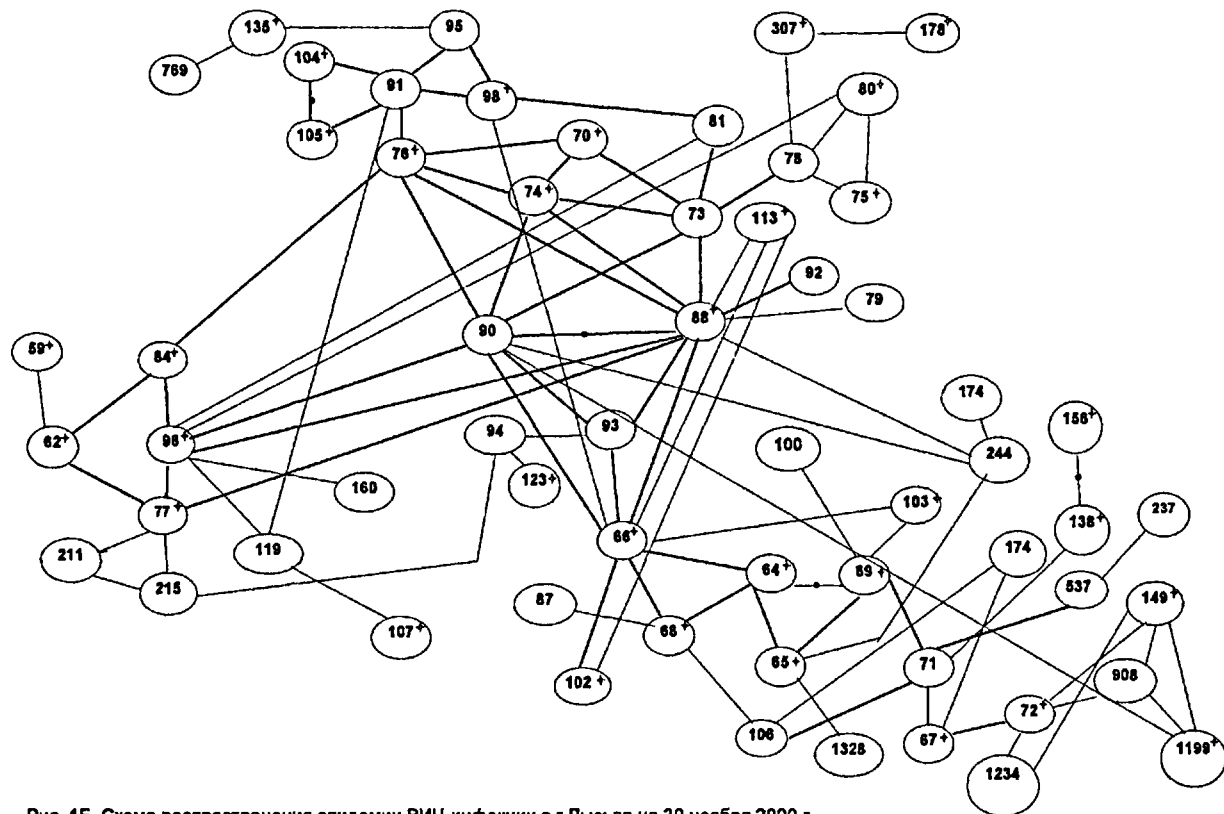


Рис 15 Схема распространения эпидемии ВИЧ-инфекции в г.Лысьва на 30 ноября 2000 г

- 59+ - номера на схеме обозначают ВИЧ - инфицированных, пронумерованных в порядке их регистрации на территории Пермской области
- - половые контакты
- - совместное употребление наркотиков
- † - помечены ВИЧ-инфицированные, от которых был получен клинический материал

1.2. Обнаружение и характеристика группы «контактных» наркоманов - наркоманов, неоднократно подвергавшихся риску заражения ВИЧ-1 парентеральным путем, но оставшихся серонегативными.

За весь период проведения исследования с 1999 г. по 2003 г. практически единственным психоактивным препаратом, употребляемым внутривенно в Лысьве, являлся кустарно изготавливаемый из маковой соломки жидкий опиат-содержащий наркотик, известный под названием "ханка". Употребление данного наркотического вещества представляет собой групповую акцию, сопряженную с высоким риском заражения при условии, что хотя бы один из ее участников вирусоноситель. Таким образом, все остальные потребители, кроме ВИЧ-позитивного, «контактировали» с ним и подвергались риску заражения. Лица, характеризующиеся таким риском заражения, но оставшиеся не инфицированными, составили группу «контактных» наркоманов. Под совместным употреблением наркотиков в данной работе подразумевается наличие хотя бы одного из перечисленных ниже факторов: а) использование группой потребителей наркотиков одного общего шприца или иглы для внутривенного введения наркотических веществ; б) распределение готовых для употребления наркотиков из общей емкости; в) промывание использованных шприцев в одной общей емкости с целью их дальнейшего применения; г) использование цельной крови для контроля качества (по отсутствию гемолиза) кустарно приготовленного раствора наркотика.

Схема, отражающая возможные эпидемиологические контакты, связанные с совместным употреблением психоактивных веществ, между ВИЧ-инфицированными и «контактными» наркоманами, по данным на начало июня 1999 г., представлена на рисунке 2. Рисунок представляет собой схему распространения эпидемии ВИЧ-инфекции в г.Лысьва (Рис. 1А), дополненную сведениями о 36 «контактных» наркоманах, принимавших психоактивные вещества совместно с ВИЧ-инфицированными, выявленных на начало июня 1999 г. (здесь и далее номера «контактных» наркоманов даны в соответствии с базой данных Пермского областного центра по профилактике и борьбе со СПИДом). По мере развития эпидемии ВИЧ-инфекции число «контактных» увеличивалось. Однако постепенно темпы вовлечения новых лиц в эпидемический процесс замедлились, и после августа 1999 г. появление новых лиц в группе «контактных» мы отмечали уже крайне редко. Дополнительно, параллельно с ростом числа «контактных» наркоманов, с июля 1999 г. начался обратный процесс: группа «контактных» наркоманов начала сокращаться за счет того, что некоторые ее члены становились ВИЧ-инфицированными. Однако в начале 2000 г. ситуация окончательно стабилизировалась, и изменения в составе этой группы прекра-

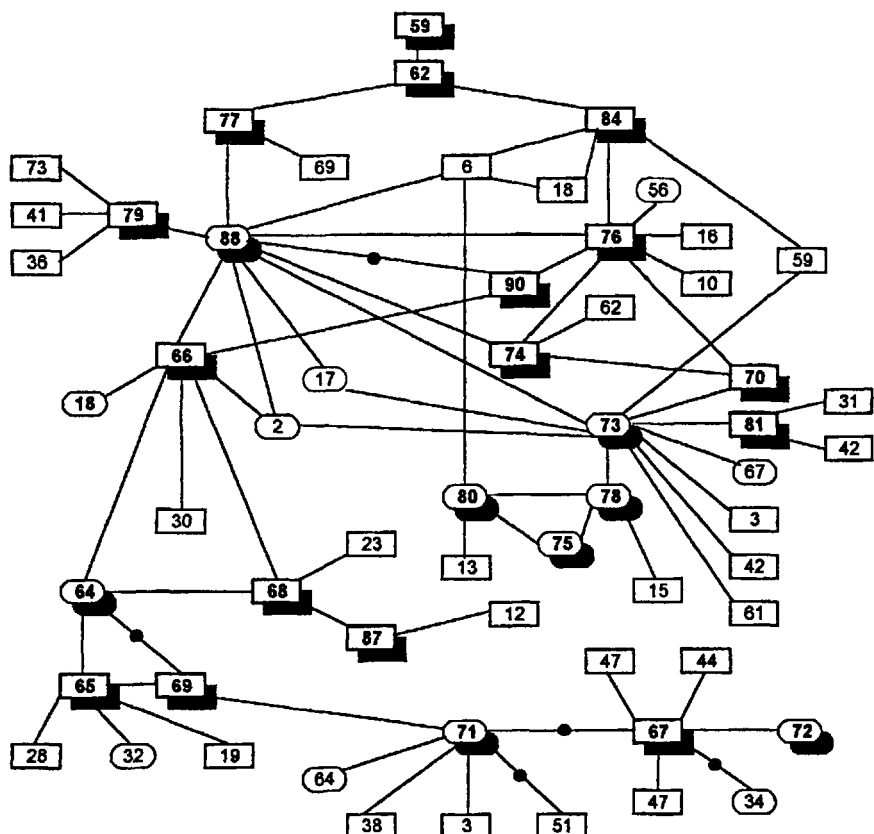
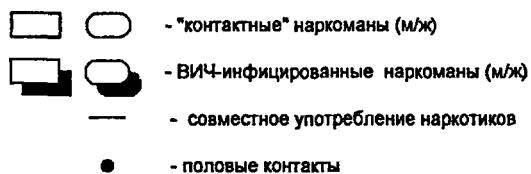


Рис. 2. Схема распространения эпидемии ВИЧ-инфекции в г.Лысьва на начало июня 1999г. ВИЧ-инфицированные и "контактные" наркоманы.



тились. Размер группы «контактных» на этот момент составил 75 человек. Начиная с этого момента, ни один член этой группы не был идентифицирован до настоящего времени как серопозитивный.

1.3. Формирование двух контрольных групп: группы ВИЧ-инфицированных и группы здоровых доноров.

В процессе работы нами было сформировано две контрольные группы ВИЧ-инфицированных и здоровых доноров. В группу ВИЧ-инфицированных вошли 114 человек, 38 из них было заражено в результате эпидемии ВИЧ-инфекции в г.Лысьва. Число ВИЧ-инфицированных наркоманов было увеличено за счет тех, кто был выявлен в других городах Пермской области (n=76) в период с 1996 г. по 1999 г. Группа, здоровых доноров была составлена из 186 человек, без хронических заболеваний и не находящихся в близком родстве.

2. Характеристика вируса, вызвавшего эпидемию в г.Лысьва -

2.1. Анализ сывороток, полученных от ВИЧ-инфицированных наркоманов г.Лысьва, методом иммуноферментного анализа.

Образцы сывороток были получены нами в период с 1999 г. по 2000 г. от 38 ВИЧ-инфицированных (26 мужчины и 12 женщин) - жителей г. Лысьва. Результаты анализа показали, что 33 из 38 сывороток (86,8%) принадлежали к серотипу А. Остальные 5 сывороток не реагировали ни с одним из двух пептидов. Поскольку в 1999-2000 гг. на территории России среди наркоманов циркулировали варианты ВИЧ-1, относящиеся только к двум подтипам гена env - А и В, которые легко дифференцируются с помощью УЗ-ИФА, можно было предположить, что вспышка ВИЧ-инфекции в г.Лысьва была вызвана вариантом ВИЧ-1 подтипа А.

2.2. Генотипирование образцов ДНК, полученных от ВИЧ-инфицированных наркоманов г.Лысьва, методом сравнительной оценки электрофоретической подвижности гетеродуплексов для генов env и gag.

Полученные данные серотипирования были подтверждены результатами анализа 21 образца (включая 5 не серотипированных образцов) с помощью метода сравнительной оценки электрофоретической подвижности гетеродуплексов для генов env и gag, как описано в Материалах и методах. Исследования показали, что все исследуемые образцы вируса имели генотип gagA/envA. Так же необходимо отметить, что среди исследованных образцов пять было получено от пациентов, для которых не

была установлена эпидемиологическая связь с основной вспышкой (№№ 82, 83, 97, 99, 299), однако все они также обладали генотипом gagA/envA.

2.3. Анализ первичной структуры областей гена gag, кодирующих участок белка p24, вариантов ВИЧ-1, выделенных в г.Лысьва.

Для пяти ВИЧ-инфицированных обнаруженных в г.Лысьва (№№ 59, 74, 76, 80 и 88), нами был проведен анализ первичной структуры областей гена gag с координатами 1373-1861 (координаты приведены для нуклеотидной последовательности гена gag ВИЧ-1 штамма HXB2). Данный участок, содержит 489 нуклеотидов и кодирует внутреннюю последовательность белка p24 с 64 по 225 аминокислоту.

Нами было проведено сравнение исследуемых нуклеотидных последовательностей гена gag между собой и с контрольными последовательностями, выделенными от наркоманов, зараженных российским вариантом вируса gag-подтипа А, выявленными на территории Белоруссии (г.Могилев) - AF414006, Украины (г.Спее) - AF413987 и России - AF193277 (г.Калининград), а так же с образцами подтипа А, выделенными из Кении - A_KE.Q2317 и Сенегала - A_SE.SE8131. Также при сравнении использовался образец B_US.DH123, относящийся к подтипу В.

Исследования показали, что образцы № 74, 76, 80 полностью идентичны, № 88 отличается от них одной нуклеотидной заменой, а № 59 - двумя, генетическая вариабельность в пределах группы составила 0,24 (стандартное отклонение 0,21, 95% доверительный интервал располагается в промежутке от 0,09 до 0,39). Максимальное значение составило 0,6, минимальное - 0,0.

Далее группа нуклеотидных последовательностей, полученных из Лысьвы, сравнивалась с группой контрольных последовательностей образцов вируса gag-подтипа А (AF414006, AF413987, AF193277), выделенных ранее от наркоманов на территории СНГ. Среднее значение генетической вариабельности между этими двумя группами нуклеотидных последовательностей 1,00, что достоверно указывает ($p=0,01$) на то, что эпидемия ВИЧ-инфекции в Лысьве вызвана ВИЧ-1 подтипа А, характерным для Восточной Европы. Для сравнения, среднее значение генетической изменчивости между лысьвинскими последовательностями и вариантами ВИЧ-1 подтипа А из Кении и Сенегала составило 8,10.

Эти данные подтверждаются результатами филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей, представленными на рисунке 3. Видно, что нуклеотидные последовательности гена gag, выявленные у наркоманов Лысьвы, в 1000 независимых построениях из 1000 образуют общую ветвь с ранее опубликованными

нуклеотидными последовательностями вариантов ВИЧ-1 подтипа А, выделенными в странах СНГ.

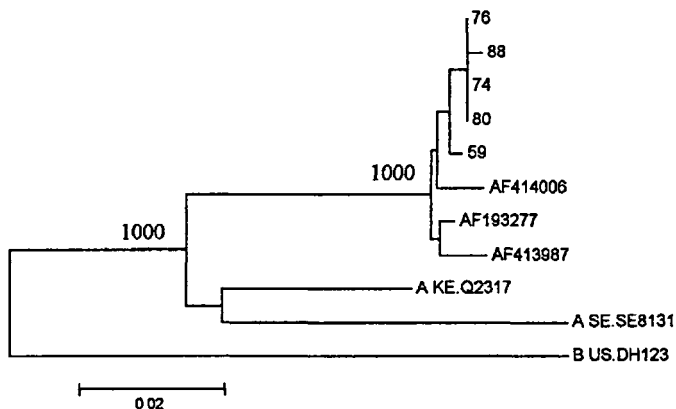


Рис. 3. Сравнение нуклеотидных последовательностей областей гена gag, кодирующих участок белка p24. Цифрами на ветви указано число независимых построений из 1000, при которых данные последовательности оказывались на одной ветви филогенетического дерева; приведены значения, превышающие 950. Анализ проводился с помощью метода ближайших соседей из пакета Mega 2.

Аминокислотные последовательности гена gag, кодирующие участок белка p24, представлены на рисунке 4. Результаты анализа показывают высокую степень гомогенности исследованных образцов, принадлежащих к подтипу А. Было обнаружено всего две аминокислотные замены: в образце № 88 аланин заменен на валин в положении 77, а в образце № 59 пролин была заменен на серию в положении 206.

Таким образом, на основании серологического анализа и генотипирования образцов нами было установлено, что эпидемия ВИЧ-инфекции в Лысьве была вызвана вирусом подтипа А. Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что вирус, вызвавший данную вспышку, представляет собой вариант подтипа А, выявленный ранее в этой группе риска в нашей стране, а также в других странах СНГ.

```

Consensus  A: AAMQMLKDTINEEAAEWDRLHPVHAGPIPPGQMREPRGSDIAGTTSTPQEQIGWMTGNPPIPVGDIYKRWIILGLNKIVRM
Cons. IUDs A: -----AQ---F-----S-----
59: -----AQ---F-----S-----
74: -----AQ---F-----S-----
76: -----AQ---F-----S-----
80: -----AQ---F-----S-----
88: -----V-----AQ---F-----S-----

Consensus  A: YSPVSILDIKQGPKEPFRDYVDRFFKTLRAEQATQDVKNWMTETLLVQNANPDCKSILRALGAGATLEEMMTACQGVGGPG
Cons. IUDs A: -----R-----T-----P-----
59: -----R-----T-----S-----
74: -----R-----T-----P-----
76: -----R-----T-----P-----
80: -----R-----T-----P-----
88: -----R-----T-----P-----

```

Рис. 3. Аминокислотные последовательности области гена gag, кодирующей участок белка р24, обнаруженные в образцах №№ 59, 74, 76, 80 и 88 ВИЧ-инфицированных наркоманов г.Льсва. Приведен консенсусный вариант подтипа А и консенсусный вариант IDU-A созданный на основе последовательностей, ранее выделенных от наркоманов, зараженных российским вариантом вируса gag-подтип А (AF414006, AF413987 и AF193277).

3. Изучение распространения мутантных аллелей генов CCR2, CCR5 и SDF1 среди группы здоровых доноров

На первом этапе генетических исследований было необходимо выяснить распространенность мутантных аллелей **CCR5Δ32**, **CCR2-64I**, **SDF1-3'A** и полиморфизма **CCR5-59029A/G** в контрольной группе здоровых доноров (**n=186**). Полученные значения представлены в таблице 1, для каждого значения рассчитан 95% доверительный интервал.

Таблица 1. Частоты встречаемости мутаций **CCR5Δ32**, **CCR2-64I**, **SDF1-3'A** и полиморфного варианта CCR5-59029G в группе здоровых доноров.

Мутации (количество проанализированных образцов)	Частота встречаемости мутации	95% доверительный интервал
CCR5Δ32 (n=180)	0,100	±0,031
CCR5-59029G (n=175)	0,400	±0,051
CCR2-64I (n=176)	0,119	±0,034
SDF1-3'A (n=162)	0,204	±0,044

Примечание. n - объем выборки.

Следующим изученным параметром было распределение аллельных состояний мутаций **CCR5Δ32**, **CCR2-64I**, **SDF1-3'A** и полиморфизма **CCR5-59029A/G**. Полученные значения представлены в таблице 4 (вместе со значениями, полученными для двух других исследуемых групп). Как видно из таблицы, в группе здоровых доноров представлены все аллельные состояния изученных нами мутаций.

Поскольку гены CCR2 и CCR5 располагаются на хромосоме в непосредственной близости один от другого (8 тпн.), мутации **CCR5Δ32**, **CCR2-64I** и полиморфный вариант **CCR5-59029A/G** образуют сочетания и определенным образом сцеплены между собой, образуя четыре гаплотипа: 1) мутация **CCR5Δ32** на фоне полиморфного варианта CCR5-59029A (далее обозначаемый как R5A) 2) мутация CCR2-64I на фоне полиморфного варианта CCR5-59029A (R2A) 3) отсутствие мутаций **CCR5Δ32** и CCR2-64I на фоне полиморфного варианта CCR5-59029A (R0A) 4) отсутствие мутаций

CCR5Δ32 и **CCR2-64I** на фоне полиморфного варианта **CCR5-59029G (R0G)**. Так гомозиготное состояние мутации **CCR5Δ32** является гаплотипом R5A, располагающимся на двух хромосомах (обозначается далее как R5A/R5A). Распределение гаплотипов, полученное в группе здоровых доноров, представлено в таблице 2.

Таблица 2. Распределение гаплотипов образованных мутациями **CCR5Δ32**, **CCR2-64I** и полиморфизмом **CCR5-59029A/G** в группе здоровых доноров.

Гаплотипы	Здоровые доноры	Процентное содержание
R0A/R0A	24	13,7%
R0A/R0G	52	29,7%
R0G/R0G	27	15,4%
R5A/R0A	15	8,6%
R5A/R0G	16	9,1%
R2A/R0A	20*	11,4%
R2A/R0G	18	10,3%
R5A/R2A	2	1,1%
R5A/R5A	1	0,6%
Общее количество	N= 175	100%

Примечание п - объем выборки.

* - один человек из двадцати обладает генотипом R2A/R2A (т.е. мутацией **CCR2-64I** в гомозиготном состоянии).

Таким образом, нами были получены данные о частотах встречаемости и распределениях аллельных состояний мутаций **CCR5Δ32**, **CCR2-64I**, **SDF1-3'A** и полиморфного варианта **CCR5-59029A/G** в группе здоровых доноров. Анализ показал,

что полученные значения не демонстрируют существенных отличий от аналогичных значений, полученных для белого населения Европы и США (Dean et al., 1996; McDermott et al., 1998; Samson et. al., 1996; Smith et al., 1997; Winkler et al., 1998). Также было исследовано распределение гаплотипов, образованных мутациями **CCR5Δ32** и **CCR2-64I** и полиморфизмом **CCR5-59029A/G** в группе здоровых доноров. Частоты, определенные для тех гаплотипов, которые, можно было сопоставить с ранее опубликованными данными, также существенно не отличались от соответствующих цифр, полученных для людей европеоидной расы в Европе и США (Gonzalez et al., 1999).

4. Сравнение распределений мутантных аллелей генов CCR2, CCR5 и SDF1 в группах ВИЧ-инфицированных, здоровых доноров и «контактных» наркоманов.

Как было указано выше, нами были описаны и генетически охарактеризованы следующие группы: группа ВИЧ-инфицированных (n=114), группа здоровых доноров (n=186) и группа «контактных» наркоманов (n=75). Сравнение частот встречаемости аллелей в исследуемых группах приведено в Таблице 3.

Таблица 3. Частоты встречаемости мутаций **CCR5Δ32**, **CCR2-64I**, **SDF1-3'A** и полиморфного варианта **CCR5-59029G** в группах ВИЧ-инфицированных, здоровых доноров и «контактных» наркоманов.

Мутации	Частота встречаемости мутации (95% доверительный интервал)		
	ВИЧ-инфицированные	Здоровые доноры	«Контактные» наркоманы
CCR5Δ32	0,104 (±0,042)	0,100 (±0,031)	0,144 (±0,057)
CCR5-59029G	0,394 (±0,07)	0,400 (±0,051)	0,300 (±0,077)
CCR2-64I	0,114 (±0,046)	0,119 (±0,034)	0,121 (±0,053)
SDF1-3'A	0,176 (±0,063)	0,204 (±0,044)	0,178 (±0,064)

Как следует из данных таблицы, значения частот распространения мутантных аллелей **CCR2-64I**, **SDF1-3'A** и варианта **CCR5-59029G** для всех исследованных групп,

практически одинаковы. Ни одно из отличий не является достоверным ($p > 0,5$, во всех случаях).

Следующим изученным параметром было распределение аллельных состояний мутаций **CCR5Δ32**, **CCR2-64I**, **SDF1-3'A** и полиморфизма **CCR5-59029A/G** в исследуемых группах. Полученные значения представлены в таблице 4. Как следует из данных таблицы, процентные соотношения гетерозиготных аллельных состояний и состояний «дикого типа», варьируют незначительно. Ни одно из отличий не является достоверным ($p > 0,5$, во всех случаях). Дальнейший анализ данных показывает, что статистически достоверными являются только отличия по количеству носителей гомозиготных состояний аллеля **CCR5Δ32**. Данные, характеризующие степень отличия, между разными исследуемыми группами приведены в таблице 5.

Таблица 5. Сравнение числа обладателей гомозиготного **CCR5Δ32** генотипа в группах ВИЧ-инфицированных, здоровых доноров и группы «контактных» наркоманов.

Сравниваемые группы	ВИЧ-инфицированные (n=101)	Здоровые доноры (n=180)	«Контактные» наркоманы (n=73)
ВИЧ-инфицированные (n=101)			
Здоровые доноры (n=180)	0(0%)/1(0,6%) p=0,64		—
«Контактные» наркоманы (n=73)	0(0%)/4(5,5%) p=0,029	1(0,6%)/4(5,5%) p=0,025	

Примечание. Оценивается достоверность разницы числа обладателей гомозиготного генотипа **CCR5Δ32** в исследуемых группах. В каждой ячейке таблицы количества обладателей гомозиготного генотипа **CCR5Δ32** в группах соотнесены друг с другом как **A(%) / B(%)** (где А и В - абсолютные значения лиц - носителей соответствующего аллельного состояния в группах по вертикали и горизонтали, соответственно), на следующей строке дано значение p по критерию Фишера, **n** - объем выборки.

Таблица 4. Аллельные состояния CCR5Δ32, CCR2-64I, SDF1-3'A мутаций и полиморфизма CCR5-59029A/G в группах ВИЧ-инфицированных, здоровых доноров и «контактных» наркоманов.

Мутация	Дикий тип*			Гетерозигота			Гомозигота		
	ВИЧ-инфицированные	Здоровые доноры	«Контактные» наркоманы	ВИЧ-инфицированные	Здоровые доноры	«Контактные» наркоманы	ВИЧ-инфицированные	Здоровые доноры	«Контактные» наркоманы
CCR5Δ32	80 (79,8%)	145 (80,6%)	56 (76,7%)	21 (20,8%)	34 (18,9%)	13 (17,8%)	0	1 (0,6%)	4 (5,5%)
CCR5-59029A/G	35 (36,8%)	62 (35,4%)	33 (47,8%)	45 (47,4%)	86 (49,1%)	30 (43,5%)	15 (15,8%)	27 (15,4%)	6 (8,7%)
CCR2-64I	73 (79,3%)	135 (76,7%)	50 (75,8%)	17 (18,5%)	40 (22,7%)	16 (24,2%)	2 (2,2%)	1 (0,6%)	0
SDF1-3'A	46 (64,8%)	99 (61,1%)	45 (64,3%)	25 (35,2%)	60 (37%)	25 (35,7%)	0	3 (1,9%)	0

Примечание.

* - Под диким типом в случае полиморфизма CCR5-59029A/G подразумевается генотип CCR5-59029A/CCR5-59029A обозначаемый как «аа».

Как следует из данных таблицы, полученные различия для обладателей гомозиготных состояний аллеля **CCR5Δ32** в группе «контактных» наркоманов и остальных исследуемых групп статистически достоверны. Это означает, что гомозиготный CCR5Δ32 генотип действительно обладает протективными свойствами при передаче ВИЧ-1

Помимо частот встречаемости мутаций **CCR5Δ32**, **CCR2-64I**, **SDF1-3'A** и полиморфизма CCR5-59029A/G и аллельных состояний, нами были рассмотрены гаплотипы, образованные сочетаниями аллелей **CCR5Δ32** и **CCR2-64I** с полиморфизмом CCR5-59029A/G. Данные об обнаруженных гаплотипах представлены в таблице 6

Таблица 6. Распределение гаплотипов образованных мутациями **CCR5Δ32**, **CCR2-64I** и полиморфизмом CCR5-59029A/G в группах ВИЧ-инфицированных, здоровых доноров и «контактных» наркоманов

Гаплотипы	ВИЧ-инфицированные	Здоровые доноры	«Контактные» наркоманы
R0A/R0A	14 (15,7%)	24 (13,7%)	12 (18,5%)
R0A/R0G	23 (25,8%)	52 (29,7%)	20 (30,8%)
R0G/R0G	15 (16,9%)	27 (15,4%)	6 (9,2%)
R5A/R0A	9 (10,1%)	15 (8,6%)	3 (4,6%)
R5A/R0G	8 (9%)	16 (9,1%)	4 (6,1%)
R2A/R0A	10** (11%)	20* (11,4%)	6 (9,2%)
R2A/R0G	10 (11%)	18 (10,3%)	6 (9,2%)
R5A/R2A	0	2 (1,1%)	4 (6,1%)
R5A/R5A	0	1 (0,6%)	4 (6,1%)
Общее количество	N=89	N= 175	N= 65

Примечание n - объем выборки, * и ** - один и два человека обладают гаплотипом R2A/R2A (т.е. мутацией CCR2-64I в гомозиготном состоянии)

Как видно из данных таблицы, некоторые процентные соотношения варьируют в исследуемых группах достаточно сильно. Однако при поиске сочетания, обладающего протективными свойствами, мы должны учитывать, что его частота в ряду от ВИЧ-инфицированных (группы, не выдержавшей отбора), через группу здоровых доноров (не подвергавшихся отбору) к группе всех «контактных» наркоманов (группа созданная отбором) должна расти. Именно такую картину мы видим в случае гомозиготного состояния мутации **CCR5Δ32**, которое отсутствует у ВИЧ-инфицированных, составляет 0,6 процента в группе здоровых доноров и достигает 5,5% в группе «контактных» (См. таблицы 4, 5). Однако дальнейший анализ представленных в таблице значений показывает, что существует еще одна комбинация мутантных аллелей, распределенная аналогичным образом. Это гаплотип R5A/R2A (совокупность мутаций **CCR5Δ32** и CCR2-64I в гетерозиготном состоянии на фоне полиморфного варианта CCR5-59029A/CCR5-59029A). Он отсутствует в группе ВИЧ-инфицированных, составляет 1,1 процента в группе здоровых доноров и достигает 6,1% в группе «контактных». Статистические значения, характеризующие степень отличия приведены в таблице 7.

Как следует из данных таблицы, полученные различия в частотах встречаемости гаплотипа R5A/R2A среди «контактных» наркоманов и остальных исследуемых группах, статистически достоверны. Это означает, что гаплотип R5A/R2A, включающий аллельные состояния **CCR5Δ32/CCR5** и **CCR2-64I/CCR2** на фоне полиморфного варианта CCR5-59029A/CCR5-59029A, действительно обладает протективными свойствами при передаче ВИЧ-1 парентеральным путем.

Таким образом, в данной главе нами были описаны и генетически охарактеризованы следующие группы: группа ВИЧ-инфицированных (**n=114**), группа здоровых доноров (**n=186**) и группа «контактных» наркоманов (**n=72**), неоднократно подвергавшихся риску заражения ВИЧ-1, но оставшихся не зараженными. В результате сравнения было обнаружено, что группа «контактных» наркоманов характеризуется высоким процентом гомозиготных состояний мутации **CCR5Δ32**, достигающем 5,5% в группе «контактных». Это означает, что гомозиготное состояние мутации **CCR5Δ32** действительно обладает протективными свойствами при передаче ВИЧ-1 парентеральным путем. Дальнейший генетический анализ группы «контактных» лиц позволил показать, что сочетание мутаций **CCR5Δ32** и **CCR2-64I** в гетерозиготном состоянии на фоне полиморфного варианта CCR5-59029A/CCR5-59029A (гаплотип R5A/R2A) также обладает протективными свойствами при передаче ВИЧ-1 парентеральным путем.

Таблица 7. Сравнение числа обладателей гаплотипа R5A/R2A (совокупность мутаций **CCR5Δ32** и **CCR2-64I** в гетерозиготном состоянии на фоне полиморфного варианта **CCR5-59029A/CCR5-59029A**) в группах ВИЧ-инфицированных, здоровых доноров и группы «контактных» наркоманов.

Сравниваемые группы	ВИЧ-инфицированные (n=89)	Здоровые доноры (n=173)	«Контактные» наркоманы (n=65)
ВИЧ-инфицированные (n=89)			
Здоровые доноры (n=173)	0(0%)/2(1,2%) p=0,43		
«Контактные» наркоманы (n=65)	0(0%)/4(6,2%) p=0,030	2(1,2%)/4(6,2%) p=0,049	

Примечание. В таблице оценивается статистическая достоверность разницы числа обладателей гаплотипа R5A/R2A в исследуемых группах В каждой ячейке таблицы количества обладателей гаплотипа R5A/R2A в группах соотнесены друг с другом как **A(%)**/**Б(%)** (где А и Б - абсолютные значения лиц - носителей соответствующего аллельного состояния в группах по вертикали и горизонтали, соответственно), на следующей строке дано значение p, рассчитанное по критерию Фишера, оценивающее достоверность различия обладателей гомозиготного генотипа в группах, **n** - объем выборки.

Обсуждение

Изученная нами эпидемия в г. Лысьва является примером вспышки ВИЧ-инфекции, возникшей из одного источника и вызванной попаданием вируса в среду наркоманов, внутривенно употребляющих психоактивные вещества. Как показали наши исследования, ее вызвал российский вариант вируса подтипа А. В пользу этого говорят как данные серотипирования, так и результаты анализа, полученные с помощью метода сравнительной оценки электрофоретической подвижности

гетеродуплексов для генов *env* и *gag*. Результаты прямого определения нуклеотидной последовательности области *p24* гена *gag* также подтвердили эти данные и показали высокую степень генетической гомогенности вируса внутри группы лысьвенских образцов (генетическая вариабельность составила 0,24, стандартное отклонение 0,21). По данным эпидемиологического расследования, все ВИЧ-инфицированные, обнаруженные в г.Лысьва являлись наркоманами, заразившимися в результате внутривенного приема психоактивных препаратов.

Важнейшим и необходимым моментом работы было обнаружение среди наркоманов г.Лысьва, группы лиц, неоднократно подвергавшихся риску заражения ВИЧ-1, но оставшихся не заразившимися - «контактная» группа (**n=75**). В эту группу входили наркоманы, неоднократно употреблявшие психоактивные вещества совместно с ВИЧ-инфицированными. Правомочность выделения подобной группы, как устойчивой к заражению ВИЧ-1, была подтверждена в дальнейшем генетическим анализом. Так в работах, проведенных предыдущими исследователями, сообщалось, что важным фактором, свидетельствующим о том, что члены группы действительно подвергались риску заражения и их устойчивость может быть объяснена генетическими факторами, является высокое процентное содержание людей - обладателей гомозиготного состояния мутации **CCR5Δ32** (обычно от 4 до 15%; Dean et al., 1996; Salkowitz et al, 2001; Gonzalez et al., 1999). Таким образом, обнаруженный высокий процент гомозиготных состояний мутации **CCR5Δ32**, обнаруженный в группе «контактных» наркоманов (5,5%), подтверждают результаты эпидемиологических наблюдений и показывают, что члены этой группы действительно подвергались высокому риску заражения ВИЧ-1.

На следующем этапе исследований для изучения протективной роли мутаций **CCR5Δ32**, **CCR2-64I** и **SDF1-3'A**, а так же полиморфного варианта **CCR5-59029A/G** необходимо было провести сравнение полученных результатов с контрольными группами ВИЧ-инфицированных и здоровых доноров. Однако на момент исследования данные о распространении мутаций **CCR2-64I**, **SDF1-3'A** и полиморфного варианта **CCR5-59029A/G** в России отсутствовали, сведения имелись только по частоте встречаемости мутантного аллеля **CCR5A32** (Асеев и др., 1997; Галеева и др., 1998; Соломинский и др., 1997; Казеннова и др., 1998; Шадрина и др., 2000; Voevodin et al., 1998; Yudin et al., 1998).

Нами было исследована группа, состоящая из 186 здоровых доноров (**n=186**), полученные данные о частотах аллелей **CCR5Δ32**, **CCR2-64I**, **SDF1-3'A** и **CCR5-59029G** мы сравнили с аналогичными данными, полученными ранее. Частота встречаемости

мутации **CCR5Δ32** составила 0,100 (95% доверительный интервал $\pm 0,031$), что соответствует частотам, полученным ранее на территории Российской Федерации. Ближайшее значение было получено для жителей Москвы (0,095, $p=0,57$) (Казеннова и др., 1998), частоты, полученные для остальных регионов России, чуть выше и располагаются в промежутке от 0,11 до 0,13 (Асеев и др., 1997; Соломинский и др., 1997; Voevodin et al., 1998; Yudin et al., 1998). Полученная нами частота также сходна ($p>0,5$) с аналогичными значениями, рассчитанными для белого населения Европы и США (0,092,) (Samson et al., 1996) Частота встречаемости аллеля CCR2-64I составила 0,119 (95% ДИ $\pm 0,034$). Это значение так же близко ($p>0,5$) к данным, полученным для белого населения США (Smith et al., 1997). С другой стороны полученное значение несколько выше аналогичного значения полученного для Дании (0,06, $p=0,15$) (Eugen-Olsen et al., 1998), и Бельгии (0,074, $p=0,11$) (Struyf et al., 2000). Однако для Греции частота мутации CCR2-64I составила (0,146, $p=0,10$) (Papa et al., 2000), что превосходит полученное нами значение. Частота мутации в гене SDF1 составила 0,204 (95% ДИ $\pm 0,044$), что практически аналогично ($p=0,95$) данным, полученным для белого населения США (0,211) (Winkler et al., 1998). Частота встречаемости полиморфного варианта CCR5-59029G составила 0,4 (95% ДИ $\pm 0,051$), что так же идентично ($p>0,5$) рассчитанным ранее для белого населения США (0,43) (McDermott et al., 1998). Таким образом, данные о частотах встречаемости аллелей **CCR5Δ32**, **CCR2-64I**, **SDF1-3'A** и CCR5-59029G не показывают существенных отличий от значений, полученных ранее для представителей европеоидной расы в США и некоторых странах Европы.

В результате анализа распределения мутаций в группах ВИЧ-инфицированных (**n=114**), здоровых доноров (**n=186**) и «контактных» наркоманов (**n=75**) было установлено, что статистически достоверными в исследуемых группах являются только отличия по количеству носителей гомозиготных состояний аллеля **CCR5Δ32** (гашютип R5A/R5A). Данный генотип отсутствует, как и следовало ожидать, у ВИЧ-инфицированных, составляет 0,6 процента в группе здоровых доноров и достигает 5,5% в группе «контактных». Достоверность имеющихся различий составила $p=0,029$ и $p=0,025$ при сравнении всей группы «контактных» наркоманов с группами ВИЧ-инфицированных и здоровых доноров (См. таблицу 5).

Как было указано ранее, в работах других исследователей уже отмечалось, что генотип **CCR5Δ32/CCR5Δ32** сообщает устойчивость к заражению ВИЧ-1, однако эти данные были получены для полового пути передачи вируса (Dean et al., 1996). Парентеральный путь заражения изучался при анализе только групп людей, которым была перелита контаминированная вирусом кровь или ее отдельные продукты (Dean et

al. 1996; Salkowitz et al., 2001). Данные о протективной роли этого генотипа при передаче вируса при совместном приеме психоактивных препаратов внутривенно, через контаминированный раствор наркотика или оборудования для его изготовления или употребления, в литературе отсутствовали. Полученные нами данные показывают, что гомозиготный **CCR5Δ32** генотип действительно обладает протективными свойствами при передаче ВИЧ-1 парентеральным путем.

Далее нами был проведен анализ гаплотипов, образованных сочетаниями мутаций **CCR5Δ32** и **CCR2-64I** с **CCR5-59029A/G** полиморфизмом, в исследуемых группах. Оказалось, что гаплотип R5A/R2A (совокупность мутаций **CCR5Δ32** и **CCR2-64I** в гетерозиготном состоянии на фоне полиморфного варианта **CCR5-59029A/CCR5-59029A**), демонстрирует- распределение, сходное с распределением гомозиготного состояния аллеля CCR5Δ32, снижающего вероятность заражения ВИЧ-1. Так гаплотип R5A/R2A отсутствовал в группе ВИЧ-инфицированных, составлял 1,1 процента в группе здоровых доноров и достигал 6,1% в группе «контактных». Достоверность имеющихся различий составила $p=0,030$ и $p=0,049$ при сравнении всей группы «контактных» наркоманов с группами ВИЧ-инфицированных и здоровых доноров (См. таблицу 7).

Как следует из данных таблицы, полученные различия в частотах встречаемости гаплотипа R5A/R2A среди «контактных» наркоманов и остальных исследуемых группах статистически достоверны. Это означает, что сочетание мутаций **CCR5Δ32** и **CCR2-64I** в гетерозиготном состоянии на фоне полиморфного варианта **CCR5-59029A/CCR5-59029A** (гаплотип R5A/R2A) действительно обладает протективными свойствами при передаче ВИЧ-1 парентеральным путем.

Полученные данные о протективной роли гомозиготного состояния аллеля **CCR5Δ32** и сочетаний мутантных аллелей **CCR5Δ32** и **CCR2-64I** в гетерозиготном состоянии на фоне полиморфного варианта **CCR5-59029A/CCR5-59029A** могут использоваться при оценке генетической устойчивости популяции при передаче ВИЧ-1 парентеральным путем. Это особенно важно в условиях эпидемии ВИЧ-1-инфекции на территории Российской Федерации, где основным фактором риска заражения в настоящее время является практика внутривенного применения психоактивных препаратов.

Выводы

1. Частота встречаемости аллелей **CCR5Δ32, CCR2-64I, SDF1-3'A и CCR5-59029G** среди здоровых доноров составляет 0,100 (95% доверительный интервал **±0,031), 0,119 (±0,034), 0,204 (±0,044) и 0,400 (±0,051)**, соответственно.
2. Вспышка ВИЧ-инфекции в гЛысьва среди лиц, практикующих внутривенное применение психоактивных препаратов, возникла из одного источника и была вызвана вариантом ВИЧ-1 подтипа А, характерным для этой группы риска в России.
3. Выявлена и охарактеризована для длительного наблюдения группа лиц (**n=75**), подвергавшихся риску заражения ВИЧ-1 парентеральным путем, но оставшихся не инфицированными.
4. Генотип **CCR5Δ32/CCR5Δ32** сообщает высокий уровень устойчивости к заражению ВИЧ-1 подтипа А при парентеральном пути передачи.
5. Частота встречаемости сочетания мутаций **CCR5Δ32 и CCR2-64I** в гетерозиготном состоянии в группе «контактных» лиц была достоверно выше по сравнению с двумя контрольными группами здоровых доноров и ВИЧ-инфицированных наркоманов (**p=0,049 и p=0,030, соответственно**), что свидетельствует о протективном эффекте данного сочетания мутаций при заражении ВИЧ-1 подтипа А при парентеральном пути передачи.

Список публикаций по теме диссертации

1. Ryabov GS, Kazennova EV, Zverev SYa, Bobkov AF, Pokrovsky W, Weber JN. The homozygous CCR5Δ32 genotype accounts for high resistance of some injecting drug users (IDUs) to HTV-1 infectioa **XVIII European conferens on clinical aspects and treatment ofHTV infection**. Athens, Greece, 28-31 October 2001. Abstract P31.
2. Рябов Г.С., Казеннова Е.В., Зверев СЯ., Покровский В.В., Бобков А.Ф. Генетический полиморфизм и ВИЧ-инфекция: генотип **CCR5Δ32/CCR5Δ32** обеспечивает высокий уровень устойчивости при парентеральной передаче вируса. **Тезисы научно-практической конференции- "ВИЧ-инфекция и вирусные гепатиты с парентеральным механизмом заражения: Эпидемиология, Профилактика, Диагностика, Клиника, Лечение"**. 13-15 ноября 2001 года, Суздаль.

3. Г.С.Рябов, Е.В.Казеннова, А.Ф. Бобков. Частота встречаемости аллелей CCR2-64I и SDF1-3'A, влияющих на развитие симптомов при ВИЧ-инфекции, среди жителей п.Москвы. **Генетика** (2002), 2:278-280.
4. Г.С.Рябов, Е.В.Казеннова, Л.Б.Корепанова, Е.А-Мальцева, В.В.Жалнин, Л.А-Красникова, С.Я.Зверев, В.В.Покровский, А.Ф.Бобков, Д.Н.Вебер. Изучение вспышки ВИЧ-инфекции в городе Лысьва Пермской области: гомозиготный генотип CCR5A32/CCR5A32 обеспечивает высокий уровень устойчивости при парентеральной передаче вируса. **Вопросы вирусологии** (2002), 4:13-16.
5. А.Ф.Бобков, Е.В.Казеннова, Л.М.Селимова, Т.А.Ханина, К.Н.Ладная, М.Р.Бобкова, А.В.Кравченко, Г.С.Рябов, А.Л.Суханова, Е.В.Буравцова, В.В.Покровский, Д.Н.Вебер. Молекулярно-вирусологические особенности эпидемии ВИЧ-инфекции в России и других странах СНГ. **Вестник РАМН** (2003), 16:83-85.

Издательство ООО "МАКС Пресс".
Лицензия ИД № 00510 от 01.12.99 г.
Подписано к печати 26.01.2004 г.
Формат 60х90 1/16. Усл.печ.л. 1,75. Тираж 90 экз. Заказ 116.
Тел. 939-3890, 939-3891, 928-1042. Тел./Факс 939-3891.
119992, ГСП-2, Москва,
Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова.

№ - 2133

РНБ Русский фонд

2004-4
27454