

На правах рукописи



СУХАНОВА Анна Львовна

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНА *POL*
ВАРИАНТОВ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА
ЧЕЛОВЕКА ПЕРВОГО ТИПА (ВИЧ-1) ПОДТИПА А,
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РОССИИ**

03.00.03 – молекулярная биология

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

Москва 2006

Работа выполнена в лаборатории вирусов лейкозов ГУ НИИ вирусологии имени Д. И. Ивановского РАМН и специализированной научно-исследовательской лаборатории эпидемиологии и профилактики СПИД ФГУН Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ: доктор биологических наук, профессор
Алексей Филиппович Бобков

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАМН
Покровский Вадим Валентинович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: доктор медицинских наук
Мацевич Геннадий Рувимович
доктор биологических наук, профессор
Тарантул Вячеслав Залманович

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии
имени Н. Ф. Гамалея РАМН

Защита диссертации состоится 22 мая 2006 г в 12 часов на заседании Диссертационного совета Д 001 020 01 в Институте вирусологии имени Д. И. Ивановского РАМН по адресу: Москва 123098, ул. Гамалея, 16

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ вирусологии имени Д. И. Ивановского РАМН

Автореферат разослан апреля 2006 г

Ученый секретарь
Диссертационного совета
Доктор медицинских наук

Н. П. Косякова

2008 А
9604

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы Угроза, которую представляет инфекция вирусом иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) здоровью человечества, выражена тремя аспектами: неизбежностью летального исхода заболевания, глобальным масштабом эпидемии и отсутствием средств специфической профилактики инфекции. По данным Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИД, в России на 10.04.2006 официально зарегистрировано 354031 случаев ВИЧ-инфекции; ежегодно увеличивается количество больных и умирающих от СПИДа (Покровский и соавт., 2005). Единственным известным на сегодняшний день средством, препятствующим прогрессии заболевания, является комбинированная антиретровирусная (АРВ) терапия, которая заключается в одновременном применении нескольких ингибиторов вирусных ферментов – протеазы и/или обратной транскриптазы (ОТ). Однако, основная проблема, осложняющая этиотропную терапию ВИЧ-инфекции, заключается в устойчивости, или резистентности, вируса к действию лекарственных средств. Резистентные варианты вируса чаще всего возникают в популяции *de novo* как результат неоптимального подбора АРВ-препаратов или нарушения режима их приема, однако известны и случаи заражения устойчивыми штаммами ВИЧ-1 (Lukashov et al., 2000; Ammaranond et al., 2003). В условиях ограниченного доступа к лекарственным средствам, характерным для России в переходный период, вопрос о резистентности ВИЧ не только не перестает быть актуальным, но и приобретает особое значение. Монотерапия или битерапия с использованием ингибиторов вирусных ферментов может приводить к более быстрому развитию устойчивых вариантов ВИЧ, которые, передаваясь как вертикально, так и горизонтально, способны вызывать новые случаи инфекции. Очевидно, таким образом, что для широкомасштабного внедрения АРВ-терапии в стране необходима информация об уровне лекарственной устойчивости в популяции циркулирующих вариантов вируса, т.е. среди ВИЧ-инфицированных лиц, не употреблявших АРВ-препараты.

Основным способом анализа лекарственной устойчивости ВИЧ-1 является генотипирование, или выявление мутаций в геноме вируса, ответственных за ее развитие. Подавляющее большинство мутаций устойчивости ВИЧ-1 локализуется в области гена *pol*, кодирующей протеазу и первые 240 аминокислотных остатков (ао) ОТ. Выделяют два вида мутаций устойчивости ВИЧ-1 – первичные и вторичные. Первичные мутации непосредственно вызывают снижение чувствительности вируса к АРВ.

препаратам, но при этом, как правило, ухудшают его репликативную способность. Вторичные мутации не влияют на уровень лекарственной устойчивости, но в большей или меньшей степени восстанавливают репликативную способность вируса, несущего первичные мутации (Quinones-Mateu and Arts, 2001). Если селекция первичных мутаций всегда является следствием воздействия лекарственных веществ и в большинстве случаев не зависит от генетического подтипа ВИЧ-1 (Kantor et al., 2005), то вторичные мутации могут появляться в геноме вируса спонтанно, а у некоторых подтипов ВИЧ-1 даже присутствовать постоянно как проявление генетического полиморфизма. Поэтому частота их встречаемости среди ВИЧ-инфицированных лиц, не употреблявших АРВ-препараты, может быть очень высокой и, как правило, зависит от генетического подтипа ВИЧ-1.

Необходимо отметить, что мутации устойчивости лучше всего изучены в геноме ВИЧ-1 генетического подтипа В, типичного для индустриально развитых стран. Это связано с тем, что именно в этих государствах в наиболее полном объеме обеспечивается лечение и мониторинг его эффективности у лиц, инфицированных ВИЧ-1. Однако, на территории России, как и многих других стран-бывших советских республик, в настоящее время доминирует ВИЧ-1 подтипа А (Bobkov et al., 2004; Vazquez de Parga et al., 2005). В 1996 г. этот вариант вируса, впоследствии названный IDU-A, проник в среду российских потребителей инъекционных наркотиков (ПИН), что вызвало быстрое распространение эпидемии по всей территории страны: сначала в этой группе риска, а затем и среди половых партнеров ПИН. К 2003 г. вариант IDU-A, по некоторым оценкам, вызвал 94% случаев ВИЧ-инфекции в России (Bobkov et al., 2004). Несмотря на это, область гена *pol* у него к началу настоящей работы, т.е. к 2003 г., оставалась неисследованной. Было опубликовано только восемь последовательностей гена *pol* IDU-A, но и они были выделены в Молдавии, Белоруссии, Украине (Pandrea et al., 2001; Liitsola et al., 2000; Masharsky et al., 2003). Вместе с тем, для правильной интерпретации результатов генотипирования лекарственной устойчивости необходима максимально полная информация о генетической изменчивости вариантов ВИЧ, циркулирующих в стране.

Цель и задачи работы. Цель исследования состояла в определении степени изменчивости гена *pol* и распространенности мутаций лекарственной устойчивости у инфицированных вариантами ВИЧ-1 подтипа А лиц в России, не принимавших АРВ-препараты, для оптимизации мониторинга и совершенствования терапии ВИЧ-инфекции в России. Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Определить нуклеотидные последовательности областей гена *pol*, кодирующих протеазу и обратную транскриптазу, и частоту встречаемости значащих мутаций гена *pol*, у инфицированных вариантами ВИЧ-1 подтипа А лиц в России, не принимавших АРВ-препараты к моменту забора крови

2. Оценить потенциальное влияние выявленных мутаций в гене *pol* на лекарственную устойчивость ВИЧ-1 и эффективность АРВ-терапии

3. Провести филогенетический анализ и определить степень генетической изменчивости областей гена *pol*, кодирующих протеазу и обратную транскриптазу, у исследуемых вариантов ВИЧ-1 подтипа А.

4. Охарактеризовать возможность применения методов молекулярной гибридизации на биологических микрочипах и рестрикционного анализа для различения вариантов ВИЧ-1 подтипа А, несущих мутации гена *pol*.

5. Оценить способность вариантов ВИЧ-1 подтипа А, несущих мутации гена *pol*, к передаче от человека к человеку

6. Изучить закономерности изменения частоты встречаемости основных вариантов ВИЧ-1, несущих мутации гена *pol*, на протяжении эпидемии ВИЧ-инфекции в разных регионах России в период времени с 1996 по 2005 гг

Научная новизна и практическая ценность работы

1. Показано, что варианты ВИЧ-1 подтипа А, циркулирующие в России среди потребителей инъекционных наркотиков и их половых партнеров, потенциально чувствительны к действию ингибиторов протеазы и ОТ. Эта информация позволяет избежать дорогостоящего тестирования лекарственной устойчивости ВИЧ-1 перед началом АРВ-терапии у пациентов из данных групп риска (если отсутствуют дополнительные указания на возможность инфицирования устойчивым штаммом ВИЧ-1 в конкретном случае)

2. Для вариантов ВИЧ-1 подтипа А, выделенных от не употреблявших АРВ-терапию людей, впервые показана высокая частота встречаемости мутаций гена *pol*, вызывающих аминокислотные замены V77→I, I93→L в протеазе и A62→V в ОТ и известных ранее для ВИЧ-1 подтипа В как вторичные мутации лекарственной устойчивости. Информация о высокой распространенности этих мутаций в России свидетельствует о необходимости корректировать алгоритмы интерпретации результатов генотипирования лекарственной устойчивости ВИЧ, проводимого в нашей стране у лиц, принимающих АРВ-терапию.

3. Впервые показано, что ВИЧ-1 IDU-A филогенетически гетерогенен. Это выражается в циркуляции (т.е. передаче от одних лиц другим) на территории России четырех вариантов этого вируса, различающихся наличием

или отсутствием мутаций V77→I в протеазе и/или A62→V в ОТ. К ним относятся три варианта, имеющие мутантные *pol*-генотипы Mut_{V77I/A62V}, Mut_{V77I}, Mut_{A62V}, и один, являющийся для них «родительским» штаммом дикого типа. Обнаружена монофилетическая природа вариантов Mut_{V77I/A62V} и Mut_{V77I}, распространенных в разных регионах России. *Pol*-генотип, таким образом, является эпидемиологическим маркером различных циркулирующих в России вариантов ВИЧ-1 подтипа А. В настоящей работе предложено определять *pol*-генотип, наряду с практиковавшимся ранее определением генетического подтипа ВИЧ-1, в целях эпидемиологических расследований. Для определения *pol*-генотипа показана возможность использования, помимо определения нуклеотидных последовательностей, одного из двух методов: молекулярной гибридизации на биологических микрочипах или рестрикционного анализа.

4. Показан низкий уровень изменчивости гена *pol* вариантов ВИЧ-1 IDU-А, а также обнаружены различия в характере генетической изменчивости области, кодирующей протеазу, и области, кодирующей ОТ. Информация о низкой гетерогенности этих областей генома вариантов ВИЧ-1 подтипа А, доминирующих на территории России, позволяет осуществить разработку новых генотипических тестов, в том числе, гибридизационных, адаптированных для выявления мутаций лекарственной устойчивости в геноме ВИЧ-1 подтипа А, а также для совершенствования методов молекулярной диагностики ВИЧ-инфекции. 27 нуклеотидных последовательностей области гена *pol* ВИЧ-1 подтипа А, кодирующей протеазу, депонированы в GenBank под номерами с AY618594 по AY618620. В целом, результаты работы могут служить научным обоснованием необходимости мониторинга лекарственной устойчивости ВИЧ-1 и способствовать внедрению средств такого мониторинга в клиническую практику.

Апробация работы Результаты исследований представлены на совместном заседании отдела молекулярной вирусологии и отдела общей вирусологии ГУ НИИ вирусологии имени Д.И. Ивановского РАМН (Москва, 2006, доклад), 5-ой Всероссийской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней» (Москва, 2004, доклад), Втором и Третьем Европейских семинарах «Лекарственная устойчивость ВИЧ от фундаментальной науки к клиническому значению» (Рим, Италия, 2004, и Афины, Греция, 2005, постеры), 15-ой Всемирной конференции по СПИД (Бангкок, Тайланд, 2004, доклад), 12-ом Международном семинаре по динамике и эволюции ВИЧ (Кливленд, США, 2005, постер), 10-ой Европейской конференции по СПИД (Дублин, Ирландия, 2005, постеры).

Публикации По теме диссертации опубликовано 18 научных работ

Структура диссертации Диссертация изложена на /27/ страницах машинописного текста, содержит /9/ рисунков, /17/ таблиц и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы из /63/ ссылок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объект и методы исследования

Исследовано 302 образца моноклеарных лейкоцитов периферической крови, полученных в период с 1996 по 2005 гг от лиц, которые были зарегистрированы с диагнозом «ВИЧ-инфекция» на территории 17 регионов России. На момент забора крови обследуемые лица никогда не принимали АРВ-препараты и находились на стадии III («латентной») ВИЧ-инфекции по Российской классификации ВИЧ-инфекции Покровского В И 2001 г. Возраст их варьировал от 0,5 года до 65 лет, а в среднем составлял 24 года $\pm$ 8 лет (стандартное отклонение). Соотношение полов было 164 (мужчины):134 (женщины). Основными факторами риска заражения ВИЧ-1 было потребление инъекционных наркотиков (45,3%), гетеросексуальные контакты (27,3%), в 25,8% случаев путь передачи остался неизвестным. Образцы были собраны совместно с коллективом лаборатории вирусов лейкозов ГУ НИИ вирусологии имени Д И Иванковского РАМН благодаря участию сотрудников региональных центров, а также Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом. Определение генетического подтипа ВИЧ-1 в образцах проводили ранее описанными методами сравнительной оценки электрофоретической подвижности гетеродуплексов по генам *env* (Delwart et al, 1993) и *gag* (Heyndrickx et al, 2000). Для изучения генетической изменчивости и частоты встречаемости мутаций использовали выборку, которая не включала лиц, по результатам эпидемиологического расследования принадлежавших одним и тем же эпидемиологическим цепочкам (всего исследовано 256 таких лиц, инфицированных ВИЧ-1 подтипа А (n=253) или рекомбинантной формой вируса CRF03_AB (n=3)). Для изучения возможности передачи от человека к человеку основных вариантов ВИЧ-1, несущих мутации гена *pol*, дополнительно исследовали образцы, полученные от 46 лиц, которые были эпидемиологически связаны с пациентами из основной выборки и все инфицированы ВИЧ-1 подтипа А.

Фрагменты гена *pol* амплифицировали гнездовым методом ПЦР и анализировали тремя методами: с помощью прямого автоматического определения нуклеотидных последовательностей (74 образца), молекулярной гибридизации на биологических микроципах (150 образцов) и рестрикционного анализа (89 образца). При анализе одних и тех же панелей образцов разными методами противоречивых данных не выявлено.

Определение нуклеотидных последовательностей проводили в трех «перекрывающихся» амплифицированных фрагментах гена *pol* с координатами 2217-2596, 2484-3027 и 2931-3462 (координаты здесь и далее даны для ВИЧ-1 HXB2, регистрационный номер в GenBank K03455). Работы по определению нуклеотидной последовательности ДНК проводили в сотрудничестве с Г А Шипулиным и А И Кругловой на базе ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; часть работ было проведено также на базе НИИ

молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН. В результате выравнивания, проводимого с помощью программы BioEdit 7.0.1, получали нуклеотидные последовательности области гена *pol*, кодирующей все 99 а.о. или, в некоторых случаях, с 4-го по 90-ый а.о. протеазы, и с 1-го по 246-ой а.о. или по 300-ый а.о. ОТ. Филогенетический анализ проводили с помощью программы Mega 2.1, статистическую обработку данных – с помощью программ из пакета STATISTICA.

Выявление точечных мутаций в гене *pol* ВИЧ-1, приводящих к заменам V77→I в протеазе и A62→V в ОТ, проводили в амплифицированных фрагментах гена *pol* с координатами 2249-2564 и 2593-2923 соответственно. Для этого использовали разработанные совместно с Н.И. Рудинским и В.М. Михайловичем и изготовленные ООО «Биочип-ИМБ», Россия, биологические микрочипы HIV-Protease77ChipTM и HIV-RT62ChipTM. Эксперименты по молекулярной гибридизации на микрочипах проводили на базе лаборатории биологических микрочипов НИИ молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН при помощи сотрудников лаборатории. Для выявления мутаций гена *pol* ВИЧ-1 подтипа А, приводящих к заменам V77→I в протеазе и A62→V в ОТ, методом рестрикционного анализа использовали эндонуклеазы *VspI* ("Fermentas", Литва) или *PsiI* («СибЭнзим», Россия) соответственно.

2. Мутации лекарственной устойчивости в нуклеотидных последовательностях гена *pol* ВИЧ-1 подтипа А среди ВИЧ-1-инфицированных лиц в России, не принимавших АРВ-препараты

Определены нуклеотидные последовательности области гена *pol*, кодирующей протеазу, (*pro*) у 74 образцов ВИЧ-1, принадлежащих, согласно предварительному анализу генов *env* и *gag*, генетическому подтипу А (n = 71) или рекомбинантной форме CRF03_AB (n = 3). Из них для 46 образцов ВИЧ-1 подтипа А определены также нуклеотидные последовательности области гена *pol*, кодирующей как минимум первые 246 а.о. ОТ (*Rt*). В результате филогенетического анализа полученных нуклеотидных последовательностей гена *pol* установили, что все они действительно принадлежат генетическому подтипу А ВИЧ-1. Более того, они с высокой достоверностью образовывали общую ветвь на филогенетических деревьях с последовательностями варианта IDU-A, выявленными среди ПИН Украины (98UA0116), Белоруссии (97BL006) и Молдавии (97MD18) и опубликованными в GenBank ранее под номерами AF413987, AF193275 и AF400676. Этой же ветви принадлежали также все три последовательности *pro* рекомбинантных вариантов ВИЧ-1 CRF03_AB.

Затем сравнили транслированные аминокислотные последовательности изучаемых вариантов ВИЧ-1 с консенсусом IDU-A, полученным путем выравнивания ранее опубликованных последовательностей 98UA0116, 97BL006 и 97MD18. При этом среди исследуемых образцов были обнаружены

две дефектных последовательности протеазы и четыре дефектных последовательности ОТ. Они содержали стоп-кодоны и были исключены из дальнейшего анализа, поскольку принадлежали заведомо нежизнеспособным вариантам вируса. При анализе оставшихся транслированных последовательностей гена *pol*, в целом, отмечалась их высокая консервативность. Так, в области протеазы значащие мутации встречались в 27 положениях из 99 (27,3%), но на каждую последовательность протеазы приходилась в среднем лишь 1,6 аминокислотная замена $\pm 1,1$ (стандартное отклонение, размах от 0 до 5). Область ОТ характеризовалась еще большей консервативностью: среди первых 256 аминокислотных остатков этого фермента только в 46 положениях (18,0%) встречались замены. Каждая последовательность ОТ содержала от 0 до 8 аминокислотных замен, в среднем $3,9 \pm 2,1$.

Связь выявленных аминокислотных замен с лекарственной устойчивостью ВИЧ определяли с помощью базы данных лекарственной устойчивости ВИЧ Стэнфордского университета (<http://hivdb.stanford.edu>), используя программы ViroLogic PhenoSense™ и HIVdb Program (Genotypic Resistance Interpretation Algorithm, Version 4.1.9 (02/24/06)). Прежде всего, необходимо отметить, что среди выявленных нами замен ни в протеазе, ни в ОТ не было первичных мутаций устойчивости, т.е. мутаций, снижающих чувствительность ВИЧ-1 к АРВ-препаратам. Ни одно из сочетаний выявленных мутаций не коррелировало с генотипами ранее анализированных клинических изолятов, обнаруживающих фенотипическую устойчивость к АРВ-препаратам, или генотипами ВИЧ-инфицированных больных, у которых АРВ-терапия была неэффективна. Таким образом, проведенная интерпретация аминокислотных последовательностей показала, что исследуемые варианты ВИЧ-1 потенциально чувствительны ко всем известным ингибиторам протеазы и ОТ. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными о низкой распространенности первичных мутаций устойчивости среди не употребляющих АРВ-препараты ВИЧ-позитивных лиц в странах, где охват АРВ-терапией – по экономическим причинам или ввиду малого количества нуждающихся в ней – неширок (Soriano, 2004).

Несмотря на это, мы обнаружили некоторые вторичные мутации и другие аминокислотные замены в положениях, мутации в которых связаны с лекарственной устойчивостью у ВИЧ-1 подтипа В (Табл. 1). Замены в 20-ом и 63-м положениях протеазы обнаруживались в единичных случаях, являясь, по-видимому, следствием типичного для этих участков полиморфизма.

Таблица 1. Обнаруженные аминокислотные замены в положениях, мутации в которых связаны с лекарственной устойчивостью ВИЧ-1, и их частота.

Название мутации		Частота встречаемости в исследованных образцах		Ранее опубликованная для подтипа А частота**, %
а о и его положение в белке «дикого типа»*	замена а о.	доля	%	
<u>Протеаза</u>				
K20 → N		1 / 72	1,4	<1
M36 → I		72 / 72	100,0	98,6
L63 → P		1 / 72	1,4	9,3
→ T		1 / 72	1,4	2,6
V77 → I		41 / 72	56,9	3,1
I93 → L		51 / 51	100,0	6,2
<u>Обратная транскриптаза</u>				
A62 → V		24 / 42	57,1	<1
V179 → I		2 / 42	4,8	74,6
L210 → S		1 / 42	2,4	<1

*За «дикий тип» условно принят а о., наблюдаемый в консенсусе последовательностей ВИЧ-1 подтипа В, полученных от нелеченных АРВ-препаратами лиц.

**Ранее опубликованные значения частоты встречаемости мутаций среди нелеченных АРВ-препаратами лиц, инфицированных ВИЧ-1 подтипа А, приведены из базы данных лекарственной устойчивости ВИЧ Стэнфордского университета (<http://hivdb.stanford.edu>), по состоянию на 10 02 2004, и являются результатом анализа 225 последовательностей протеазы и 180 последовательностей ОТ Жирным шрифтом обозначены полученные значения частоты встречаемости, которые статистически значимо отличаются от опубликованных прежде ($p < 0,01$ при использовании z-критерия)

Присутствие изолейцина в 36-м положении протеазы всех анализируемых последовательностей также не противоречит ранее известным данным, согласно которым именно этот аминокислотный остаток в 36-м положении характерен для подтипа А, более того, — не только А, но и для других не-В подтипов (Kantor and Katzenstein, 2003; Comelissen et al, 1997) Замена лейцина на серин в 210-ом положении ОТ обнаружена в единственном образце и является полиморфным вариантом этого положения ОТ, в котором может возникать мутация устойчивости L210→W Сообщений о том, что сама замена L210→S влияет на лекарственную устойчивость, не найдено В случае же мутации V179→I, проявляющей свойства вторичной мутации у ВИЧ-1 подтипа В, имеет место парадоксальная ситуация: частота встречаемости этой замены среди исследованных вирусов IDU-A (4,8%) оказалась значительно ниже, чем величина, характерная в целом для подтипа А (74,6%), в котором изолейцин принадлежит консенсусу 179-го положения ОТ

Существенное расхождение полученных значений частоты встречаемости с литературными данными наблюдали в трех случаях: для мутаций V77→I и

I93→L в последовательности протеазы и A62→V - в последовательности ОТ Замена I93→L в протеазе обнаруживалась не только в 100% исследованных нами образцов, но и во всех последовательностях варианта IDU-A, выделенных в 1997 – 2001 гг на Украине, в Белоруссии, Молдавии, Испании, а также у его рекомбинантной формы CRF03_AB, впервые обнаруженной в 1996 г в Калининграде. Скорее всего, эту замену содержал исходный вариант ВИЧ-1 подтипа А, проникший в популяцию ПИН в 1995 г и распространившийся вскоре по странам бывшего СССР.

Особое внимание обращают на себя замены V77→I в протеазе и A62→V в ОТ, частота встречаемости которых резко превышает характерные для ВИЧ-1 подтипа А значения. При этом замена V77→I в протеазе, из 10 последовательностей вируса IDU-A, опубликованных ранее, определялась только в одном случае – в последовательности I.P27, выявленной у российского иммигранта в Испании в 2001 г (регистрационный номер в GenBank AF455622). Более того, мутация V77→I также отсутствовала во всех анализированных нами или другими исследователями образцах рекомбинантной формы CRF03_AB, которая впервые была зарегистрирована в 1996 г среди ПИН Калининградской области. Таким образом, можно предположить, что частота встречаемости замены V77→I среди вирусов IDU-A значительно возросла уже в ходе эпидемии ВИЧ-1 инфекции в России. Интересно, что в подавляющем большинстве случаев эта мутация оказывалась сцепленной в геноме вируса с заменой A62→V в ОТ: из всех 26 V77→I-содержащих вариантов 19 (73,1%) содержали также и мутацию A62→V. Что касается последней, то прежде сообщений о ее высокой распространенности среди лиц, не принимавших АРВ-препараты, не появлялось. Она отсутствовала также во всех последовательностях варианта IDU-A, опубликованных ранее. Это позволяет предположить, что замена A62→V в ОТ, как и V77→I в протеазе, возникла в геноме вируса IDU-A уже в ходе эпидемии ВИЧ-инфекции среди ПИН, возможно, на территории России.

Кроме мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью ВИЧ-1 (Табл 1), нужно отметить ряд замен в сайтах полиморфизма, частота встречаемости которых среди анализируемых образцов IDU-A превышала значения, характерные для подтипа А ($p < 0,001$ по z-критерию). К числу этих замен относятся K14→R в протеазе (76%), а также K11→T (100%), V35→I (62%), E36→D (91%), T39→K (81%), K102→Q (12%), A158→S (86%), K173→L (86%), Q174→K (98%), V245→M (88%), E248→D (100%), A272→P (100%) и K277→R (75%) в ОТ (в скобках указано полученное значение частоты встречаемости).

3. Филогенетический анализ четырех обнаруженных в России вариантов ВИЧ-1 подтипа А, различающихся по мутациям V77→I в протеазе и A62→V в обратной транскриптазе

В результате анализа генетических данных, полученных на предыдущем этапе работы, обнаружено четыре варианта нуклеотидных последовательностей гена *pol* вируса IDU-A, доминирующего в России, которые различались наличием или отсутствием мутаций V77→I в протеазе и/или A62→V в ОТ. Так, среди всех 42 последовательностей провирусной ДНК, включающих области *pro* и *Rt*, 11 не содержали ни одной из указанных мутаций («дикий тип», Wt), 19 содержали обе мутации (Mut_{V77I/A62V}), 7 и 5 содержали только V77→I (Mut_{V77I}) или A62→V (Mut_{A62V}) соответственно. В связи с этим возникает вопрос, имеют ли выявленные нами мутантные варианты вируса общее происхождение, или все случаи возникновения мутаций происходили независимо друг от друга. Как видно из представленных на Рис. 1 данных, ветвь филогенетического дерева, образованная исследуемыми последовательностями гена *pol* варианта IDU-A, неоднородна. В ней с высокой достоверностью выделяется два «дочерних» кластера: один, в который входят все пять последовательностей генотипа Mut_{A62V}, и другой, объединяющий все варианты генотипов Mut_{V77I/A62V} и Mut_{V77I}. Интересно, что последние оказываются на одной ветви друг с другом, будучи выделены из разных регионов России, тогда как вирусы дикого типа из тех же регионов (Алтайского, Хабаровского краев, Москвы, Пермской и Свердловской областей) располагаются вне этого кластера, близко к корню общей ветви IDU-A. Эта картина, по-видимому, говорит об общем происхождении всех V77→I-содержащих вариантов IDU-A и последующем распространении их по территории России, которое происходило на фоне циркуляции вирусов дикого типа. Вирусы генотипа Mut_{A62V} также оказались филогенетически родственны друг другу, что можно было предположить, принимая во внимание однородность их географического источника – Красноярский край. Однако их ветвь не принадлежит кластеру Mut_{V77I/A62V}, что указывает на отсутствие прямых родственных связей между ними и вариантами Mut_{V77I/A62V}.

Одним из ответов на вопрос о происхождении генотипов Mut_{V77I} и Mut_{A62V} может быть предположение об их рекомбинантной природе. Согласно этому предположению, генотип Mut_{V77I/A62V}, однажды возникнув и распространившись по регионам России, где циркулировал и его родительский дикий штамм IDU-A, рекомбинировал с ним, что привело к образованию генотипов Mut_{V77I} и Mut_{A62V}.

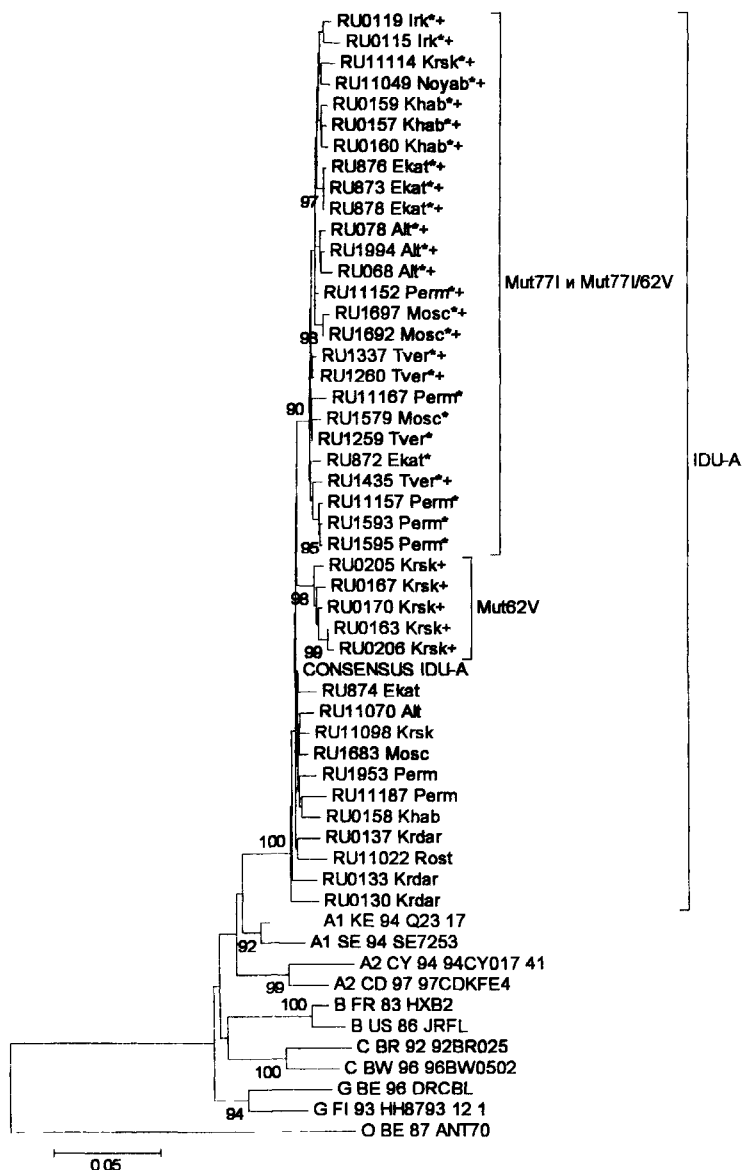


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное методом ближайших соседей в результате анализа слитных нуклеотидных последовательностей длиной 1014 п.н., кодирующих протеазу и первые 248 а.о. ОТ ВИЧ-1. Цифры у основания ветвей филогенетического древа указывают частоту (%), с которой данные последовательности оказывались на одной ветви в 500 независимых построениях. Обозначения рядом с названием последовательности указывают наличие в ней мутации V77→I (*), наличие мутации A62→V (+), или наличие обеих мутаций (*+)

Чтобы проверить это предположение, мы анализировали все нуклеотидные замены, по которым генотип Mut_{V77I/A62V} отличался от генотипа Wt ($p=0,006$ по χ^2 -критерию), и эти же положения в последовательностях Mut_{V77I} и Mut_{A62V}. Как показано в Табл. 2, подавляющее большинство последовательностей варианта Mut_{V77I/A62V}, наряду с мутациями в кодонах 77 протеазы и 62 ОТ, содержали характеристические мутации в кодонах 31 и 78 протеазы и кодонах 29, 35, 66, 67, 149, 170 и 246 ОТ, из которых все были синонимичными, кроме мутации в 35-ом положении ОТ. Все эти мутации отсутствовали в большинстве образцов ВИЧ-1 дикого типа. При анализе последовательностей Mut_{V77I} и Mut_{A62V} обнаружено, что набор характеристических мутаций и в *pro*, и в *Rt* был либо практически полностью сохранен (как в вариантах Mut_{V77I}), либо отсутствовал (образцы Mut_{A62V} из Красноярска). Это противоречило предположению о рекомбинантной природе генотипов Mut_{V77I} и Mut_{A62V}, поскольку согласно ему следовало ожидать сохранения характеристических мутаций только в той области гена *pol*, которая произошла от мутантного варианта Mut_{V77I/A62V}, при одновременном отсутствии мутаций в участке, произошедшем от вируса дикого типа.

Таблица 2. Характеристические мутации
в гене *pol* у вариантов ВИЧ-1 подтипа А в России

Pol-генотип	Исследуемые образцы*	Кодоны, их положение и кодируемые а.о.											
		Протеаза			Обратная транскриптаза								
		31	77	78	29	35	62	66	67	149	170	246	
		T	V→I	G	E	T→I	A→V	K	D	L	P	L	
Wt	Консенсус	ACA	GTA	GGA	GAG	ACA	GCT	AAG	GAC	CTT	CCC	CTG	
Mut _{V77I/A62V}	Консенсус	..G	A ..	..G	..A	.T	.T	..A	..T	..C	..A	..A	
Mut _{V77I}	RU872.Ekat	... A ..	..G	...			..A	..T		..A	...	...	
	RU1579.Mosc	..G A ..	..G	...	T		..A	..T		..A	...	...	
	RU11157.Perm	..G A ..	..G	...	T		..A	..T		..A	...	...	
	RU1593.Perm	..G A ..	..G	...	T		..A	..T		..A	...	...	
	RU1595.Perm	..G A ..	..G	...	T		..A	..T		..A	...	...	
	RU11167.Perm	..G A ..	..G	...	..A .T		..A	..T		..A	...	...	
	RU1259.Tver	..G A ..	..G	...	T		..A	..T		..A	...	...	
Mut _{A62V}	RU0183.Krsk		...	...			.T	...	...	...	...	...	
	RU0167.Krsk		...	...	... c ..	.T	...	...	...	...	...	...	
	RU0170.Krsk		...	...		.T	...	...	...	...	...	...	
	RU0206.Krsk		...	...		.T	...	...	...	...	...	...	
	RU0205.Krsk		...	...	T	.T	...	...	...	...	...	...	

*Для образцов генотипов Wt и Mut_{V77I/A62V} представлены консенсусные последовательности, полученные с помощью выравнивания соответственно 11 и 19 анализируемых нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 подтипа А. Для образцов генотипов Mut_{A62V} и Mut_{V77I} приведен номер образца и, сокращенно, место проживания пациента. Жирным шрифтом выделены несинонимичные мутации.

Сравнительный анализ наборов характеристических нуклеотидных замен у генотипов *Mut_{V771}* и *Mut_{V771/A62V}* позволил предположить схему постепенного накопления мутаций геномом ВИЧ, согласно которой сначала образовался вариант *Mut_{V771}*, потом в нем возникла и закрепилась мутация A62→V в ОТ, а вслед за ней – синонимичные мутации в 29-ом, 149-ом и 246-ом положениях ОТ. Отсутствие характеристических нуклеотидных замен в вирусах с генотипом *Mut_{A62V}* позволяет предполагать, что они возникли из вариантов дикого типа путем прямой мутации в 62-ом кодоне ОТ

Генетическая изменчивость в области *pro*, определенная по Kimura, среди всех 42 образцов варьировала в пределах 0,00 – 5,05 (среднее значение $1,72 \pm 1,10$ стандартное отклонение), а в области *Rt* была несколько выше, составив в среднем $2,01 \pm 0,75$ и варьируя от 0 до 4,06. При более детальном исследовании нуклеотидных последовательностей гена *pol* мы обнаружили, что мутантные варианты ВИЧ-1 IDU-A отличаются от своего «родительского» вируса Wt не только более высокой генетической гомогенностью (что согласуется с более поздним временем их возникновения), но и более низким уровнем изменчивости в области *pro*, по сравнению с областью *Rt* (Рис 2А). Это

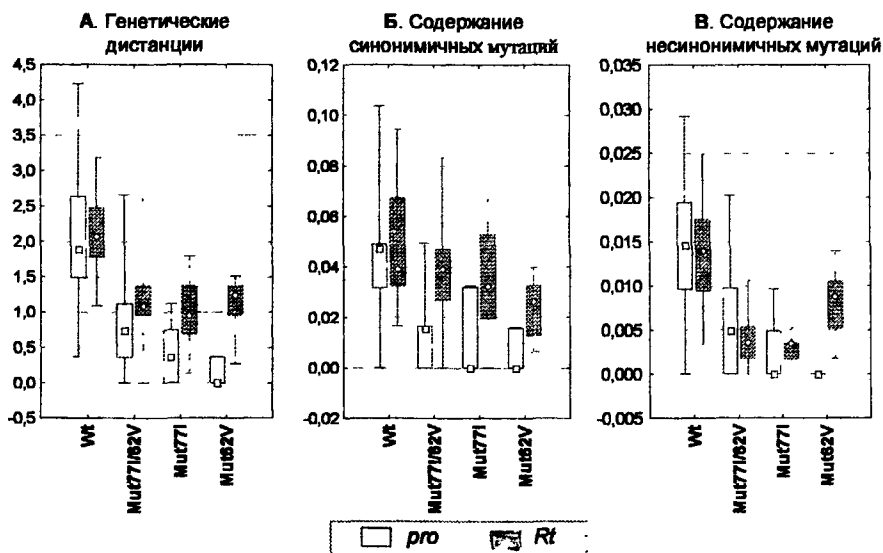


Рис 2 Анализ генетической гетерогенности областей *pro* и *Rt* у вариантов ВИЧ-1 IDU-A четырех *pol*-генотипов. Внутригрупповые генетические дистанции (А) рассчитаны по двухпараметрическому методу Kimura; содержание синонимичных (Б) и несинонимичных (В) мутаций рассчитано методом Nei—Gojobori (с коррекцией Jukes—Cantor). Точками обозначены медианы значений, высотой прямоугольников – интерквартильный интервал, высотой линий – размах значений.

различие было полностью обусловлено более низкой частотой синонимичных мутаций в *pro*, чем в *Rt*, что, по-видимому, указывает на более высокую природную мутабельность области *Rt* (Рис 2Б). Тем не менее, давление негативного отбора на вирусную популяцию нивелирует данные различия, приводя к практически одинаковому уровню частоты несинонимичных мутаций в *pro* и *Rt* (Рис 2В). Интересно отметить, что мы не обнаружили тех же закономерностей при анализе последовательностей ВИЧ-1 IDU-A дикого типа: у них различия в характере изменчивости *pro* и *Rt* отсутствовали. Можно предположить, что при относительно более долгой циркуляции вариантов ВИЧ-1 IDU-A дикого типа различия между *pro* и *Rt* в темпах изменчивости стираются за счет постепенного накопления мутаций (именно синонимических) областью *pro*. В то же время, в геноме вариантов Mut_{V77I/A62V}, Mut_{V77I} и Mut_{A62V}, которые являются эволюционно более «молодыми», чем *Wt*, и циркулируют менее долго, мы эти различия смогли обнаружить. С другой стороны, различие в характере генетической изменчивости областей *pro* и *Rt* у мутантных вариантов ВИЧ-1 IDU-A может объясняться другими причинами. Выяснение их, а также клинического и общебиологического значения этого феномена, по-видимому, должно явиться предметом дополнительных исследований.

4. Распространение вариантов ВИЧ-1 подтипа А, четырех *pol*-генотипов, в разных регионах России на протяжении 1996—2005 гг.

Для дальнейшего изучения циркуляции обнаруженных в России вариантов ВИЧ-1, различающихся по мутациям V77→I в протеазе и/или A62→V в ОТ, мы разработали методы, позволяющие различать четыре *pol*-генотипа вирусов IDU-A без определения их нуклеотидных последовательностей. Эти методы были основаны на технологии молекулярной гибридизации на биологических микрочипах и рестрикционном анализе.

На первом этапе, чтобы выяснить, действительно ли сохраняется генотип каждого из вариантов ВИЧ-1 подтипа А при передаче от человека к человеку, мы исследовали 17 групп эпидемиологически связанных друг с другом ВИЧ-инфицированных лиц. Для этого, с помощью указанных методов (а в некоторых случаях и с помощью определения нуклеотидных последовательностей) дополнительно анализировали образцы провирусной ДНК, полученные от 46 инфицированных ВИЧ-1 подтипа А лиц с установленными эпидемиологическими связями. В результате анализа обнаружено, что генотип вируса сохранялся во всех случаях передачи инфекции вне зависимости от пути заражения (примеры изученных эпидемиологических цепочек показаны на Рис

3) Интересно, что ни в одном из 20 исследованных случаев передачи от человека к человеку ВИЧ-1 IDU-A дикого типа мы не обнаружили спонтанного возникновения ни мутации V77→I в *pro*, ни мутации A62→V в *Rt*. Необходимо, однако, отметить, что детекцию этих мутаций мы проводили непосредственно в ПЦР-продуктах фрагментов гена *pol*, без стадии предварительного клонирования. Поэтому выявить минорные варианты вируса, возникающие в организме человека, мы не могли. Тем не менее, можно предположить, что, даже если они и существовали, мы не зарегистрировали признаков их доминирования в популяциях ВИЧ-1 каждого пациента. Это говорит о том, что случай, который привел к селекции вариантов вируса с мутантными генотипами Mut_{V77I/A62V} и Mut_{V77I} был, по-видимому, редким явлением.

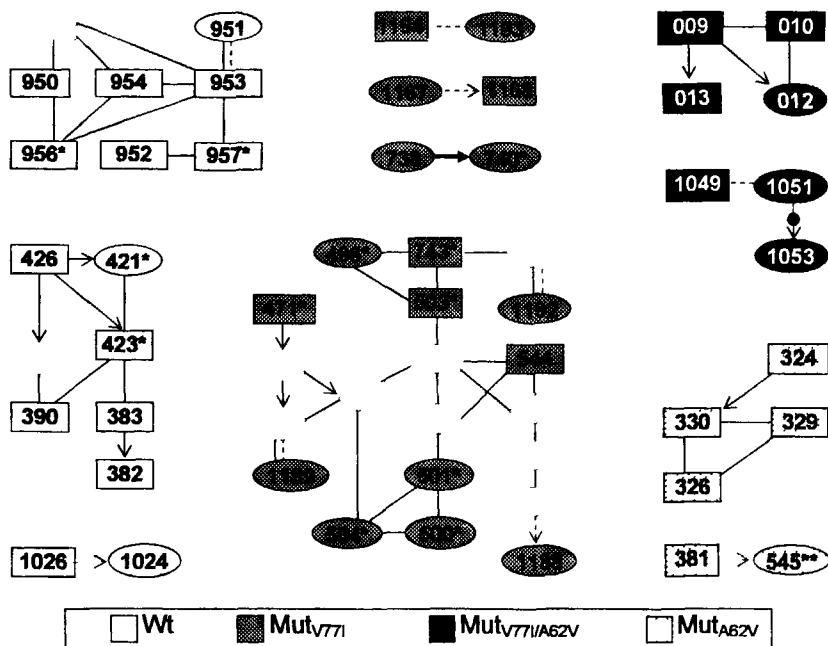


Рис. 3. Передача вариантов ВИЧ-1 IDU-A четырех *pol*-генотипов от человека к человеку. Овалами обозначены женщины, прямоугольниками – мужчины. Цифры – номера пациентов, фигуры без цифр – неисследованные нами лица. Линии показывают эпидемиологические связи, стрелки – направление передачи инфекции, если оно установлено. Сплошные тонкие линии – совместное употребление инъекционных наркотиков, сплошная толстая линия – переливание крови, пунктирные линии – гетеросексуальные контакты, стрелка с черным кружком – вертикальный путь передачи. Звездочками обозначены образцы, охарактеризованные только относительно мутации V77I в *pro* (*), или только относительно мутации A62V в *Rt* (**).

На следующем этапе, чтобы подробно исследовать распространенность в России вариантов вируса, несущих мутации V77→I, A62→V или их сочетание, мы анализировали 253 образца провирусной ДНК ВИЧ-1 подтипа А, собранные на территории России в 1996–2005 гг. Во избежание искажений частоты встречаемости мутаций, в эту выборку мы не включили образцы, которые были получены от принадлежавших одним и тем же эпидемиологическим цепочкам лиц. В результате комплексного использования методов определения нуклеотидных последовательностей, молекулярной гибридизации на биологических микрочипах и рестрикционного анализа, охарактеризовано 246 образцов относительно мутации V77→I и 186 — относительно мутации A62→V. Рассчитанные значения частоты встречаемости этих мутаций составили 60,2% (148/246) и 51,6% (96/186) соответственно. При этом состояние обоих кодонов, по которым можно было сделать заключение о генотипе вируса, — 77-ого кодона в *pro* и 62-го в *Rt* — удалось определять в случае 179 образцов. На Рис. 4 представлены данные о распространенности четырех обнаруженных в настоящем исследовании *pol*-генотипов среди вариантов ВИЧ-1 IDU-A, циркулирующих в 14 регионах России. В целом по стране наибольшую частоту встречаемости (78/179, 43,6%) обнаружил генотип Mut_{V77I/A62V}. Следующим по распространенности оказался дикий тип вируса (50/179, 27,9%), за которым располагались варианты, несущие лишь одну из мутаций Mut_{V77I} (34/179, 19,0%) и Mut_{A62V} (17/179, 9,5%). Представляет интерес географическое распределение вариантов вируса, обнаруживаемых в России в ходе эпидемии ВИЧ-инфекции (Рис. 4).

В 1996–1997 гг. в южных регионах России (в Краснодарском крае, Саратовской и Ростовской областях), которые были охвачены эпидемией ВИЧ-1 инфекции в первую очередь, обнаружен только дикий тип ВИЧ-1 IDU-A. Первым регионом, в котором были зарегистрированы мутантные генотипы, оказалась Тверская область, причем там практически одновременно, весной 1997 г., были выявлены случаи инфекции сразу двумя вирусами: Mut_{V77I} и Mut_{V77I/A62V}, что, по-видимому, подтверждает их эволюционное родство. Можно предположить, что в Тверской области они и образовались, или были занесены туда из неисследованных нами регионов. Вслед за эпидемией в Тверской области, в 1998 г. была зарегистрирована вспышка ВИЧ-инфекции среди ПИН в Московской области и Москве. В ней мы обнаруживали и вирусы IDU-A дикого типа, занесенные туда раньше, и оба тверских варианта. Возможно, распространение в столице инфекции вирусами, содержащими мутацию V77→I в *pro*, определило эпидемиологическую ситуацию во всей стране. Так, в 1999 г.

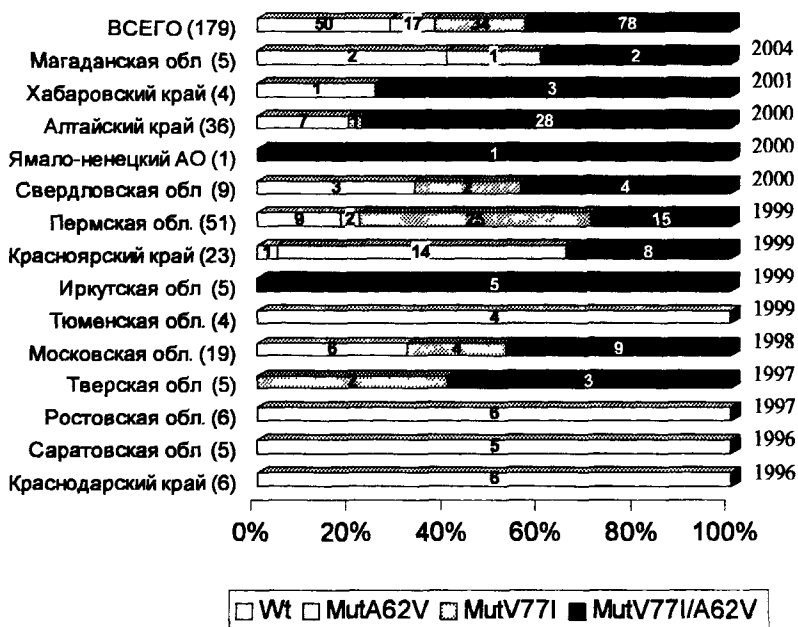


Рис. 4. Распределение по регионам России четырех *pol*-генотипов ВИЧ-1 IDU-A, различающихся наличием/отсутствием мутаций V77I в *pro* и A62V в *Rf*. Рядом с названием региона в скобках указано количество исследованных образцов. Справа указан год начала эпидемии ВИЧ-инфекции в регионе (по Покровскому и соавт., 2005).

вспыхивают эпидемии ВИЧ-инфекции в Пермской, Тюменской, Иркутской областях и Красноярском крае. Мы регистрируем появление варианта ВИЧ-1 с генотипом *Mut_{V77I/A62V}* везде, кроме Тюменской области, где обнаруживаются вирусы дикого типа, как и на юге. Интересно, что на этом этапе появляются случаи инфекции вирусом *Mut_{A62V}*, сначала – редкие – в Перми (даты их выявления здесь относятся к 1997-1998 гг.), потом преобладающие – в Красноярском крае. Однако, широкого распространения во всей стране они, по-видимому, не получили. Вспышки, зарегистрированные в 2000 г и позже – в Екатеринбурге, в Алтайском крае и на Дальнем Востоке, характеризуются гетерогенностью популяции ВИЧ-1 подтипа А с тенденцией к доминированию мутантного варианта *Mut_{V77I/A62V}*.

Необходимо отметить, что в ходе эпидемии ВИЧ-инфекции в России соотношение частоты встречаемости между *pol*-генотипами ВИЧ-1 IDU-A

существенно меняется (Рис 5) Если среди случаев ВИЧ-инфекции, зарегистрированных до 1998 г., преобладали варианты дикого типа, то в последующие периоды времени все чаще выявляются вирусы генотипа Mut_{V77U/A62V} - их распространенность возросла почти в два раза, - и генотипа Mut_{V77L}, который стал встречаться более чем в три раза чаще Таким образом, по-видимому, развитие эпидемии ВИЧ-инфекции в России в период с 1996 по 2004 гг сопряжено с ростом частоты встречаемости вариантов, содержащих мутацию V77→I в *pro*, среди вновь выявляемых случаев инфекции ВИЧ-1 подтипа А

5. Обсуждение полученных данных о распространении мутантных вариантов ВИЧ-1 подтипа А в России

Полученные в результате настоящего исследования данные говорят о возникновении и нарастающей циркуляции в России вирусов IDU-A с мутантными *pol*-генотипами Mut_{V77L} и Mut_{V77U/A62V} Это явление, по-видимому, повлияло на эпидемию ВИЧ-инфекции и в некоторых странах Ближнего Зарубежья, где отмечается повышение частоты встречаемости мутации V77→I в *pro* (Vazquez de Parga et al, 2005) и A62→V в *Rt* среди ВИЧ-1 подтипа А (Carr et al, 2005) Обращает на себя внимание тот факт, что среди всех четырех генотипов наибольшее распространение получил вариант Mut_{V77U/A62V} В связи с этим возникает вопрос, не вызвана ли такая селекция варианта Mut_{V77L}, а затем и Mut_{V77U/A62V}, какими-либо их преимуществами перед вирусом дикого типа, которые и способствовали быстрому распространению Mut_{V77U/A62V}

Анализ эпидемиологической ситуации, сложившейся на начало 1997 г в России показывает, что эта «селекция» могла быть и не связана с возможными биологическими особенностями мутантного варианта вируса, а вызвана эпидемиологическими факторами. На 1 января 1997 г в России было зарегистрировано 2607 ВИЧ-инфицированных граждан, при этом 83,4% являлись ПИН Новая вспышка в Тверской области в начале 1997 г была одной из самых больших на территории России, наряду с Калининградским очагом, выявленным в тот же период, и очагами в Краснодарском крае и Ростовской области, выявленными ранее, в 1996 г. В связи с этим, проникновение варианта Mut_{V77U/A62V} ВИЧ-1 из Твери в «еще не освоенные вирусом» в то время крупные индустриальные регионы России — в Москву и Московскую область, а затем на Урал, в Сибирь и на Дальний Восток — само по себе могло обусловить широкомасштабную эпидемию Эти территории характеризуются большим числом наркопотребителей, поэтому там было возможно одновременное

заражение одним вариантом вируса больших групп людей из-за использования нестерильного оборудования при приготовления или употреблении наркотиков

Тем не менее, интересно, что в ряде городов, как, например, Москва или Пермь, циркуляция V77→I-содержащих вариантов начиналась на фоне достаточно широкого распространения вируса дикого типа, но все-таки приводила к возрастанию частоты встречаемости мутантных вариантов. Поэтому не исключено, что эти вирусы обладают определенными особенностями - повышенной репликативной активностью или другими биологическими свойствами, дающими им преимущества перед вариантами ВИЧ-1 дикого типа. На популяционном уровне большое значение могут иметь и такие свойства вируса, как, например, его стабильность в окружающей среде или доза, обеспечивающая заражение при парентеральном пути передачи.

В результате сопоставления полученных данных с базой данных эпитопов ВИЧ-1 Национальной лаборатории в Лос-Аламосе, Нью-Мехико, США, (<http://hiv-web.lanl.gov>) обнаружено, что ряд выявленных нами аминокислотных замен в продуктах гена *pol* находится в участках антигенных детерминант ВИЧ-1, распознаваемых цитотоксическими Т-лимфоцитами. Так, например, область

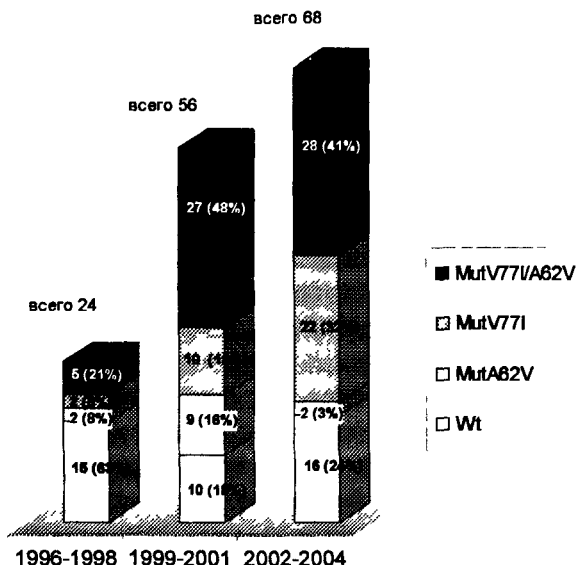


Рис. 5. Изменение частоты встречаемости в России вариантов ВИЧ-1 IDU-A четырех *pol*-генотипов с течением времени. По оси X представлены периоды времени, в которые были зарегистрированы исследованные случаи ВИЧ-инфекции. По оси Y представлено количество исследованных случаев ВИЧ-инфекции с известными датами выявления.

мутации V77→I в протеазе принадлежит эпитопам VLVGPTPVNI (а о 75-84) и LVGPTPVNI (а о 76-84), представляемым молекулами гистосовместимости супертипа HLA-A2, а область мутации A62→V в ОТ – HLA-A3-рестрицируемому эпитопу NTPVFAIKK (а о 57-65). Кроме того, характеристическая для генотипа Mut_{V77/A62V} замена V35→I в ОТ тоже принадлежит эпитопам ALVEICTEM (а о 33-41, HLA-A2) и ALVEICTЕМЕК (а о 33-43, HLA-A3). Хотя и неизвестно, обеспечивают ли выявленные мутации ускользание ВИЧ-1 от клеточного иммунного ответа, можно предполагать, что их первичная селекция была связана именно с этим. Это предположение подкрепляется некоторыми данными, указывающими на значительную частоту встречаемости в России аллелей HLA-A2 и HLA-A3 (Зарецкая, 1983), хотя с этой точки зрения труднее объяснить широкомасштабное распространение мутантных вирусов среди жителей разных регионов России, вероятно, отличающихся друг от друга по генам комплекса гистосовместимости.

Нельзя исключить также то, что изменения, которые, возможно, обеспечивают вирусу Mut_{V77/A62V} определенные биологические преимущества, сосредоточены в каких-то других областях его генома, например, регуляторных. Согласно этому предположению, выявленные нами замены V77→I, A62→V и другие характеристические мутации могут просто являться генетическими маркерами этого варианта ВИЧ-1.

Представляется важным рассмотреть, как выявленные нами особенности гена *pol* циркулирующих вариантов ВИЧ-1 могут сказаться на эффективности АРВ-терапии пациентов, инфицированных такими вирусами. Причем к этим особенностям относятся не только мутации V77→I в протеазе и A62→V в ОТ, закрепившиеся в геноме ВИЧ-1, по-видимому, в ходе эпидемии в России. Помимо этих замен, подавляющее большинство вирусов подтипа А содержит в последовательностях протеазы вторичные мутации M36→I и I93→L, первая из которых характерна для всех вариантов этого генетического подтипа и многих вариантов других не-В подтипов (Kantor and Katzenstein, 2003; Corneilhsen et al., 1997) и поэтому не обсуждалась нами собственно как мутация, а вторая, по-видимому, принадлежала изначальному варианту ВИЧ-1 подтипа А, вызвавшему эпидемию среди ПИН стран Восточной Европы и бывшего СССР.

Необходимо подчеркнуть, что все перечисленные мутации не обуславливают лекарственной устойчивости в отсутствие первичных мутаций (Quinones-Mateu and Arts, 2001). Однако в литературе накапливается все больше информации о том, что присутствие в геноме вируса вторичных мутаций до начала АРВ-терапии снижает эффективность терапии. Так, по некоторым данным (Servais et al., 2001), к факторам, статистически достоверно вызывающим

ухудшение ответа на терапию, включающую ингибиторы протеазы, относится наличие пяти или более вторичных мутаций в протеазе ВИЧ-1 до начала лечения, или присутствие замены I93→L в протеазе также до начала лечения. Это, очевидно, связано с тем, что, в условиях воздействия АРВ-препаратов, такие полиморфные вирусы легче накапливают первичные мутации устойчивости, причем не только к ингибиторам протеазы, но и к ингибиторам ОТ (Weber et al, 2003). Что касается замены A62→V в ОТ, то аналогичных исследований не проводили, поскольку эта мутация не выявлялась ранее среди нелеченых ВИЧ-инфицированных лиц. Она была описана как вторичная мутация, сопровождающая вместе с другими заменами в ОТ (V75→I, F77→L и F116→Y) появление первичной мутации устойчивости Q151→M. Известно, что комплекс из всех пяти мутаций, называемый Q151→M-комплексом, вызывает множественную устойчивость ко всем нуклеозидным ингибиторам ОТ, кроме ламивудина и тенофовира (Iversen et al, 1996). В ходе терапии замена A62→V отбирается в последнюю очередь, что у пациентов сопровождается ростом вирусной нагрузки (Shirasaka et al., 1995). В исследованиях *in vitro* добавление мутации A62→V в геном гибридного вируса, содержащего в ОТ остальные четыре мутации, обеспечивало получившемуся мутанту репликативное преимущество даже перед вирусом дикого типа как в присутствии, так и в отсутствие АРВ-препаратов (Kosalaraksa et al, 1999).

Справедливо, однако, будет отметить, что подавляющее большинство вышеперечисленных данных получено при исследовании вариантов ВИЧ-1 генетического подтипа В, и роль обнаруженных нами вторичных мутаций в окружении генетического контекста, свойственного подтипу А, требует дополнительного исследования. Тем не менее, эти данные позволяют выдвинуть предположение, что распространенные в России вирусы, содержащие полиморфную протеазу и мутацию A62→V в ОТ, во-первых, могут труднее поддаваться лечению, быстро вырабатывая лекарственную устойчивость, а во-вторых, и в отсутствие терапии (у нелеченых лиц) могут обладать повышенной репликативной способностью. Последняя гипотеза, несмотря на отсутствие в литературе экспериментальных данных, могла бы стать одним из вариантов объяснения сложившейся в России уникальной ситуации, заключающейся в преимущественном распространении вируса с генотипом Mut_{V77U/A62V} на фоне циркуляции других вариантов ВИЧ-1. Возможность же затруднений в проведении АРВ-терапии у пациентов, инфицированных такими вирусами, настоятельно диктует необходимость постоянного мониторинга эффективности проводимого лечения с помощью определения вирусной нагрузки и тестирования лекарственной устойчивости ВИЧ-1.

ВЫВОДЫ

- 1 Анализ ВИЧ-специфических нуклеотидных последовательностей гена *pol* позволил установить, что в России среди лиц, инфицированных ВИЧ-1 подтипа А и не принимавших АРВ-препараты, не выявляются первичные мутации устойчивости, но с высокой частотой встречаются мутации, известные как вторичные мутации устойчивости у ВИЧ-1 подтипа В и выражающиеся в заменах М36→I, V77→I, I93→L в протеазе и А62→V в обратной транскриптазе. Частота встречаемости этих мутаций составила 100,0%, 56,9%, 100,0% и 57,1% соответственно.
- 2 С помощью интерпретации данных генотипирования показана потенциальная чувствительность циркулирующих в России вариантов ВИЧ-1 подтипа А к действию ингибиторов протеазы и обратной транскриптазы.
- 3 Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена *pol* позволил идентифицировать четыре варианта ВИЧ-1 подтипа А, циркулирующих в России. Три из них имеют мутантные *pol*-генотипы Mut_{V77I/A62V}, Mut_{V77I}, Mut_{A62V}, к отличительным особенностям которых относятся мутации V77→I в протеазе и/или А62→V в обратной транскриптазе, и один является «родительским» штаммом дикого типа.
- 4 Варианты мутантных *pol*-генотипов Mut_{V77I/A62V}, Mut_{V77I} и Mut_{A62V} характеризуются более низким уровнем вариабельности гена *pol*, чем варианты ВИЧ-1 дикого типа, что в большей степени проявляется в области, кодирующей протеазу (0,74, 0,37 и 0,00 против 1,88 соответственно), чем в области, кодирующей обратную транскриптазу (1,09, 0,95, 1,23 против 2,06 соответственно).
- 5 *Pol*-генотип циркулирующих в России вариантов ВИЧ-1 подтипа А сохраняется при передаче от человека к человеку, что позволяет определять его в целях эпидемиологических исследований в очагах ВИЧ-инфекции. Для определения *pol*-генотипа ВИЧ-1 подтипа А показана адекватность применения методов молекулярной гибридизации на биологических микрочипах и рестрикционного анализа.
- 6 Варианты ВИЧ-1 подтипа А *pol*-генотипов Mut_{V77I/A62V} и Mut_{V77I} возникли, по-видимому, из одного источника не позднее 1997 г и распространялись быстрее, чем другие варианты вируса, что в период с 1998 по 2004 гг. сопровождалось ростом частоты их встречаемости в России и к 2005 г. привело к преобладанию вариантов Mut_{V77I/A62V}.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 **Суханова А.Л., Бобков А.Ф.** Генетическое тестирование лекарственной устойчивости при ВИЧ-инфекции: проблемы и перспективы // Эпидемиология и инфекционные болезни - 2004. № 4. - С. 54-58

- 2 **Суханова А.Л., Казеннова Е.В., Рудинский Н.И., Михайлович В.М., Грядун Д.А., Будилов А.В., Булавкина М.А., Weber J.N., Покровский В.В., Бобков А.Ф.** Генетическая изменчивость области, кодирующей протеазу, у изолятов ВИЧ-1 подтипа А и рекомбинантов CRF03_AB на территории СНГ: возникновение и быстрое распространение варианта с заменой V77I // Вопросы вирусологии - 2004. № 49(6). - С. 4-9

- 3 **Рудинский Н.И., Михайлович В.М., Донников М.Ю., Лала С.А., Суханова А.Л., Казеннова Е.В., Бобков А.Ф., Заседателев А.С., Покровский В.В., Мирзабеков А.Д.** Разработка биологических микрочипов для выявления мутаций устойчивости ВИЧ-1 к ингибиторам протеазы и результаты из применения // Вопросы вирусологии - 2004. № 49(6). - С. 10-15

- 4 **Roudinskii N.I., Sukhanova A.L., Kazennova E.V., Weber J.N., Pokrovsky V.V., Mikhailovich V.M., Bobkov A.F.** Diversity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 subtype A and CRF03_AB protease in Eastern Europe: Selection of the V77I variant and its rapid spread in injecting drug user populations // Journal of Virology. - 2004. - Vol. 78(20). - P. 11276-11287

5. **Bobkov A.F., Kazennova E.V., Selimova L.M., Khanina T.A., Ryabov G.S., Bobkova M.R., Sukhanova A.L., Kravchenko A.V., Ladnaya N.N., Weber J.N., Pokrovsky V.V.** Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: predominance of subtype A // The Journal of Medical Virology - 2004. - Vol. 74(2). - P. 191-196.

- 6 **Суханова А.Л., Рудинский Н.И., Богословская Е.В., Круглова А.И., Башкирова Л.Ю., Цыганова Г.М., Шипулин Г.А., Казеннова Е.В., Аликина Ю.И., Зверев С.Я., Гришечкин А.Е., Покровский В.В., Бобкова М.Р., Бобков А.Ф.** Полиморфизм области генома, кодирующей протеазу и обратную транскриптазу, вариантов ВИЧ-1 подтипа А, распространенных на территории СНГ // Молекулярная биология - 2005. № 39(6). - С. 1063-1071

- 7 **Гришечкин А.Е., Казеннова Е.В., Суханова А.Л., Белых С.И., Султанов Л.В., Демьяненко Э.Р., Плотникова О.И., Ладная Н.Н., Покровский В.В., Бобков А.Ф.** Молекулярно-эпидемиологическая характеристика ВИЧ-инфекции на территории Алтайского края // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии - 2006. № 1. - С. 15-19

8. **Sukhanova A., Roudinsky N., Kazennova E., Mikhailovich V., Pokrovsky V., Bobkov A.** The IDU-A HIV-1 variant bearing the V77I substitution in protease is spreading rapidly within the territory of the Former Soviet Union // HIV Medicine - 2004. - Preprint from Vol. 5. Abstracts of the 2nd European HIV Drug Resistance Workshop: From Basic Science to Clinical Implications. Rome, Italy. 11-13 March, 2004. - P. 4-5. - Abstract 7. P17

- 9 Sukhanova A.L., Pokrovsky V V, Kazennova E V, Bobkov A F, Weber J N, Roudinskii N I, Mikhailovich V.M Genetic diversity of HIV-1 subtype A and CRF03_AB protease at the territory of the former Soviet Union emergency and rapid spread of the V77I variant The XV International AIDS Conference Bangkok, Thailand 11-16 July, 2004 - Abstract book - Vol 1 - P 91 - Abstract MoOrC1011
- 10 Kazennova E V, Bobkov A F, Selimova L M, Khanina T A, Bobkova M R., Sukhanova A.L., Kravchenko A.V., Ladnay N N, Pokrovsky V V, Weber J N Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia The XV International AIDS Conference. Bangkok, Thailand, 11-16 July, 2004 - Abstract book - Vol 1 - P 104 - Abstract MoPeC3421
- 11 Roudinskii N I, Mikhailovich V.M., Bobkov A F, Sukhanova A.L. Noval microarray hybridisation technique for testing HIV protease inhibitors resistance The XV International AIDS Conference Bangkok, Thailand 11-16 July, 2004 - Abstract book - Vol 2 - P 37 - Abstract WePeB5694.
- 12 Sukhanova A.L., Bobkov A F, Roudinskii N I, Mikhailovich V M, Pokrovsky V V HIV-1 in Russia: study of the IDU-A *pol* variants The 3rd European HIV Drug Resistance Workshop From Basic Science to Clinical Implications Athens, Greece 30 March -1 April, 2005. - Abstract book - Abstract 12
13. Sukhanova A.L., Roudinskii N I, Mikhailovich V.M, Pokrovsky V.V, Bobkov A F Gradual accumulation of the V77I protease and A62V RT mutations by IDU-A HIV-1 isolates in the former USSR The 12th International Workshop on HIV Dynamics and Evolution Cleveland, Ohio, USA 23-26 April, 2005 - Abstract book. - P 53. - Abstract 50
- 14 Аликина Ю И, Суханова А.Л., Зверев С Я, Казеннова Е В, Гибадуллин Р Г, Бобкова М Р, Рудинский Н И, Покровский В В., Бобков А Ф Молекулярно-эпидемиологический мониторинг ВИЧ-инфекции на территории Пермской области, 1996—2004 гг. Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье» Суздаль, Владимирская обл 19-22 мая, 2005 - Сборник тезисов
- 15 Sukhanova A. L., Bogoslovskaya E V, Roudinskii N I, Shipulin G.A, Mikhailovich V M, Pokrovsky V V, Bobkov A F The IDU-A HIV-1 variants harbouring both V77I protease and A62V RT mutations are spreading rapidly within the territory of Russia The 3rd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment Rio de Janeiro, Brazil 24-27 July, 2005 - Abstract book - P 280 - Abstract WePe4 1C13
- 16 Roudinskii N, Sukhanova A., Markova O, Mikhailovich V, Zasedatelev A, Bobkov A F Oligonucleotide microarrays in epidemiological surveillance for HIV-1 strains in former USSR areas The 3rd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment. Rio de Janeiro, Brazil 24-27 July, 2005. - Abstract book - P 137. - Abstract MoPe15.2C10
- 17 Bogoslovskaya E V, Sukhanova A.L., Kruglova A I, Bobkova M R., Bashkirova L Yu, Tsyganova G.M, Shipulin G A, Bobkov A F, Pokrovsky V V Genetic polymorphism of HIV-1 in Russia The 10th European AIDS Conference (EACS) Dublin, Ireland 17-20 November, 2005 - Abstract book - P 31 - Abstract PE3 1/2
- 18 Zverev S, Alikina Y, Sukhanova A., Kazennova E, Roudinsky N, Bobkova M, Pokrovsky V, Bobkov A F Simultaneous spread of four subtype A HIV-1 variants among IDUs in Perm region of Russia The 10th European AIDS Conference (EACS) Dublin, Ireland 17-20 November, 2005. - Abstract book. - P 131-132 - Abstract PE17 2/1

Автор выражает глубокую благодарность и признательность

Алексее Филипповичу Бобкову и Вадиму Валентиновичу Покровскому за научное руководство, идею настоящей работы, полученные знания, постоянную помощь и поддержку при планировании, проведении исследования и анализе полученных данных;

Марине Ридовне Бобковой и Елене Валерьевне Казенновой за обучение основным профессиональным навыкам, участие, поддержку, терпение и помощь при написании диссертации, без которых она никогда бы не была завершена;

Людам, чьи данные и клинические образцы были исследованы в работе,

Сотрудникам федеральных и территориальных центров по профилактике и борьбе со СПИДом, принимавшим участие в сборе и передаче клинического материала и эпидемиологических данных, и лично Сергею Яковлевичу Звереву и Юлии Игоревне Аликиной;

Всему коллективу лаборатории вирусов лейкозов ГУ НИИ вирусологии имени Д И Ивановского РАМН за совместный труд по обработке и генотипированию исследованных образцов ВИЧ-1;

Владимиру Михайловичу Михайловичу, Никите Игоревичу Рудянскому и коллективу лаборатории биологических микрочипов НИИ молекулярной биологии имени В А Энгельгардта РАН за разработку, изготовление, предоставление микрочипов и помощь в проведении опытов по молекулярной гибридизации;

Герману Александровичу Шипулину, Анне Игоревне Кругловой, Елене Владимировне Богословской и коллективу научно-производственной лаборатории ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора за совместную работу по определению нуклеотидных последовательностей ВИЧ;

Владимиру Владимировичу Лукапову, Людмиле Фроловне Лидеман и Алексею Геннадиевичу Прилипову за прочтение рукописи, уделенное ей внимание, критические замечания и неоценимую помощь в формулировке ключевых положений диссертации

2006А
9604

№ - 9604

Подписано в печать 10.04.2006
Формат 60х90/16
Объем 1.00 п.л.
Тираж 100 экз.
Заказ № 19040608

Оттиражировано на ризографе в ООО «УниверПринт»
ИНН/КПП 7728572912\772801001
Адрес: 117292, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 8, кор. 2.
Тел. 125-22-73.
<http://www.univerprint.ru>