

УДК: 616.98:578.828HIV:575.174.015.3]-07

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ОБЛАСТИ ГЕНОМА ВИЧ-1, КОДИРУЮЩЕЙ ВИРУСНУЮ ИНТЕГРАЗУ

Н.М. Гашникова¹, А.В. Тотменин¹, В.В. Ивлев¹, Д.П. Зырянова¹,
Е.М. Астахова¹, М.П. Гашникова¹, Т.Н. Исмаилова²,
А.С. Чернов², В.Н. Михеев¹

¹Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

²Томский областной Центр по профилактике и борьбе со СПИД и другими инфекционными заболеваниями, Томск

Эпидемия ВИЧ-инфекции в России уникальна, для неё характерно распространение своих специфических вариантов ВИЧ-1 субтипов А, В и рекомбинантной формы CRF63_02A1. Нами изучены генетическая гетерогенность и натуральный полиморфизм области генома ВИЧ-1, кодирующей интегразу вируса среди 55 вариантов ВИЧ-1, выделенных из клинических образцов плазмы, собранных в 2015 году от инфицированных пациентов Сибирского региона. Исследование показало, что на развитие российской эпидемии оказывают существенное влияние рекомбинантные варианты ВИЧ-1; первичная распространенность мутаций лекарственной устойчивости в области, кодирующей интегразу, составила 7,3%; выявлен натуральный полиморфизм ВИЧ-1, специфичный для субтипа А и CRF63_02A1. **Ключевые слова:** ВИЧ-1, лекарственная устойчивость, субтип-специфический полиморфизм, CRF63_02A1

INVESTIGATION OF HIV-1 DIVERSITY IN THE INTEGRASE CODING REGION

N.M. Gashnikova¹, A.V. Totmenin¹, V.V. Ivlev¹, D.P. Zyryanova¹,
E.M. Astakhova¹, M.P. Gashnikova¹, T.N. Ismailova², A.S. Chernov², V.N. Mikheev¹

¹Department of Retroviruses, State research Center of Virology and Biotechnology Vector, Koltcovo

²Tomsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS and Other Infectious Diseases, Tomsk

The AIDS epidemic in Russia has unique features, showing co-circulation of HIV-1 subtypes A, B and CRF63_02A1. We have characterized the HIV-1 genetic diversity and natural polymorphisms at the integrase coding region from 55 plasma specimens collected in 2015 from HIV-1-infected pa-

tients in Siberian region. This study indicates an evolving HIV-1 epidemic in Russia with recombinant viruses; pretreatment HIV drug resistance was 7.3% and the occurrence of natural polymorphism in the IN region was subtype or CRF dependent.

Key words: HIV-1 drug resistance, integrase, subtype dependent polymorphism, CRF63_02A1

Высокоактивная антиретровирусная терапия ВИЧ-инфекции обычно включает комбинацию двух нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы и ненуклеозидный ингибитор транскриптазы или ингибитор протеазы вируса. Так как длительное применение таких ингибиторов может вызвать развитие устойчивости к препаратам, развитие побочных эффектов, существует необходимость расширения спектра эффективных лекарственных средств лечения ВИЧ-инфекции. Одним из современных классов анти-ВИЧ препаратов является группа ингибиторов интегразы ВИЧ-1. В России широкое применение в схемах терапии ВИЧ-инфекции начинает получать исентресс (ралтегравир), планируется включение в перечень и других ингибиторов интегразы ВИЧ-1 [5].

Известно, что в мире распространяются генетически отличающиеся варианты ВИЧ-1. В 1992 году были описаны основные генетические варианты вируса, объединенные в группы (M, N, O, P) и субтипы (A-K), разработана генетическая классификация ВИЧ-1. В 1995 году стало известно, что ВИЧ, кроме мутационной изменчивости, обладает еще одним биологическим механизмом, увеличивающим его разнообразие – способностью к обмену участками генома между отдельными вариантами вируса с образованием новых рекомбинантных (мозаичных) форм ВИЧ-1, а в 2001 были выявлены первые циркулирующие рекомбинантные формы ВИЧ. [3]. Эпидемия ВИЧ-инфекции в России уникальна, для неё характерно распространение своих специфических вариантов ВИЧ-1 субтипов A, B и рекомбинантной формы CRF63_02A1 [1, 2]. Тем не менее, в нашей стране практически отсутствует информация о распространенности мутаций в области генома ВИЧ-1, кодирующей интегразу, влияющих на чувствительность циркулирующих в нашей стране вариантов ВИЧ-1 к препаратам данного класса. Целью данной работы было изучение генетической гетерогенности и натурального полиморфизма области генома ВИЧ-1, кодирующей интегразу вируса, современных генетических вариантов ВИЧ-1, распространяющихся на территории Сибирского региона.

Материалы и методы

Клинические образцы плазмы крови были собраны от 55 лиц с ВИЧ-инфекцией, проживающих на территории Сибирского региона, с ноября 2014 по апрель 2015 года. Среди пациентов, привлеченных к исследованию, 91% не имели опыта применения антиретровирусной терапии (АРВТ), 9% лиц находились на АРВТ от 1 года до 5 лет, но схемы их терапии не включали ингибиторы интегразы ВИЧ-1. Исследование клинических образцов крови проведено с соблюдением этических стандартов и требований Хельсинской декларации 1975 года, требований Постановления Межпарламентской Ассамблеи государств - участников Содружества Независимых Государств от 18 ноября 2005 г. № 26-10 «О модельном законе «О защите прав и достоинства человека в биомедицинских исследованиях в государствах - участниках СНГ».

Из плазмы крови по стандартным методикам выделяли РНК ВИЧ-1. Генотипирование вариантов ВИЧ-1 проводили минимум по двум областям генома, кодирующим последовательности генов белков протеазы-ревертазы (область *pro-gag*)/интегразы (*in*)/основного белка оболочки вируса (*env*). Определение нуклеотидной последовательности осуществлялось на секвенаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США) с последующей обработкой первичных данных секвенирования в программе Sequencher 4.1.4 (GeneCodes, США). Филогенетический анализ выполняли с помощью программы "MEGA", версия 4.1, путем построения филогенетических деревьев методом ближайших соседей [4]. Нуклеотидные дистанции рассчитывали по методу Кимуры. В качестве референс-последовательностей использовали ранее охарактеризованные последовательности субтипов и групп ВИЧ-1 из международной базы данных (GenBank). Достоверность различий генетических характеристик штаммов ВИЧ 1 определяли методом бутстрэп-анализа при 500 повторениях. Выявление мутаций устойчивости ВИЧ-1 к ингибиторам интегразы проводили с помощью online-программы HIVdb Program, Genotypic Resistance Interpretation Algorithm, Sequence Analysis базы данных Стэнфордского университета (version 6.3.1) (<http://hivdb.stanford.edu>). Поиск ближайших гомологов ВИЧ проводили с помощью online-программы BLAST Национального центра биотехнологической информации США (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Результаты и обсуждение

Для всех 55 вариантов ВИЧ-1 были расшифрованы нуклеотидные последовательности гена, кодирующего интегразу ВИЧ-1. Для этой области вирусного генома был проведен углубленный анализ, включающий выявление филогенетических отношений, мутаций, отвечающих за чувствительность ВИЧ-1 к ингибиторам интегразы и мутаций, свойственных отдельным генетическим вариантам ВИЧ-1 – изучение субтип-специфического генетического полиморфизма. Среди 55 вариантов ВИЧ-1,

выделенных из клинических образцов плазмы, собранных в 2014-2015 годах от инфицированных пациентов Сибирского региона, распространенность генетических вариантов ВИЧ-1 распределилась следующим образом: CRF63_02A1 была выявлена в 69.1% исследованных образцов, субтип А – в 18.2%, в 11.0% случаев были выявлены уникальные рекомбинантные формы, возникшие в результате рекомбинации между вирусами субтипа А и CRF63_02A1, обозначенные нами как URF63_02A1/A, ВИЧ-1 субтипа В был обнаружен в 3.6%, и в 1.8% была выявлена уникальная рекомбинация между ВИЧ-1 субтипа А и вирусов среднеазиатского кластера CRF02_AG ВИЧ-1 – URF02_AG/63_02A1.

Выявление мутаций устойчивости ВИЧ-1 к ингибиторам интегразы, проведенное с помощью интернет-ресурса Стэнфордского университета показало, что в 7.3% случаев были найдены мутации, снижающие чувствительность ВИЧ-1 к ингибиторам интегразы. Интересно отметить, что в нашей случайной выборке присутствовали 2 человека, инфицированных ВИЧ-1 субтипа В. Один пациент был инфицирован более 12 лет назад во Владивостоке при совместном употреблении внутривенных наркотических препаратов (ПИН), другой также относился к группе риска ПИН, но был инфицирован в Краснодарском крае РФ около 5 лет назад. Оба пациента находятся 2 года на АРВТ, ингибиторов интегразы не принимали. При этом ВИЧ-1, выделенные у данных лиц, имели замену E157Q, определяющую снижение уровня устойчивости к элвитеграву и ралтеграву. Основные мутации, связанные с устойчивостью к препаратам, были выявлены у одного пациента, инфицированного CRF63_02A1 (G163R, вызывает слабое снижение чувствительности к элвитеграву и ралтеграву) и у пациента, инфицированного URF63_02A1/A (Y143S, может потенциально влиять на снижение чувствительности к элвитеграву и вызывает высокий уровень устойчивости к ралтеграву [6]).

Кроме мутаций, непосредственно определяющих пониженный уровень чувствительности ВИЧ-1 к ингибиторам интегразы, в большом количестве у исследованных вариантов ВИЧ-1 выявлялись вторичные, акцессорные мутации, способные опосредованно снижать эффективность действия анти-ВИЧ препаратов.

В этом отношении обращает на себя внимание замена L74I. Данная мутация относится к акцессорной группе мутаций, и по информации интернет-ресурса Стэнфордского университета, указанная мутация может выявляться в 23% наивных пациентов, инфицированных субтипом А ВИЧ-1. В нашем исследовании L74I была выявлена в 100% случаев среди вариантов субтипа А и URF63_02A1/A, область интегразы которых хотя бы частично была идентична консенсусной последовательности субтипа А ВИЧ-1. Один из двух вариантов исследованных вирусов субтипа В также нес замену L74I. При этом ни один из вариантов CRF63_02A1, отнесенных к этому геноварианту по области генома, кодирующей интегразу, не имел в геноме данной мутации.

Кроме L74I нами были выявлены ещё 8 полиморфных мутаций, имеющих характерную распространенность среди отдельных геновариантов ВИЧ-1. Ниже приведены частоты встречаемости мутаций в геновариантах субтипа А и CRF63_02A1. Из таблицы видно, что для вариантов субтипа А характерными мутациями генетического полиморфизма являются I72V и D167E. Кроме этого выявлена высокая распространенность R20K и D3E. Среди вариантов ВИЧ-1 CRF63_02A1 с повышенной частотой регистрируются замены E11D, K14R, S24N и M50I.

Таблица 1.

Генотип-специфическая распространенность мутаций ВИЧ-1 среди исследованных вариантов ВИЧ-1 субтипа А и CRF63_02A1

Мутация в области гена интегразы	I72V	D167E	R20K	D3E	E11D	K14R	S24N	M50I
Распространенность среди субтипа А ВИЧ-1, %	100	100	70	50	20	10	0	0
Распространенность среди CRF63_02A1, %	2.6	2.6	0	0	100	84.2	97.4	71.1

Выводы

Исследование показало, что на развитие российской эпидемии оказывают существенное влияние рекомбинантные варианты ВИЧ-1, распространенность которых на многих территориях Сибири превышает распространенность субтипа А ВИЧ-1. В связи с тем, что доминирующим в ряде современных территориальных эпидемий является новый, недавно возникший вариант CRF63_02A1, полученные в работе данные по особенностям нуклеотидной последовательности генома таких вирусов являются новыми и актуальными. Интерес также представляет выявленный натуральный полиморфизм ВИЧ-1, специфичный для субтипа А и CRF63_02A1. Особо значимыми для практической медицины представляются данные о зарегистрированной распространенности первичной лекарственной устойчивости к ингибиторам интегразы, которая среди наивных пациентов составила 7,3%.

Результаты проведенного исследования необходимо учитывать при внедрении в схемы терапии для ВИЧ-инфицированных лиц ингибиторов интегразы. Кроме того, вызывает беспокойство зарегистрированная 100% распространенность среди ПИН, инфицированных субтипом В ВИЧ-1 мутаций, снижающих чувствительность к ралтегравир и элвитегравир. Слишком маленькая выборка данных геновариантов ВИЧ-1 не позволяет делать значительные выводы, но указывает на острую актуальность продолжения исследований генетической гетерогенности, натурального полиморфизма и лекарственной устойчивости среди современных геновариантов ВИЧ-1, циркулирующих в разных группах риска и в отдельных регионах страны.

Литература

1. Baryshev PB, Bogachev VV, Gashnikova NM. The HIV-1 Genetic Diversity in Russia: CRF63_02A1, a New HIV-1 Genetic Variant Spreading in Siberia // *AIDS Research and Human Retroviruses*. doi:10.1089/aid.2013.0196
2. Riva C, Romano L, Saladini F, et al.: Identification of a possible ancestor of the subtype A1 HIV Type 1 variant circulating in the former Soviet Union // *AIDS Res Hum Retroviruses*. – 2008. – V. 24(10). – P. 1319-1325.
3. Robertson DL, Anderson, J.A. Bradac JA et al.: HIV-1 nomenclature proposal // *Science*. – 2000. – V. 288. – P. 55-56.
4. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. // *Mol. Biol. Evol.* - 2007, V. 24. – P. 1596-1599.
5. Zelalem Temesgen and Dawd S Siraj Raltegravir: first in class HIV integrase inhibitor *Ther Clin Risk Manag.* 2008 Apr; 4(2): 493–500; Blanco JL, et al. // *J Infect Dis.* – 2011. V. 203. – P. 1204-1214.
6. Zixin Hu and Daniel R. Kuritzkes Effect of Raltegravir Resistance Mutations in HIV-1 Integrase on Viral Fitness.

Сведения об авторах

Гашикова Наталья Матвеевна – кандидат биологических наук, заведующая отделом ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», E-mail: ngash@vector.nsc.ru