

Аналіз молекулярних особливостей українських ізолятів ВІЛ-1

Н. С. Пукіш, А. М. Щербінська¹, Н. О. Бабій¹, В. П. Поліщук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, Україна, 01033

¹Український центр профілактики та боротьби зі СНІДом МОЗ України
Вул. Миколи Амосова, 5, Київ, Україна, 03038

pukishn@ukr.net

*Проведено аналіз геному ВІЛ-1 у ділянці гена *pol* 64 зразків крові ВІЛ-інфікованих осіб з використанням методу визначення нуклеотидної послідовності нуклеїнової кислоти. Встановлено, що домінуючим серед досліджених зразків ВІЛ-1 виявився субтип А, а значна кількість зразків належить до циркулюючих рекомбінантних форм ВІЛ-1. За результатами аналізу наявних мутацій знайдено лише одну, пов'язану з розвитком резистентності ВІЛ-1 до антиретровірусних препаратів. У більшості зразків визначено поліморфічні заміни нуклеотидів у досліджуваній ділянці геному ВІЛ-1.*

Ключові слова: вірус імунодефіциту людини-1, поліморфічні заміни, мутації резистентності, рекомбінантні форми ВІЛ-1, субтип ВІЛ-1.

Вступ. Зі всіх інфекційних хвороб, виявлених уперше в 20-му столітті, синдром набутого імунодефіциту людини (СНІД) не лише кардинально вплинув на здоров'я людства, але й повністю змінив погляди та ставлення світової спільноти до інфекційних хвороб. Хоча СНІД не реєстрували як окреме захворювання до 1981 року, а вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) лише в 1983 році визначено його етіологічним агентом [1], ця хвороба стала причиною смерті більше 16 млн людей в усьому світі з початку епідемії та більше ніж 50 млн осіб на сьогодні є інфікованими ВІЛ [2].

До властивостей ВІЛ, що дозволяють йому швидко еволюціонувати та змінювати свій геном, а також формувати високогетерогенну популяцію, належать, серед інших, суттєвий рівень розмноження вірусу *in vivo*; велика кількість помилок у геномі вірусу ($1/10^4$ на сайт) [3–5]; значна ймовір-

ність формування рекомбінантних штамів ВІЛ-1 [6]. Це дозволяє припустити, що швидкість еволюції вірусу імунодефіциту людини є однією з найвищих. Ситуація ускладнюється тим, що у відповідь на застосування антиретровірусних препаратів (АРВП) ВІЛ може селекціонувати певні мутації, які часто призводять до формування штамів ВІЛ, стійких до окремого класу АРВП [7].

Мутації, що виникають або селектуються під впливом АРВ терапії, дозволяють вірусу уникати пригнічуючого впливу препарату на реплікацію вірусу. Клінічна значущість мутацій, які з'являються першими (первинні), та тих, що виникають пізніше (вторинні, допоміжні), до сьогодні дискутується. В цілому дія багатьох із згаданих мутацій може перебиватися чи доповнювати одна одну (табл. 1) [8].

Ми поставили задачу продовжити вивчення молекулярних особливостей ВІЛ, розпочате раніше: проаналізувати особливості субтипової структури

Таблиця 1

Основні мутації у геномі ВІЛ-1, пов'язані з розвитком резистентності ВІЛ-1

Мутації резистентності	Первинні мутації	Вторинні (допоміжні) мутації
До нуклеозидних інгібіторів ЗТ ВІЛ-1	M41L, K65NR, Ins 69, L74VI, V75TM, Y115F, Q151M, T215FY*	K43EQN, V118I, D67N, K70R, L210W, K219QE, K70EG, A62V, V75I, F77L, F116Y*
До нуклеозидних інгібіторів ЗТ ВІЛ-1	L100I, K101EP, K103NS, V106AM, Y188LHC, G190SE, M230L, K238NT*	K101NH, K103TH, V108I, F227LC, G190QCTV, K103R, L318F*
До інгібіторів протеази ВІЛ-1	L90M, N88DS, I84I, V82ATFS, L76V, G73ST, I54LMVT, G48VM, I47VA, M46IL*	L24F, L33I, M46V, F53Y, I54S, G73CA, V82MC, L10IV, I13V, K20RMI, M36I, D60*

*Дані про вплив мутацій на розвиток резистентності постійно поновлюються.

ВІЛ-1 у певних регіонах України, дослідити особливості накопичення мутацій резистентності та поліморфічних замін у геномі ВІЛ; оцінити рівень первинної резистентності ВІЛ в Одеській та Київській областях, де досвід застосування АРВ-терапії найдовший (з середини 90-х років минулого століття) та наймасовіший порівняно з іншими регіонами країни. Вивчення зазначених питань дасть змогу визначити молекулярні характеристики ВІЛ-1, що циркулює в даний час на території України.

Матеріали і методи. Матеріалом для даного дослідження стали 32 зразки крові ВІЛ-інфікованих пацієнтів Одеської області та 32 зразки крові ВІЛ-інфікованих пацієнтів м. Києва. Всі пацієнти, включені в дослідження, ніколи попередньо не отримували АРВ-препаратів та були інфіковані не більше 1 року.

Для аналізу геному ВІЛ-1 у досліджуваних зразках використано генотиповий підхід – аналіз нуклеотидної послідовності гена *pol* ВІЛ-1 у ділянках, які кодують білки протеази ВІЛ-1 (аналіз всього гена протеази в кодонах 1–99), та зворотної транскриптази (аналіз двох третіх частин гена в кодонах 1–335). Дослідження проводили з використанням тест-системи ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v.2.0 фірми «Abbott» (США). Аналітична чутливість тест-системи становить $2 \cdot 10^3$ копій РНК ВІЛ в 1 мл.

Аналіз нуклеотидної послідовності ВІЛ-1 включає кілька основних етапів:

– виділення тотальної РНК методом осадження її ізопропанолом: центрифугування плазми/сироватки крові при 25000 g протягом 1 год за темпера-

тури 2–8 °С; додавання лізуючого буферу з гуанідинтіоціанатом; додавання 100 %-го розчину ізопропанолу, центрифугування при 15 000 g упродовж 15 хв за кімнатної температури; додавання 70 %-го етанолу, центрифугування, аспірація РНК та розведення її у ділюєнті;

– етап зворотної транскрипції отриманої РНК на кДНК за допомогою зворотної транскриптази Recombinant Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MuLV Reverse Transcriptase);

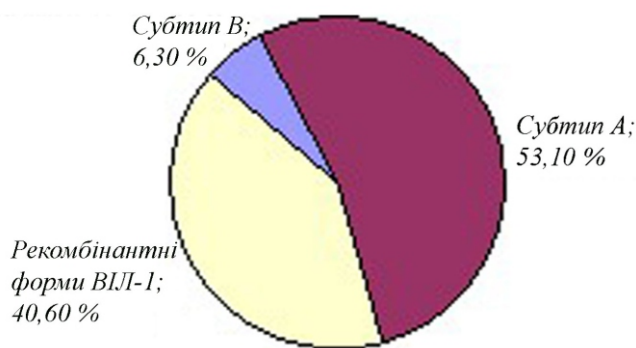
– ампліфікація цільового фрагмента ВІЛ-1 за допомогою ферменту полімерази AmpliTaq Gold® DNA Polymerase та специфічних праймерів на ампліфікаторі 2700 Thermal cycler («Applied Biosystems»), США. На даному етапі синтезується фрагмент ДНК довжиною 1,8 тис. п. н., що включає весь ген протеази та дві третини гена зворотної транскриптази ВІЛ-1;

– очищення та визначення концентрації отриманого продукту ампліфікації за допомогою горизонтального електрофорезу НК в агарозному гелі з використанням маркера молекулярної маси ДНК (2; 1,2; 0,8 нг);

– ампліфікація семи цільових фрагментів з термінаторами BigDye® Terminators, які працюють за принципом Зангера, на ампліфікаторі 2700 Thermal cycler («Applied Biosystems»);

– очищення отриманого продукту ампліфікації за допомогою 70 %-го розчину ізопропанолу;

– визначення нуклеотидної послідовності отриманого продукту ДНК за допомогою генетичного аналізатора 3100 Genetic Analyzer («Applied Biosystems»);



Субтипова структура ВІЛ-1 у досліджуваних зразках

– одержання консенсусної послідовності розміром 1,3 тис. п. н. з використанням програми ViroSeq Genotyping System Software v.2.6 та її аналіз.

Для встановлення субтипу вірусу користувалися міжнародною базою даних Стенфордського університету (<http://hivdb6.stanford.edu>), а для повного аналізу мутацій та визначення їхнього зв'язку з розвитком резистентності консенсусні послідовності аналізували, за допомогою кількох різних алгоритмів (GRADE_4/2007, ANRS_07/2006, HIVDB_4.3.0.2 та REGA_V7.1.1) (<http://www.hivgrade.de/grade/deployed/grade.pl?program=hivalg>) та програмного забезпечення ViroSeq Genotyping System Software v.2.6. Отримані послідовності для цього порівнювали з референтним штамом ВІЛ-1 НХВ-2.

Результати і обговорення. Субтипovu структуру отриманих послідовностей вивчали, визначаючи нуклеотидну послідовність усіх досліджуваних зразків у гені *pol* ВІЛ-1. Показано, що субтип А ВІЛ-1 домінує серед зразків і виявлений у 53,1 % випадків, у той час як субтип В – тільки в чотирьох зразках, що становить 6,3 % (рисунок).

Цікавим виявилось те, що приблизно 40 % усіх досліджуваних зразків були не «чистими» субтипами ВІЛ-1 (рисунок). Так, 23,4 % належали до субтипу А, визначеному за геном протеази, та до циркулюючої рекомбінантної форми ВІЛ-1 (circulating recombinant form – CRF) CRF01_AE, визначеної за геном ЗТ. Остання є найрозповсюдженішою у Південно-Східній Азії, зокрема в Таїланді [10]. Також виявлено чотири зразки (6,3 %), що належать до CRF01_AE ВІЛ-1, та п'ять (7,8 %) – до

CRF01_AE ВІЛ-1, визначеному за геном протеази, та до генотипу А, визначеному за геном ЗТ. До того ж знайдено по одному зразку CRF02_AG/H ВІЛ-1 і CRF02_AG/A ВІЛ-1. Рекомбінант CRF02_AG ВІЛ-1 є характерним для Західної та Центральної Африки. Існують дані про те, що, мігрувавши до Європи, CRF02_AG ВІЛ-1 на сьогодні є досить поширеним у Франції, Бельгії, Італії та Великій Британії, тоді як субтип Н характерний для країн Буркіна-Фасо, Малі, Нігерія, Габон, Конго, звідки даний рекомбінант ВІЛ-1 мігрував до Південної Європи та Азії [10].

Як і в попередніх дослідженнях, проведених у 2000–2002 рр. в різних регіонах України, домінуючим на сьогодні в Україні є субтип А ВІЛ-1 [11, 12]. До субтипу В належить лише 6,3 % з досліджених нами зразків, у той час як у зразках 2000–2002 рр. на частку субтипу В припадало 30 %. Окрім цього, привертає увагу поява рекомбінантних циркулюючих форм ВІЛ-1, а особливо CRF01_AE, яких не спостерігали у попередніх дослідженнях.

Таким чином, можна припустити, що за період останніх 4–5 років відбулася певна зміна субтипової структури ВІЛ-1, що циркулює в Україні. Частка субтипу В суттєво зменшилася порівняно з 2000–2002 роками, однак відсоток рекомбінантних форм різко підвищився.

Дослідження нуклеотидних послідовностей ВІЛ-1 для виявлення мутацій резистентності показало, що лише один з 64 досліджуваних зразків містить вірус з мутацією, пов'язаною з високим рівнем розвитку стійкості (табл. 2). В гені ЗТ ВІЛ у позиції 75 виявлено заміну амінокислоти валіну на метіонін (V75M), що належить до первинних мутацій [13].

Первинні, тобто основні мутації, – це мутації, що спричиняють істотне зниження чутливості вірусу до певного антиретровірусного препарату.

Вторинні, допоміжні, мутації можуть давати мінімальний ефект або зовсім не чинити впливу на рівень резистентності, проте за наявності первинних мутацій різко підвищують здатність вірусу до формування стійкості [8].

Усі інші мутації, виявлені в процесі аналізу, належать до вторинних чи допоміжних мутацій або ж до природних поліморфічних замін.

Таблиця 2

Вплив виявлених мутацій у гені зворотної транскриптази (ЗТ) ВІЛ-1 на розвиток резистентності вірусу до антиретровірусних препаратів (АРВП)

Мутації, виявлені у досліджуваних зразках	Ефект мутацій на розвиток резистентності ВІЛ-1 до АРВП
V75M	Первинна мутація спричиняє розвиток стійкості ВІЛ до інгібіторів ЗТ, а саме – до ставудину (d4T) та, можливо, діданозину (ddI) [13]
V179D	Вторинні мутації не змінює чутливості вірусу до АРВП (ANRS та Rega_V7.1.1 алгоритми) може викликати обмежену чутливість до кількох препаратів класу нуклеозидних інгібіторів ЗТ (група GRADE) призводить до потенційно низького рівня резистентності до АРВП (група HIVDB)
V118I	Вторинні мутації допоміжна мутація, селекціонується під впливом АРВП за присутності основних мутацій резистентності підсилює їхню дію та в комплексі спричиняє зниження чутливості ВІЛ до більшості нуклеозидних інгібіторів [14]; за відсутності первинних мутацій ефект мутації є невідомим
A62V	входить до комплексу мутацій Q151M, що призводять до розвитку мультирезистентності ВІЛ до нуклеозидних інгібіторів ЗТ [15]; сама ж мутація не впливає на зміну чутливості ВІЛ до АРВП
V106Q, K101Q, V35T, K122E, D123S, K173LSA, Q207A, R211S, V245MTK, A272P, T286A, E291D, I293V, T294T, I326V	поліморфічні заміни з мінімальним чи зовсім без будь-якого впливу на стійкість вірусу, зустрічаються у рівному співвідношенні у разі впливу АРВП на геном вірусу або без такого

В одному з досліджених зразків знайдено мутацію V179D із заміною амінокислоти валіну на аспарагінову кислоту в ділянці ЗТ у позиції 179. Оцінка впливу даної мутації на розвиток резистентності вірусу до АРВП є неоднозначною при застосуванні різних алгоритмів (табл. 2).

Два зразки виявилися з мутацією V118I в ділянці гена ЗТ у позиції 118. Ще один досліджуваний зразок містив мутацію A62V. Мутацію V106Q визначено в одному з досліджених зразків та K101Q – у двох зразках у гені ЗТ (табл. 1).

Допоміжні мутації в гені протеази, які підсилюють дію первинних мутацій резистентності і виявлені у нашому дослідженні, можна розділити на поліморфічні (L10I, I13V, K20I, M36I) та не поліморфічні (K43T, T74S), що виникають і селекціонуються під впливом АРВ-терапії. За відсутності мутацій, які спричиняють резистентність ВІЛ, як у нашому випадку, визначені мутації не впливають на зміну чутливості ВІЛ до АРВП [15, 16] (табл. 2).

Окрім цього, нами знайдено низку мутацій, які зустрічаються майже в усіх досліджених зразках як у гені протеази, так і в гені зворотної транскриптази. Серед них переважно поліморфічні заміни, мутації, що виникають та селектуються не під впливом АРВП. У гені протеази – це мутації E35D, M36I, R41K, H69K, L89M, а в гені ЗТ – V35T, K122E, D123S, K173LSA, Q207A, R211S, V245MTK, A272P, T286A, E291D, I293V, T294T, I326V. Однак варто відмітити, що дуже багато робіт існує на сьогодні саме за вивчення впливу поліморфічних заміни на чутливість ВІЛ-1 до АРВП [17] (табл. 2, табл. 3).

Отже, проведеними дослідженнями молекулярної структури ВІЛ-1, які циркулюють в Україні, показано, що домінуючим субтипом ВІЛ-1 залишається субтип А. Необхідно звернути увагу на різке зниження частки субтипу В ВІЛ-1 у порівнянні з попередніми роками. В літературі є дані про те, що перехід від концентрованої фази епідемії ВІЛ на певній території (тобто епідемії, об-

Таблиця 3

Вплив мутацій у гені полімерази ВІЛ-1 на розвиток резистентності вірусу до антиретровірусних препаратів (АРВП)

Мутації, виявлені у досліджуваних зразках	Ефект мутацій на розвиток резистентності ВІЛ-1 до АРВП
L10I, I13V, K20I, M36I	Допоміжні поліморфічні заміни
K43T, T74S	Допоміжні неpolіморфічні заміни
	Не впливають на розвиток резистентності ВІЛ-1 до АРВП за відсутності первинних мутацій

меженої певною групою ризику, наприклад, серед споживачів ін'єкційних наркотиків) до генералізованої фази (коли епідемія виходить за межі груп ризику) пов'язаний зі зміною субтипу В ВІЛ-1 на не-В субтипу [18], що й спостерігається у роботах інших авторів та наших дослідженнях. Окрім цього, потрібно зазначити, що доволі велика частка припадає на рекомбінантні циркулюючі форми ВІЛ-1, які не виявлялися раніше.

У геномі більшості вивчених зразків ВІЛ-1 виявлено як допоміжні, так і поліморфічні заміни нуклеотидів. На сьогодні питання зв'язку даних мутацій із розвитком резистентності залишається відкритим.

Оскільки знайдено лише один зразок, що містить вірус, резистентний до АРВП, наші дослідження дозволяють припустити, що на даному етапі розвитку епідемії ВІЛ/СНІДу в Україні розпочинаються формування та поширення резистентних штамів ВІЛ-1, проте рівень передачі цих вірусів до пацієнтів, які не отримують АРВП, є досить низьким. Межі поширення резистентних штамів можуть бути пов'язані з періодом застосування АРВ-терапії на певній території, охопленням терапією ВІЛ-позитивного населення, особливостями застосування АРВП та з ефективністю профілактичних заходів. Так, показано, що Велика Британія має один з найвищих рівнів розповсюдженості первинної резистентності до АРВП (14 %) у порівнянні із США (8–10 %), Францією (9 %) та іншими Європейськими країнами [9]. Держави Європи та США стали першими у застосуванні АРВ-терапії для ВІЛ-інфікованих пацієнтів, що й може обумовлювати високий ступінь розвитку резистентних штамів у даних країнах.

Вищевикладене обґрунтовує доцільність і необхідність проведення щорічного моніторингу за розвитком мутацій резистентності ВІЛ-1 та розповсюдженням їх серед населення.

N. S. Pukish, A. M. Shcherbinska, N. O. Babij, V. P. Polishchuk

Analysis of molecular features of the ukrainian isolates of HIV-1

Summary

Analysis of HIV-1 genome in the region of pol gene was performed by sequencing virus genome using 64 samples of blood from HIV-infected persons. Subtype A HIV-1 revealed to be dominating among investigated samples and a great number of samples belonged to a circulating recombinant forms of HIV-1. Analysis of mutations showed only one mutation connected with development of HIV-1 resistance to antiretroviral treatment. Most samples included polymorphic substitutions of nucleotides in the virus genome region studied.

Keywords: human immunodeficiency virus 1, polymorphic substitutions, resistance mutations, recombinant forms of HIV-1, subtype of HIV-1.

Н. С. Пукіш, А. М. Щербинская, Н. О. Бабий, В. П. Полищук

Анализ молекулярных особенностей украинских изолятов ВИЧ-1

Резюме

Проведен анализ генома ВИЧ-1 в области гена pol 64 образцов крови ВИЧ-инфицированных лиц с использованием метода определения нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоты. Установлено, что доминирующим среди исследованных образцов оказался субтип А, а значительное количество изолятов относится к циркулирующим рекомбинантным формам ВИЧ-1. В результате анализа обнаружена одна мутация, связанная с развитием резистентности ВИЧ-1 к антиретровирусным препаратам. В большинстве образцов выявлены полиморфические изменения нуклеотидов в исследованном участке генома ВИЧ-1.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека-1, полиморфические изменения, мутации резистентности, рекомбинантные формы ВИЧ-1, субтип ВИЧ-1.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Gallo R. C., Montagnier L. The discovery of HIV as the cause of AIDS // *New Engl. J. Med.*—2003.—**349**, N 24.—P. 2283–2285.
2. UNAIDS. AIDS Epidemic Update: December 2007.
3. Requejo H. Worldwide molecular epidemiology of HIV // *Rev. Saude Publica.*—2006.—**40**, N 2.—P. 331–345.
4. Peters M., Sharp R. M. Genetic diversity of HIV-1: the moving target // *AIDS.*—2000.—**14**, № 3.—P. 129–140.
5. McCutchan F. E. Understanding the genetic diversity of HIV-1 // *AIDS.*—2000.—**14**, № 3.—P. 31–44.
6. Barlet J., Galant J. Clinical aspects of HIV-infection.—M.: EnRus, 2007.—557 p.
7. de Ronde A., van Dooren M., van der Hoek L., Bouwhuis D., de Rooij E., van Gemen B., de Boer R., Goudsmit J. Establishment of new transmissible and drug sensitive human immunodeficiency virus type 1 wild types due to transmission of nucleoside analogue-resistant virus // *J. Virol.*—2001.—**75**.—P. 595–602.
8. Clavel F., Hance A. HIV drug resistance // *New Engl. J. Med.*—2004.—**350**, N 10.—P. 1023–1035.
9. Vijver D., Wensing A., Boucher C. The epidemiology of transmission of drug resistant HIV-1. Sequence compendium 2006/2007.—Los Alamos, 2007.—P. 17–36.
10. Tatt L., Barlow K., Nicoll A., Clewley J. The public health significance of HIV-1 subtypes // *AIDS.*—2001.—**15**, N 24.—P. 59–71.
11. Saad M., Shcherbinskaya A., Nadai Y., Kruglov Y., Antonenko S., Lyulchuk M., Kravchenko O., Earhart K., Sanchez J., Birx D., Carr J. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Ukraine: birthplace of an epidemic // *AIDS Res. and Hum. Retroviruses.*—2006.—**22**, N 8.—P. 709–714.
12. Nabatov A., Kravchenko O., Lyulchuk M., Shcherbinskaya A., Lukashov V. Simultaneous introduction of HIV type 1 subtype A and B viruses into injecting drug users in southern Ukraine at the beginning of the epidemic in the former Soviet Union // *AIDS Res. and Hum. Retroviruses.*—2002.—**18**, N 12.—P. 891–895.
13. Johnson V., Vezinet F., Clotet B., Gunthart H., Kuritzkes D., Pillay D., Shapiro J., Richman D. Update of drug resistance mutations in HIV-1: 2007 // *Top. HIV Med.*—2007.—**15**, N 4.—P. 119–125.
14. Johnson V., Brun-Vezinet F., Cloet B., Gunthart H., Kuritzkes D., Pillay D., Shapiro J., Richman D. Update of Drug Resistance Mutations in HIV-1: 2006 // *Top. HIV Med.*—2006.—**14**, N 3.—P. 125–130.
15. Shafer R., Rhee S., Pillay D., Miller V., Sandstrom P., Shapiro J., Kuritzkes D., Bennet D. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance // *AIDS.*—2007.—**21**.—P. 215–223.
16. HIV drug resistance mutations by drug class (January 28, 2008) – <http://hivdb.stanford.edu>.
17. Sukasem C., Churdboonchart V., Sukeepaisarncharoen W., Piroj W., Inwisai T., Tiensuwan M., Chantratita W. Genotypic resistance profiles in antiretroviral-naïve HIV-1 infections before and after initiation of first-line HAART: impact of polymorphism on resistance to therapy // *Int. J. Antimicrob. Agents.*—2008.—**31**, N 3.—P. 277–281.
18. Hu D., Subbarao S., Vanichseni S., Mock P., Ramos A., Nguyen L., Chaowanachan T., Griensven F., Choopanya K., Mastro T., Tappero J. Frequency of HIV-1 dual subtype infections, including intersubtype infections, among injection drug users in Bangkok, Thailand // *AIDS.*—2001.—**19**, N 3.—P. 303–308.

УДК 587.828

Надійшла до редакції 03.09.08