

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ВАРИАНТОВ ВИЧ-1, РЕЗИСТЕНТНЫХ К АНТИРЕТРОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ

**© Никонорова Ю.В.^{*}, Лаптева Т.А.[♦], Богачев В.В.[♥],
Барышев П.Б.[♠], Мещерякова Ю.В.[•],
Черноусова Н.Я.[▽], Гашикова Н.М.[◇]**

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирский областной Центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями, Новосибирская область, п. Кольцово

Проведена изоляция ВИЧ-1 от инфицированных ВИЧ пациентов, получавших курсы специфической химиотерапии. Из 18 образцов периферической крови в 10 случаях удалось выделить инфекционные изоляты ВИЧ-1. Выделенные после сокультивирования с клетками здоровых доноров варианты ВИЧ-1 содержали мутации устойчивости к нуклеозидным и нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы и ингибиторам протеазы. Сравнительный анализ спектра мутаций, выявленных в геноме вариантов ВИЧ-1, выделенных из образцов плазмы крови и вариантов ВИЧ после их изоляции показал, что большее число мутаций устойчивости сохранилось после культивирования изолятов ВИЧ на моноклеональных клетках крови без добавления антиретровирусных препаратов. В нескольких случаях в геноме ВИЧ-1 после изоляции вируса зафиксировано появление мутаций лекарственной устойчивости, не наблюдавшихся в соответствующих вариантах ВИЧ-1 до культивирования. Значительная часть изолятов ВИЧ-1 показала уровень репликативной активности, сопоставимый с таковым для ранее выделенных вариантов ВИЧ-1, не имеющих мутаций устойчивости к антиретровирусным препаратам. Репродуктивные свойства представленных в работе изолятов ВИЧ-1 позволяют использовать их для оценки эффективности разрабатываемых антиретровирусных средств в отношении устойчивых к АРВП вариантов ВИЧ-1 с использованием модели культур клеток.

Одной из главных причин неэффективности терапии при лечении ВИЧ-инфекции является возникновение резистентных к действию лекарственных

^{*} Младший научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

[♦] Аспирант ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

[♥] Младший научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

[♠] Стажер-исследователь ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

[•] Врач-инфекционист Новосибирского областного Центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями.

[▽] Главный врач Новосибирского областного Центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями.

[◇] Заведующий отделом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», доктор биологических наук.

препаратов вариантов ВИЧ. Это вынуждает проводить поиск новых лекарств, обладающих антиретровирусной активностью, в том числе и в отношении вариантов ВИЧ-1, устойчивых к антиретровирусным препаратам (АРВП). Наиболее распространенным и доступным методом оценки эффективности разрабатываемых препаратов является исследование ингибирующего действия веществ на ВИЧ-1 в культуре зараженных клеток. Для проведения такого анализа необходимо наличие набора современных генетически отличающихся вариантов ВИЧ-1, при этом особое значение имеет присутствие в коллекции изолятов ВИЧ-1, обладающих мутациями устойчивости к АРВП. Большинство резистентных ВИЧ, появившихся под давлением лекарственных препаратов, обладают пониженным уровнем репликативной активности. Это чаще всего обусловлено наличием мутаций устойчивости к АРВП, и осложняет их культивирование *in vitro*. В некоторых случаях резистентные к АРВП варианты ВИЧ могут содержать так называемые компенсаторные мутации, которые позволяют вирусу успешно реплицироваться в клетках с сохранением мутаций устойчивости. Целью данной работы была изоляция вариантов ВИЧ-1 от инфицированных пациентов, получавших курсы антиретровирусной терапии и изучение генетических и репликативных особенностей выделенных вирусов.

Материалы и методы исследования

Образцы для исследования были получены от ВИЧ-инфицированных пациентов Новосибирского областного Центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями, получавших курсы АРВП, включающие нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ и ННИОТ) и ингибиторы протеазы ВИЧ-1 (ИП).

Выделение изолятов ВИЧ проводили методом сокультивирования мононуклеаров периферической крови (МПК) ВИЧ-инфицированных пациентов с предварительно стимулированными фитогемагглютинином МПК здоровых доноров [9]. Длительность культивирования варьировала для разных изолятов и составляла от 7 до 30 суток. Репликацию вируса оценивали по уровню накопления вирусспецифического белка р24, определяемого в иммуоферментном анализе. Идентификация субтипа ВИЧ-1, выявление мутаций в геноме вируса, ассоциированных с устойчивостью к антиретровирусным препаратам, проводили путем секвенирования последовательности гена *pol* и последующего анализа полученных данных с использованием специализированных программных ресурсов [6, 7, 8, 11]. Выделение РНК ВИЧ-1 для построения кДНК и секвенирования проводили как из плазмы крови инфицированных ВИЧ пациентов, так и из проб культуральной жидкости, отобранных в процессе изоляции ВИЧ-1.

Результаты

В работе были предприняты попытки изоляции инфекционных ВИЧ-1 из образцов МПК крови от 18 ВИЧ-инфицированных пациентов центра СПИД,

получавших курсы антиретровирусной терапии. Для 10 из 18 образцов со-культивирование МПК ВИЧ-инфицированных пациентов с мононуклеарами здоровых доноров сопровождалось активной репликацией ВИЧ, определяемой по увеличению концентрации вирусспецифического белка p24 в пробах культуральной жидкости, отбираемых в процессе изоляции ВИЧ с интервалом 3–4 суток.

Исследование геномов выделенных изолятов ВИЧ-1 показало, что 4 изолята относятся к субтипу А, один изолят – к субтипу В и 5 изолятов являются рекомбинантными формами CRF02_AG ВИЧ-1.

Анализ полученных последовательностей области гена *pol* вариантов ВИЧ-1, выделенных из плазмы инфицированных пациентов, показал наличие мутаций устойчивости к НИОТ (12), ННИОТ (9) и в двух случаях к ингибиторам протеазы. Для двух вариантов ВИЧ-1 из плазмы крови (1А, 1В) данных по нуклеотидным последовательностям получить не удалось.

Таблица 1

Спектр выявленных мутаций в геноме исследованных вариантов ВИЧ-1, определяющих развитие устойчивости к АРВП и данные по накоплению вирусспецифического белка p24 на 7 сутки культивирования исследованных вариантов ВИЧ-1 на мононуклеарных клетках периферической крови

Изолят ВИЧ-1	Суб-тип	Мутации в гене <i>pol</i> , выявленные у вариантов ВИЧ-1 в плазме крови	Мутации в гене <i>pol</i> , выявленные у изолированных ВИЧ-1 (после культивирования)	Концентрация p24 на 7 сутки (пкг/мл)
1А	А	Нет данных	A62V, M184V , T215I , K219Q	$8,7 \times 10^3$
2А	А	N88D , A62V, Q151D, V90I, E138N	A62V, M184V	$5,3 \times 10^2$
4А	А	A62V, E138A	A62V, K103KN , E138A	$9,6 \times 10^3$
5А	А	A62V, V751V , M184V	A62V, L74LV	$2,0 \times 10^3$
1AG	AG	L10FL , K70IKRT , M184V , K103N , Y181CFSY	K70IKRT , M184V , K103N , Y181CFSY	$9,3 \times 10^2$
2AG	AG	M184V , K219N , Y181C	M184V , K219N , K103N , Y181C	$6,6 \times 10^4$
3AG	AG	K103N	K103N	$3,6 \times 10^4$
4AG	AG	L210FL, K103N	-	$1,8 \times 10^2$
5AG	AG	T215Y , K103N	-	$8,6 \times 10^3$
1В	В	Нет данных	K103N , Y188HY	$2,3 \times 10^3$

Результаты секвенирования ВИЧ-1 из образцов культуральной жидкости, отобранных при изоляции вирусов, показали некоторые отличия по набору мутаций в сравнении с мутациями, полученными для соответствующих ВИЧ из плазмы крови пациентов (табл. 1). Два изолята рекомбинантной формы 02_AG ВИЧ-1 (4AG и 5AG) полностью утратили мутации устойчивости в ходе культивирования. Мутации T215Y, V751V, K70IKRT, K219N и N88D и в плазме и в культуральной жидкости встречались всего по одному разу, либо вообще утрачивались в ходе культивирования. Наиболее часто встречающи-

мися среди изученных образцов плазмы оказались мутации устойчивости K103N, M184V и Y181C. По одному случаю обнаружены N88D и L10F, определяющие устойчивость к ингибиторам протеазы [2, 7]. Замены M184V, K70IKRT, K219N, T215Y, T215I, L74LV и V75IV связывают со снижением чувствительности ВИЧ-1 к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы, тогда как замены K103KN, Y181C, Y188NY опосредуют резистентность к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы [2-5, 7].

Кроме мутаций, ассоциированных с устойчивостью к АРВП, в нуклеотидных последовательностях выделенных изолятов выявились сопутствующие замены, которые имеют значение для развития резистентности только при появлении в связке со значимыми мутациями, или роль которых в развитии резистентности полностью не определена (A62V, E138A, Q151d, L210FL).

Исследование кинетики роста изолятов ВИЧ-1 в культуре МПК выявило некоторые особенности их репликативной активности. Наиболее высокая концентрация белка р24 на 7 сутки культивирования была показана для изолята 2AG ВИЧ-1, несущего мутации M184V, K219N, K103N, Y181C, которая составила $6,6 \times 10^4$ пкг/мл. Самым низким уровнем накопления белка р24 на 7 сутки в изученной группе изолятов ВИЧ-1 характеризовался вариант 4AG, утративший в ходе культивирования мутации L210FL и K103N. Концентрация р24 для него составила $1,8 \times 10^2$ пкг/мл.

Обсуждение

К настоящему времени накопилось большое число работ по исследованию влияния мутаций устойчивости на репликативную активность изолятов ВИЧ-1. В большинстве случаев фиксируется снижение уровня репликации резистентного вируса по сравнению с вариантами ВИЧ-1 дикого типа, не обладающими нуклеотидными заменами, связываемыми со снижением чувствительности к антиретровирусным препаратам [2-5, 10, 12]. В нашем случае только сокультивирование десяти из восемнадцати образцов сопровождалось устойчивым детектируемым приростом вирусспецифического белка р24. Однако для большинства выделенных нами изолятов репликативная активность была вполне сопоставима с таковой для ранее выделенных нами изолятов ВИЧ-1, не несущих в геноме типичных мутаций устойчивости к АРВП. Исключение могут составить два изолята рекомбинантной формы AG ВИЧ-1 (4AG и 1AG), концентрация р24 для которых на 7 сутки была равна $1,8 \times 10^2$ и $9,3 \times 10^2$ пкг/мл, что на 1-2 порядка меньше по сравнению с другими исследованными изолятами. Низкий уровень репликативной активности изолята 1AG вполне можно связать с влиянием целого ряда мутаций устойчивости, выявленных в его геноме (K70IKRT, M184V, K103N и Y181CFSY). Что касается изолята 4AG, то по набору выявленных в гене pol мутаций трудно утверждать, что именно они явились причиной снижения его репликативной активности. Так в отношении замены L210FL не удалось найти данных о ее влиянии на репликацию ВИЧ-1.

Тем не менее, при изоляции варианта 4AG, устойчивый к АРВП вариант вируса не смог конкурировать с изолятом дикого типа, о чем свидетельствуют результаты секвенирования ВИЧ-1, выделенного из образца культуральной жидкости, полученного после культивирования варианта 4AG. То же самое наблюдалось для изолята 5AG, так же утратившего мутации устойчивости к АРВП в ходе культивирования. В случае с этим изолятом есть основание главную роль в снижении репликативной активности отвести мутации T215Y, так как имеются данные исследований, в которых эта замена ассоциируется с ухудшением репродукции вируса [2-4]. Тем не менее, в ряде случаев снижение репликативной активности может быть обусловлено особенностями других участков генома вируса, не исследованных в данной работе. Так, в случае с изолятом 2AG наблюдается достаточно высокий уровень репликативной активности (концентрация p24 на 7 сутки – $6,6 \times 10^4$ пкг/мл), при этом результаты секвенирования демонстрируют присутствие целого ряда мутаций, ассоциированных со снижением чувствительности к АРВП. Подобная ситуация может свидетельствовать о том, что мутации, определяющие резистентность, найденные в данном варианте ВИЧ, возникли после появления, так называемых, компенсаторных изменений генома [2]. Последнее обстоятельство в ряде случаев позволяет вирусу с мутациями устойчивости к АРВП успешно размножаться в культуре клеток без давления препаратов [5]. Более того, при анализе нуклеотидных последовательностей области гена *pol* вариантов ВИЧ-1 из сыворотки пациента и из проб культуральной жидкости, отобранных после культивирования, в отношении изолятов 4А и 2AG наблюдается не утрата мутаций, а наоборот, появление ранее не зафиксированных замен, ассоциированных с устойчивостью. При исследовании генома изолята 2А из проб культуральной жидкости была зафиксирована мутация M184V, не наблюдавшаяся при изучении вируса, выделенного из плазмы крови пациента. Это может быть связано с чувствительностью метода секвенирования нуклеотидных последовательностей, имеющих различную представленность в составе вирусной популяции, находящейся в организме человека. Известно, что каждый изолят ВИЧ-1 представляет собой популяцию квазивидов вируса, генетические последовательности которых, в зависимости от пропорций различных геномов, могут синтезироваться и, соответственно, терминироваться с меньшей вероятностью, что может изменять картину присутствия мутаций в динамично развивающейся системе [5].

Кроме возникновения в ходе культивирования замен в геноме ВИЧ, не определявшихся при исследовании соответствующих вирусов из плазмы, а также полного исчезновения мутаций устойчивости в геноме ВИЧ, в нашем исследовании имели место случаи их частичной утраты. Например, изолят 2А утратил в ходе культивирования мутацию устойчивости к ингибиторам протеазы ВИЧ-1 N88D. При изучении данных анализа последовательностей изолята 5А в образце вируса из культуральной жидкости были выявлены утраты мутации V75IV и M184V и появление замены L74LV.

Возможно, последнее также объясняется отличиями в представленности разных вариантов вируса в первоначальной смеси квазивидов.

* * *

В результате проведенного исследования выделены 10 изолятов ВИЧ-1 от инфицированных пациентов, получавших разные схемы антиретровирусной терапии, включающие НИОТ, ННИОТ и ИП. Изучены спектры мутаций устойчивости выделенных изолятов ВИЧ-1, стабильность поддержания мутаций и репликативные характеристики изолятов. Анализ полученных данных показал, что активность репликации резистентных вариантов ВИЧ-1 не всегда соответствует ожиданиям, основанным на анализе нуклеотидной последовательности области гена *pol* вируса. Получены активно реплицирующиеся изоляты ВИЧ-1, содержащие наиболее распространенные мутации, определяющие резистентность к применяемым для терапии ВИЧ-инфекции препаратам. Выявлено, что из 10 изолятов 4 относятся к субтипу А, 5 – к CRF02_AG и 1 – к субтипу В ВИЧ-1. Показано, что наиболее распространенными среди изученных изолятов явились мутации устойчивости к ННИОТ и НИОТ: K103N, Y181C и M184V. В большинстве случаев мутации устойчивости к АРВП при изоляции вирусов без добавления соответствующих препаратов на культуре МПК сохранились. Установлено, что уровень репликативной активности на 7 сутки культивирования изолятов ВИЧ-1 в среде, не содержащей АРВП, для большинства изученных изолятов ВИЧ-1 был сопоставим с таковым для ранее охарактеризованных нами ВИЧ-1, не несущих мутаций устойчивости.

Полученные в настоящей работе результаты указывают на возможность использования созданной коллекции выделенных изолятов ВИЧ-1, несущих различные наборы мутаций устойчивости к АРВП, для поиска перспективных антиретровирусных препаратов, обладающих эффективностью в отношении вариантов ВИЧ-1, резистентных к широко применяемому в настоящее время лекарственным средствам.

Список литературы:

1. Унагаева Н.В., Сафронов П.Ф., Никонорова Ю.В., Богачев В.В., Тотменин А.В., Гуторов В.В., Букин Е.К., Гашникова Н.М. Выделение изолятов ВИЧ, имеющих эпидемиологическую значимость на территории Новосибирской области // Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов организаций Роспотребнадзора. – Оболениск, 2009. – С. 157-158.
2. Clotet B., Menendez-Arias L. at all. Guide to management of HIV drug resistance, antiretrovirals pharmacokinetics and viral hepatitis in HIV infected subjects. – Ninth edition. – 2009. – 408 p.
3. Cong M., Heneine W., and Garcí'a-Lerma J. G. The Fitness Cost of Mutations Associated with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resis-

tance Is Modulated by Mutational Interactions // J. Virology. – Vol. 81, No. 6. – 2007. – P. 3037-3041.

4. Dykes C., Demeter L. M. Clinical Significance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Fitness // Clinical microbiology reviews. – Oct. 2007. – P. 550-578.

5. Gao Y., Paxinos E., Galovich J., et al. Characterization of a Subtype D Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolate That Was Obtained from an Untreated Individual and That Is Highly Resistant to Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors // J. of Virology. – May 2004. – P. 5390-5401.

6. <http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de>.

7. <http://hivdb6.stanford.edu>.

8. <http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm>.

9. Human Retrovirus Protocols Virology and Molecular Biology / Edited by Tuofu Zhu, MD. – Humana Press. – Totowa, New Jersey, 2005. – 495 p.

10. Martinez-Picado J., Savara A.V., Sutton L., D'Aquila R. T. Replicative Fitness of Protease Inhibitor-Resistant Mutants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 // J Virol. – 1999 May. – 73 (5). – P. 3744-3752.

11. Tamura K., Dudley J., Nei M and Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol Biol Evol. – 2007. – Vol. 24. – P. 1596-1599.

12. Zennou V., Mammano F., Paulous S. Loss of Viral Fitness Associated with Multiple Gag and Gag-Pol Processing Defects in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants Selected for Resistance to Protease Inhibitors In Vivo // J. Virology. – 1998. – Vol. 72, No. 4. – P. 3300-3306.

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНДОКРИННОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ АКУЛЫ (*CHILLOSYLUM PUNCTATUM*)

© Савельева Е.С.^{*}, Прощина А.Е.[♦]

Научно-исследовательский институт Морфологии человека РАН, г. Москва

Исследована поджелудочная железа акулы *Chilosyllium punctatum* (Müller and Henle, 1838). Проведены: макроанатомическое, гистологическое и иммуногистохимическое исследования. Для гистологического исследования применялись методы окраски Гематоксилин-эозином, по Гроссо, по Ван Гизону, по Маллори. Для иммуногистохимического исследования использовались реактивы: мышинные моноклональные антитела к глюкагону, инсулину и нейрон специфической эналазе (NSE) фирмы Lab Vision, а также кроличьи поликлональные антитела к сомато-

^{*} Научный сотрудник лаборатории Развития нервной системы.

[♦] Научный сотрудник лаборатории Развития нервной системы.