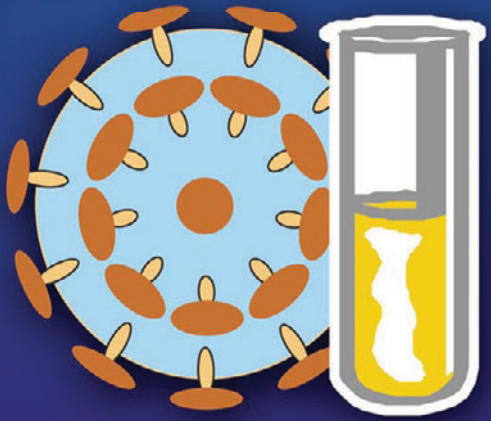
Бобкова М.Р.

Лекарственная устойчивость ВИЧ











ББК 28.074
Б 72

Бобкова М. Р.
Б 72 Лекарственная устойчивость ВИЧ. – М.: Человек, 2014. – 288 с.

ISBN 978-5-906131-42-3

Автор книги «Лекарственная устойчивость ВИЧ» – Бобкова Марина Ридовна, доктор биологических наук, заведующая отделом общей вирусологии НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ. Это очередное издание из серии книг автора, посвященных изучению биологии, патогенеза, диагностики и некоторых аспектов лечения ВИЧ-инфекции.

В книге подробно рассматриваются теоретические и прикладные вопросы резистентности ВИЧ, а также современные лабораторные методы ее исследования. Даны рекомендации по срокам и показаниям к назначению анализа генотипа ВИЧ, клинической интерпретации его результатов с применением современных Интернет-ресурсов, а также организации эпидемиологического мониторинга лекарственной устойчивости в соответствии с международными рекомендациями. Книга включает 8 глав, содержит 16 таблиц и 208 цветных рисунков, а также список сокращений.

В основу книги положены лекции, прочитанные автором и его коллегами в ходе проведения цикла семинаров по лекарственной устойчивости ВИЧ. Значительный объем информации, который не получил достаточного освещения в лекционном курсе, нашел свое отражение в этом издании. Его целевую аудиторию, по предположениям автора, составят специалисты, занимающиеся диагностикой, лечением и профилактикой ВИЧ-инфекции, а также врачи многих других специальностей, организаторы здравоохранения и студенты медицинских вузов.

Книга издана на средства гранта Евросоюза N 223131 CHAIN, посвященного лекарственной устойчивости ВИЧ и выполнявшегося в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ в 2009-2014 гг.

ББК 28.074

© Бобкова М.Р. 2014
© Издательство «Человек», издание, оформление, 2014

ISBN 978-5-906131-42-3

Содержание

Сокращенные наименования лекарственных АРТ-препаратов 8
Список сокращений 9

I ГЛАВА.
Базовые сведения о биологии и патогенезе ВИЧ-инфекции 10

Размножение ВИЧ в клетке 10
Основные мишени антиретровирусной терапии 14
Клеточные факторы – потенциальные мишени терапии ВИЧ-инфекции 16
Современные представления о патогенезе ВИЧ-инфекции 21
Латентность ВИЧ 27

II ГЛАВА.
Эволюционные события в популяции ВИЧ. 32

Динамика популяции ВИЧ в организме человека 32
Понятие о полиморфизме ВИЧ, квазивиды 33
Репликация и мутации генома ВИЧ 34
Эволюция мутаций 39
Рекомбинация и ее роль в эволюционном процессе. 41
Происхождение и природное разнообразие ВИЧ 45
Значение естественного полиморфизма ВИЧ 48
Популяция ВИЧ под действием ВААРТ 52
Резервуары ВИЧ и их роль в лекарственной устойчивости 58

III ГЛАВА.
Основные понятия и концепции резистентности. 62

Номенклатура мутаций резистентости ВИЧ. 62
Устойчивость, репликативные свойства и фитнес ВИЧ 64
Виды мутаций устойчивости ВИЧ 69
Множественная и перекрестная лекарственная устойчивость,
гиперчувствительность 70
Генетический барьер резистентности ВИЧ. 72
Внутриклеточный метаболизм антиретровирусных препаратов. 74
Фармакокинетика антиретровирусных препаратов 77
Фармакологический барьер резистентности ВИЧ 81
Приверженность и ее роль в формировании устойчивых штаммов 85
Генетика человека и устойчивость ВИЧ 90

IV ГЛАВА.
Частные механизмы лекарственной устойчивости ВИЧ. 94

Ферменты ВИЧ, механизмы действия и устойчивость к ингибиторам 94
Ингибиторы слияния и устойчивость к ним 107
Антагонисты корецепторов, тропизм и устойчивость 108
Другие и перспективные препараты ВААРТ 111
Наиболее часто встречающиеся мутации и сочетания 117
Связь между приверженностью и резистентностью к различным классам препаратов 120

V ГЛАВА.
Лабораторный анализ резистентности ВИЧ 126

Способы анализа устойчивости ВИЧ 126
Генотипирование ВИЧ 129
Методы секвенирования нового поколения 138
Фенотипическое тестирование устойчивости. 147
Сравнение способов тестирования резистентности ВИЧ 157
Дискордантные результаты гено- и фенотипирования 160
Виртуальный фенотип 161
Анализ тропизма ВИЧ 164
Ограничения возможностей тестов для анализа резистентности ВИЧ 174
Методы определения репликативной способности ВИЧ. 175

VI ГЛАВА.
Клиническая интерпретации данных анализа резистентности ВИЧ. . 181

Алгоритмы интерпретации результатов генотипирования ВИЧ 183
Расхождения результатов между генотипическими алгоритмами интерпретации 185
Формы отчетов о генотипе ВИЧ и их анализ 186
Формы отчета о фенотипе ВИЧ и их анализ 197
Анализ отчетов о виртуальном фенотипе 200
Анализ отчета о тропизме ВИЧ 203
Клиническое значение подтиповой принадлежности ВИЧ 206
Клиническое значение минорных вариантов ВИЧ. 210
Резистентность ВИЧ в разных комппартментах организма 216

VII ГЛАВА.
Принципы назначения и замены терапии на основе данных генотипирования ВИЧ 221
Тестирование резистентности ВИЧ у наивных пациентов 223
Выбор первичной схемы терапии и профилактика резистентности ВИЧ . . . 225
Мониторинг эффективности терапии 228
«Подскоки» и низкая виремия 229
Вирусологический неуспех и признаки резистентности ВИЧ 233
Правила взятия образца крови для тестирования резистентности 235
Алгоритм замены схемы лечения на основе данных о резистентности 236
Подсчет баллов генотипической чувствительности. 240
Взаимодействие лекарственных препаратов и АРТ 242
Прогнозирование оптимальных схем терапии с помощью системы EuResist 243
Рекомендации по анализу тропизма ВИЧ 250
Замена вирусологически успешной схемы. 252
Прерывание терапии 253
Постконтактная профилактика и резистентность 256
Определение РС ВИЧ в клинике 256
Терапевтический мониторинг антиретровирусных препаратов 258

VIII ГЛАВА.
Эпидемиология лекарственной устойчивости ВИЧ 264
Стратегии ВОЗ по слежению за резистентностью ВИЧ. 265
Национальная рабочая группа по резистентности ВИЧ 267
Индикаторы раннего предупреждения 267
Мониторинг приобретенной устойчивости 269
Передающаяся устойчивость ВИЧ в мире 271
Организация надзора за передающейся устойчивостью ВИЧ 275
Интерактивная оценка показателя передающейся устойчивости ВИЧ 276
Национальные базы данных 280
Национальная референс-лаборатория для мониторинга резистентности ВИЧ 281

Сокращенные наименования лекарственных АРТ-препаратов

Аббревиатура	Наименование	Год начала применения
НИОТ		
ZDV	Азидотимидин (зидовудин)	1987
ddI	диданозин	1991
ddC	зальцитабин	1992
d4T	ставудин	1994
3TC	ламивудин	1995
ABC	абакавир	1998
TDF	тенофовир	2001
FTC	эмтрицитабин	2004
ННИОТ		
NVP	невирапин	1996
DLV	делавирдин	1997
EFV	эфавиренц	1998
ETV	этравирин	2008
ИП		
SQV	саквинавир	1995
RTV	ритонавир	1996
IDV	индинавир	1996
NFV	нельфинавир	1997
APV	ампренавир	1999
LPV	лопинавир	2000
ATV	атазанавир	2003
FSV	фосампренавир	2003
TPV	типранавир	2005
DRV	дарунавир	2006
ИИ		
RAL	ралтегравир	2007
Ингибиторы слияния		
ENF	энфувиртид	2003
Ингибиторы присоединения		
MVC	маравирок	2007

Список сокращений

АРТ – антиретровирусная терапия

АТФ – аденозинтрифосфат

ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия

ГБ – генетический барьер

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИИ – ингибиторы интегразы

ИП – ингибиторы протеазы

ИПР – индикаторы раннего предупреждения (early warning indicators, EWI)

кДНК – комплементарная ДНК

ЛУ – лекарственная устойчивость

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

НИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

ННИОТ – ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

НРГ – национальная рабочая группа

ОТ – обратная транскрипция

РНК – рибонуклеиновая кислота

РС – репликативная способность

СМЖ – спинно-мозговая жидкость

ЦНС – центральная нервная система

ЭПР – эндоплазматическая сеть

AUC – площадь под кривой (area under the curve)

BCO – биологический cut-off (biological cut-off)

CCO – клинический cut-off (clinical cut-off)

CCR – хемокиновый рецептор (chemokine receptor)

CRF – циркулирующая рекомбинантная форма (circulating recombinant form)

CXCR и CCR5 – хемокиновые рецепторы (chemokine receptors)

CYP3A4 и CYP2B6 – цитохромы

DBS – "сухая капля" (dried blood spots)

dNTPs – дезоксинуклеотидтрифосфаты (deoxynucleotide triphosphate)

FC – кратность (fold change)

GSS – показатель генотипической чувствительности (genotypic susceptibility score)

IN – интеграза (integrase)

INSTI – ингибиторы переноса цепи (IN strand transfer inhibitors)

IQ – коэффициент ингибирования (inhibitory quotient)

LiPA – line probe assay

LTR – длинный концевой повтор (long terminal repeat)

MDR-белки – белки множественной лекарственной устойчивости (multidrug resistance)

MHC – молекула гистосовместимости (histocompatibility molecule)

NGS – секвенирование нового поколения (new generation sequencing)

NK – естественные киллеры (natural killers)

P-gp – р-гликопротеин

PR – протеаза (protease)

RT – обратная транскриптаза (reverse transcriptase)

STI – структурированное прерывание терапии (structured treatment interruption)

TAMs – мутации к аналогам тимидина (thymidine analog mutations)

TCE – эпизод замены терапии (treatment change episode)

TDR – передающаяся устойчивость ВИЧ, ПУВ (HIV transmitted drug resistance)

I ГЛАВА. Базовые сведения

Успехи антиретровирусной терапии привели к тому, что ВИЧ-инфекция в течение короткого времени превратилась из неизбежно смертельного заболевания в управляемую инфекцию, по крайней мере в развитых странах. Применение высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) дает возможность значительно увеличить продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных лиц, приблизить ее качество к нормальному и ограничить передачу инфекции. Современные схемы включают обычно от трех до пяти препаратов, действие которых направлено на разные мишени – вирусные ферменты обратную транскриптазу, протеазу и интегразу, а также белки оболочки; все они позволяют добиться снижения уровня вирусной нагрузки до неопределяемого, однако в реальности добиться этого удается не всегда.

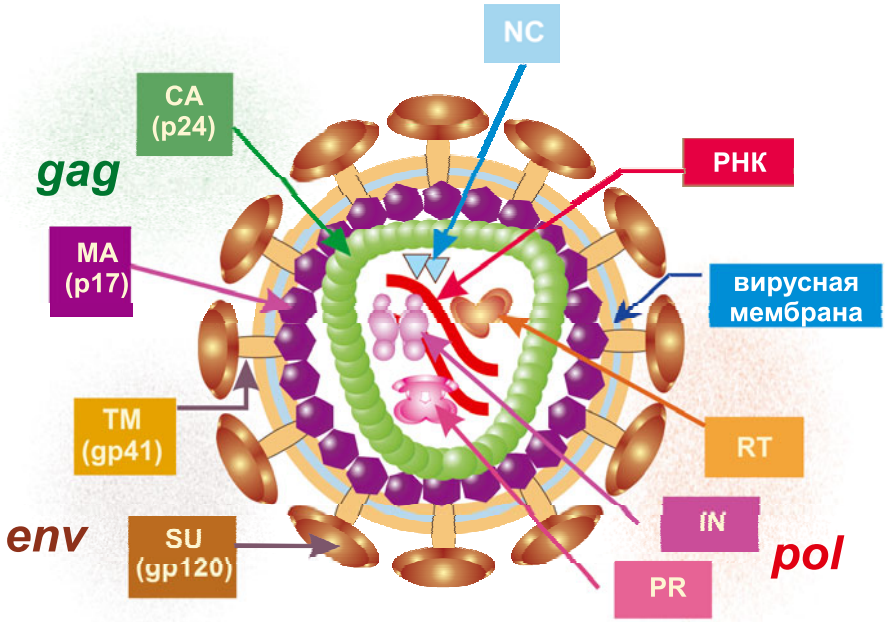
Единственной причины неуспеха ВААРТ не существует, и в каждом отдельном случае ею оказывается совокупность факторов, как со стороны вируса, так и со стороны хозяина. Одним из таких факторов является лекарственная устойчивость (резистентность) ВИЧ, источники которой, в свою очередь, многочисленны. В этой главе читателю предстоит вспомнить об основных событиях размножения вируса в организме человека и его последствиях, для того, чтобы в последующих главах перейти к детальному рассмотрению вопросов формирования, анализа и профилактики резистентности ВИЧ.

Размножение ВИЧ в клетке

Структура вириона ВИЧ и вирусные белки. ВИЧ является типичным и наиболее хорошо изученным представителем семейства ретровирусов. Отличительной особенностью вирусов этого семейства является способность осуществлять **реакцию синтеза двуцепочечной ДНК на матрице РНК (обратную транскрипцию)**.

ВИЧ образует сферические вирусные частицы (**вирионы**) с диаметром около 100 нм. Внутренняя часть (**нуклеокапсид**) вириона включает белки – все три **фермента**, необходимые для репликации вируса, некоторые другие вирусные и клеточные белки, а также две молекулы **геномной РНК**.

Белки группы **Gag** (**g**roup specific **a**nti**g**ens) формируют внутреннюю структуру вириона и включают три основных полипептида: **капсид** (**CA**), ответственный за пространственную укладку молекул всех прочих белков и формирование архитектуры вириона; **матриксный белок** (**MA**), тесно связанный с внутренней поверхностью липидного бислоя и стабилизирующий вирусную частицу; **нуклеокапсидный белок**(**NC**), находящийся в тесной связи с вирусной РНК и обе-



спечивающий ее конденсацию внутри нуклеокапсида.

Ферменты, ответственные за различные этапы размножения ретровирусов, составляют вторую группу белков – **Pol (от *polymerase*), включая протеазу (PR), обратную транскриптазу (RT) и интегразу (IN).**

Основное содержимое (**матрикс**) вирусной частицы**,** окружающее нуклеокапсид, в свою очередь, окружено **липидной оболочкой**, которую вирион приобретает в момент отпочковывания от клетки и которая, по сути, представляет собой фрагмент клеточной мембраны, в составе вириона именующийся **вирусной мембраной**. Белковая составляющая оболочки вируса – **третья группа ретровирусных белков Env (от *envelope*)** включает два гликопротеина: **поверхностный** (**SU,** от *surface*, **gp120**) и **трансмембранный (TM, gp41),** «пронизывающий» вирусную мембрану.

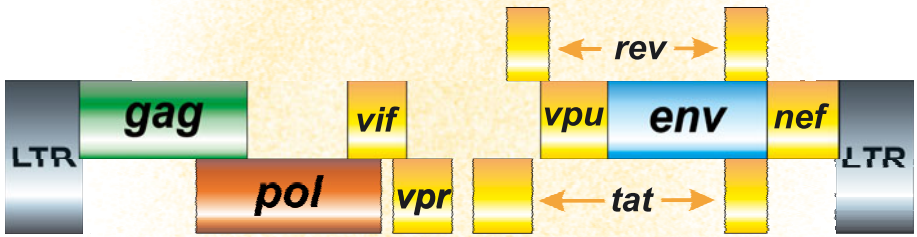
Поверхностный белок **gp120** играет главную роль в связывании вирусной частицы с рецепторами клетки-мишени – **CD4** и **CCR5 (CXCR4)**. Участки белка (**домены**), ответственные за это связывание, отличаются высокой **консервативностью** (постоянством аминокислотной последовательности), чего нельзя сказать об остальных участках gp120. Особенным непостоянством (**вариабельностью**) отличается так называемая **петля V3**, включающая пять вариабельных доменов.

Большинство неструктурных белков также присутствуют в составе вириона, однако обнаруживаются там в очень небольших количествах. Их функции реализуются на разных этапах размножения вируса, то есть внутри клетки, и подробно рассматриваются в других изданиях (см. список рекомендуемой литературы в конце главы).

Кратко, регуляторные белки **Tat** и **Rev** накапливаются в ядре и связываются с определенными участками вирусной РНК: первый с трансактивируемым регуляторным элементом (**TAR**) в области длинных концевых повторов, второй – с Rev-чувствительным регуляторным элементом (**RRE**) в области гена *env*. Белок Tat активирует транскрипцию промоторной области LTR и необходим для репликации вируса. Белок Rev обеспечивает транспорт несплайсированных форм мРНК из ядра и переключение синтеза регуляторных белков на синтез структурных.

Белок **Nef** подавляет экспрессию молекул CD4 и MHC классов I и II на поверхности инфицированных клеток, позволяя вирусу ускользать от распознавания цитотоксическими Т-лимфоцитами и CD4+ Т-хелперами. Белок **Vpr** играет важную роль в переносе провируса в ядро и вызывает задержку пролиферации клетки в периоде G2. Белок **Vpu** ВИЧ участвует в разрушении комплексов CD4-gp160 в эндоплазматической сети, позволяя тем самым gp160 включаться в формирование новых вирионов. Белок **Vif** блокирует ингибиторную активность **APOBEC3G** – внутриклеточного фермента, дезаминирующего цитозин в составе мРНК или ДНК, что приводит к накоплению мутаций G/A и разрушению вирусной ДНК.

Организация генома. Каждая из цепей РНК включает около 10 000 нуклеотидов, составляющих девять генов. К числу **структурных** генов относятся ***gag***, кодирующий внутренние белки (около 2000 нуклеотидов), ***pol***, кодирующий три фермента ВИЧ, необходимые для его размножения (около 2900 нуклеотидов), и ***env***, кодирующий оболочечные белки gp120 и gp41 (около 1800 нуклеотидов). Кроме них, в геноме ВИЧ присутству-



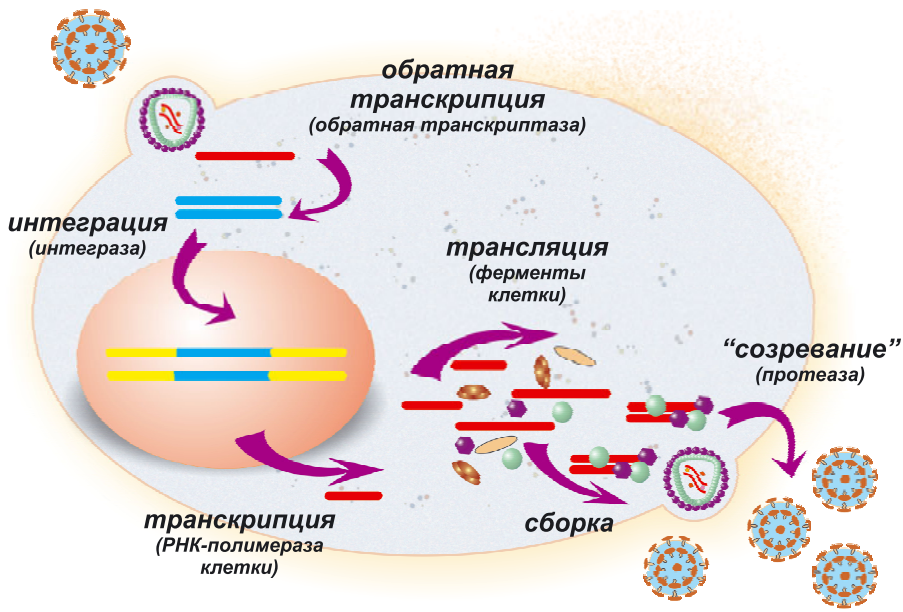
ют гены **неструктурных** белков ***tat***, ***rev***, ***vif***, ***nef***, ***vpr*** и ***vpu***(у ВИЧ-2 – ***vpx***).

На обоих концах молекулы РНК находятся повторяющие друг друга последовательности, не кодирующие никаких белков и известные под названием «**длинных концевых повторов**» (*long terminal repeats*, **LTR**). Эти последовательности играют роль **промотора** транскрипции ВИЧ, определяющего интенсивность размножения ВИЧ, а также важны на этапе интеграции (см. далее).

Стратегия генома и жизненный цикл ретровирусов. *Стратегия репликации ретровирусов основана главным образом на заражении чувствительных клеток при контакте с инфекционными вирусными частицами и направлена на установление долгосрочной* ***персистирующей инфекции****, способной распространяться как вертикально (при делении клеток), так и горизонтально (от клетки к клетке). Особенностью ВИЧ является способность заражать* ***неделящиеся клетки****, например, CD4+ Т-лимфоциты (вне фазы митоза) и макрофаги.*

В составе вириона ВИЧ всегда находятся **две одинаковые молекулы РНК**, каждая из которых представляет собой «плюс-цепь», то есть потенциально способна непосредственно кодировать последовательность белков вируса. В действительности **вирионная РНК** никогда не принимает непосредственного участия в транскрипции, а вместо этого становится основой для формирования интегрированного в хромосому провируса, последовательность которого в последующем служит матрицей для синтеза мРНК.

Жизненный цикл (то есть период от заражения клетки-мишени до образования инфекционного вирусного по-



томства) ретровирусов можно разделить на следующие **этапы**:

- **присоединение** вируса к рецепторам клетки и последующее слияние мембран;
- «**раздевание** вируса»; вирусная РНК освобождается от белков капсида и нуклеокапсида;
- **обратная транскрипция** вирусной РНК с участием фермента **обратной транскриптазы**; образуется двуцепочечная ДНК-копия вирусного генома;
- миграция (**транслокация**) ДНК в ядро клетки; ДНК в составе преинтеграционного комплекса проникает через ядерную мембрану;
- **интеграция** ДНК в хромосомную ДНК клетки с участием фермента **интегразы**; интегрированная ДНК получает название провирусной ДНК;
- **транскрипция** провирусной ДНК с участием **клеточного** фермента РНК-полимеразы; регулируется взаимодействием вирусного LTR с клеточными факторами трансактивации;
- **сплайсинг** РНК и транспорт сплайсированной и мРНК из ядра в цитоплазму;
- **синтез вирусных белков** с участием **клеточных** ферментов; при этом белки группы **Gag** в ходе **трансляции мРНК** считываются в виде общего предшественника Gag – **p55**с последующим «нарезанием» при участии протеазы, а белок **Env** синтезируется в виде общего предшественника **gp160**, затем **клеточные протеазы** «разрезают» его на два гликопротеина – gp120 и gp41;
- **транспорт** вирусных белков к месту сборки, упаковка и сборка новых вирионов;
- отпочковывание и **созревание** вирусных частиц с участием вирусного **фермента протеазы**.

Подробно обо всех событиях, происходящих в клетке в ходе размножения ВИЧ, можно прочесть в других изданиях, а в этой книжке мы немного коснемся только тех моментов, которые так или иначе сделают более понятной проблему резистентности.

Основные мишени антиретровирусной терапии

С вирусологической точки зрения, основная цель специфической терапии ВИЧ-инфекции состоит в том, чтобы максимально ограничить размножение вируса. Это необходимо не только для того, чтобы сократить число вновь инфицируемых клеток и спасти их от непосредственного поражения – ведь известно, что подавляющее большинствоCD4+ Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции гибнут, **не будучи инфицированными** (см. далее).

Современные представления о патогенезе ВИЧ-инфекции главной причиной их гибели полагают **гиперактивацию иммунных клеток**, и хотя окончательные причины ее предстоит прояснить, уже сейчас понятно, что в этом процессе задействованы многие вирусные белки, синтезирующиеся на разных этапах жизненного цикла ВИЧ и обладающие **собственными патогенными возможностями** как внутри, так и вне клеток. Это означает, что для успешного подавления патогенетического процесса следует стремиться ингибировать **каждый этап** и ограничивать активность каждого участника **размножения** вируса, и только таким образом можно предотвратить наблюдаемое в ходе

ВИЧ-инфекции системное поражение иммунной системы.

Следуя путем ВИЧ в клетке, можно наметить основные этапы и соответствующие им мишени подавления размножения вируса. К ним относятся:

- **связывание и проникновение в клетку**; на этом этапе мишенями могут быть клеточные рецепторы и корецепторы, белки слияния и поверхностные белки вириона;
- **обратная транскрипция**; традиционная мишень этого этапа – обратная транскриптаза;
- **интеграция**; основной мишенью является интеграза, однако множество других мишеней можно наметить среди клеточных и вирусных белков – помощников этого процесса;
- **транскрипция и трансляция**; наиболее сложный для ингибирования процесс, поскольку он обеспечивается клеточными белками и не имеет специфики, то есть имеет отношение не только к размножению ВИЧ, но и ко всем прочим внутриклеточным процессам биосинтеза;
- **сборка**; на ранних этапах мишенью может стать процесс нарезания предшественников, на более поздних придется подключить дополнительные соображения, поскольку сборка – процесс неферментативный;
- **почкование**; вирусные ферменты также не имеют к этому отношения, значит, здесь также нельзя обойтись без ингибирования клеточных белков.

Идеальным способом подавления репликации ВИЧ стало бы одновременное и полное выключение всех вирусных ферментов, а заодно и ингибирование ВИЧ-ассоциированной функции клеточных белков-помощников (но только без ущемления их основных обязанностей). Современная антиретровирусная терапия пока не располагает такими возможностями, и число **мишеней**, так же как и этапов размножения ВИЧ, подвергающихся специфическому подавлению при лечении, все еще ограничено.

В качестве своих целей ВААРТ выбирает наиболее очевидные объекты, то есть основные **вирусные белки**, принимающие участие во **внутриклеточном размножении** ВИЧ. В первую очередь это все три **фермента** вируса, а также вирусные и хозяйские белки, участвующие в присоединении вирусных частиц к клетке. Нет сомнений в том, что перечень возможных способов воздействия на цикл репликации ВИЧ еще далеко не исчерпан и будет расширяться. В частности, большой интерес в качестве объекта ингибирования вызывают **неструктурные белки** ВИЧ, главная роль которых в цикле размножения заключается в том, чтобы осуществлять **привлечение** клеточных белков (факторов), **способствующих** репликации ВИЧ, либо **противодействовать** тем из них, которые репликации **препятствуют** (см. далее в этой главе).

В настоящее время для лечения ВИЧ-инфекции доступны четыре группы антиретровирусных препаратов: нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (**НИОТ**), ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (**ННИОТ**), ингибиторы протеазы (**ИП**), ингибиторы интегразы (**ИИ**), ингибиторы **слияния** (энфувиртид) и **антагонисты** корецепторов. На испытаниях находятся ингибиторы **прикрепления** (блокаторы молекул CD4), вместе с двумя предыдущими

группами препаратов они составляют класс ингибиторов **проникновения**. Кроме них, испытываются препараты, действие которых направлено на этап созревания, а также несколько новых препаратов с принципиально отличающимися от всех предыдущих механизмами действия (см. главу IV). Механизмы действия ферментов и других вирусных белков в цикле размножения ВИЧ будут подробнее рассмотрены в той же главе.

Препараты всегда применяются в **комбинациях**, причем минимальное число их в схеме равно трем (тритерапия), так как эффективности двух и тем более одного препарата, как правило, бывает недостаточно; обычно применяются либо препараты, воздействующие на разные мишени, либо препараты одного класса, нацеленные на разные участки одного и того фермента. Общее число зарегистрированных препаратов, включая комбинированные, достигает 30 и продолжает увеличиваться, хотя и медленнее, чем в первые годы внедрения ВААРТ.

Эффективность ВААРТ в целом неуклонно растет, как в отношении лечения ВИЧ-инфекции, так и в отношении профилактики ее передачи. Тем не менее, о полном и всеохватном подавлении размножения вируса речь не идет, так как остаются **главные проблемы лечения ВИЧ-инфекции – побочные эффекты, резистентность и латентность**. Потребность в разработке новых препаратов сохраняется, вирус продолжает эволюционировать, и конца этой «гонке вооружений» не видно. Объектами воздействия новых препаратов становятся и старые, и новые мишени, и среди них – клеточные белки, на которых мы очень коротко остановимся.

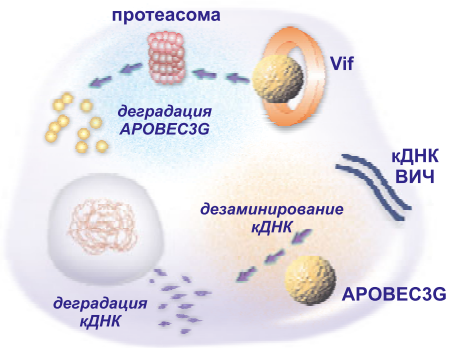
Клеточные факторы – потенциальные мишени терапии ВИЧ-инфекции

Как и все прочие вирусы, ВИЧ является облигатным паразитом, то есть не имеет собственных возможностей для осуществления метаболизма и многих этапов размножения. Репликация вируса полностью зависит от условий клетки-хозяина, поэтому в результате совместной эволюции вирусы приобретают и совершенствуют способности использовать клеточные ресурсы себе на благо. На всех этапах жизненного цикла ВИЧ это проявляется **рекрутированием клеточных белков** с целью выполнения некоторых функций, недоступных для самого вируса, и повышения его продукции**.**

Некоторые из этих белков уже не первый год подробно изучаются, но лишь недавно с применением новейших технологий стало понятно, что в действительности пока мы наблюдаем только верхушку айсберга.

Несколько параллельно проведенных исследований, основанных на последовательном «выключении» клеточных генов в инфицированных ВИЧ клетках, показали, что, по крайней мере,1254 гена человека так или иначе связаны с размножением ВИЧ в клетке. Продукты почти всех этих генов помогают вирусу размножиться в клетке, и лишь **три** белка из известных на сегодня отчаянно пытаются **ограничить репликацию** ВИЧ. В ответ на эти героические действия вирус выработал **механизмы сопротивления**, большинство из которых связаны с деятельностью вспомогательных белков ВИЧ.

Первым из группы естественных ингибиторов репликации ВИЧ был от-



крыт белок **APOBEC3G**.Этот белок включается в состав вирусных частиц еще на стадии их отпочковывания от клеток и, возможно, уже внутри вирионов начинает свою деятельность. Она заключается в осуществлении реакции дезаминирования цитидина, результатом чего становятся множественные замены **G→A** в составе кДНК ВИЧ; такая **гипермутация** генома катастрофически сказывается на размножении ВИЧ (см. нижнюю часть рисунка).

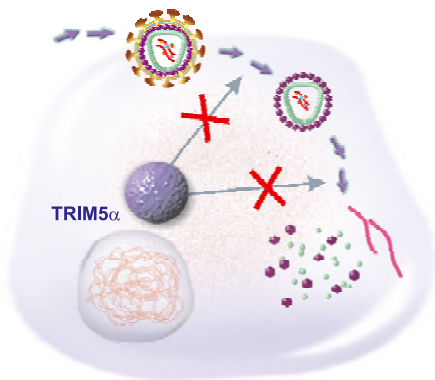
Противником APOBEC3G является вирусный белок **Vif**, который усиливает его **деградацию**, привлекая для этого **протеасомный** аппарат клетки (в верхней части рисунка). Эти события развиваются на первых этапах обратной транскрипции, а на стадии почкования Vif использует другие свои возможности и действует уже как помеха включению APOBEC3G в состав новых вирионов, занимая там его место.

Очевидно, что возможными подходами к использованию APOBEC3G в качестве терапевтической мишени могли бы стать специфическое **ингибирование** Vif, повышение уровня синтеза (**бустирование**) APOBEC3G либо усиление его **каталитической** активности. Так же очевидно, что для того, чтобы перейти к практическим разработкам, понадобится еще многое прояснить в отношении механизмов активности обоих белков и внутриклеточной локализации описанных процессов.

Вторым в порядке очередности открытия стал белок **TRIM5α**, который был впервые обнаружен у обезьян (Rhesus macaques) в качестве фактора **естественной устойчивости** к заражению ВИЧ.

Известно, что в момент пересечения мембраны клетки вирусная частица теряет свои оболочечные белки («раздевается»), а после попадания в цитоплазму последовательно сбрасывает слои капсида, образованные внутренними белками, до тех пор, пока не высвободит РНК. Оказалось, что этот этап связан с существованием своеобразного **видоспецифического барьера**: обезьяньи TRIM5α блокируют раздевание вирусов иммунодефицита обезьян всех видов, **кроме собственного**.

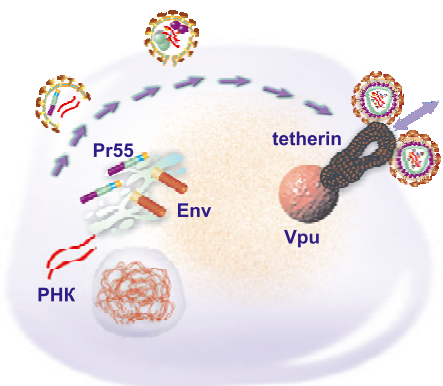
Механизм блокирования «раздевания» при участии TRIM5α пока остается неизвестным; предполагается, что обезьяний TRIM5α каким-то образом способствует деградации белка CA, привлекая к этому клеточные про-



теолитические белки. Блокируя стадию упорядоченного «раздевания», TRIM5α заменяет ее хаотическим и неупорядоченным **разрушением капсида** и РНК под действием ферментов хозяйской клетки, результатом чего становится деградация содержимого вирусной частицы.

У человека тоже есть свой вариант TRIM5α, однако его блокирующие способности выражены гораздо меньше, и ВИЧ в клетках человека легко преодолевает это естественное препятствие. Фантазируя по поводу возможностей использования TRIM5α как мишени для лекарственных препаратов, можно представить себе усиление его действия путем применения методов **генной терапии** и придания ему свойств обезьяньего варианта белка, либо повышение **степени связывания** человеческого TRIM5α с капсидными белками вируса; кроме того, в семействе TRIM есть и другие кандидаты (например, TRIM22), возможно, способные при соответствующей индукции ограничить размножение ВИЧ.

Третий участник сражений на этой стороне баррикад был открыт совсем недавно – им стал белок **тетерин** (от англ. *tether* – привязывать). Оказалось, что он способен удерживать полностью готовые к отпочковыванию вирионы на внутренней стороне мембраны клетки, в результате чего вновь образовавшиеся частицы накапливаются вблизи мембраны, не имея возможности выйти наружу и оторваться от поверхности. К сожалению, так бывает только у штаммов ВИЧ, лишенных белка Vpu. Как уже стало понятно читателю, у вируса есть механизм сопротивления активности тетерина, и вспомогательный белок **Vpu** является его главным участником. Сродство Vpuк тетерину приводит к образованию комплекса, в составе которого тетерин теряет свои свойства, и вирионы беспрепятственно отделяются от клетки.



Естественным индуктором синтеза тетерина является интерферон (**IFNα**); использование его в качестве средства терапии, впрочем, представляется сомнительным, потому что IFNα способен к стимулированию активации иммунной системы, которая, как уже известно, сама по себе есть причина прогрессии ВИЧ-инфекции и СПИДа. Некоторые препараты проявили в эксперименте способность к повышению уровня тетерина и ингибированию репликации ВИЧ путем вмешательства в его **контакт с Vpu**; возможно, на этом пути будет найдено решение проблемы.

Перечень факторов человеческой клетки, **способствующих** размножению ВИЧ, неизмеримо длиннее списка его естественных ингибиторов. Практически любой из шагов вируса на каждом из этапов его репликации «подстрахован» и усилен действием какого-либо из клеточных белков. В результате «дорожная карта» ВИЧ, отражающая участие клеточных белков,

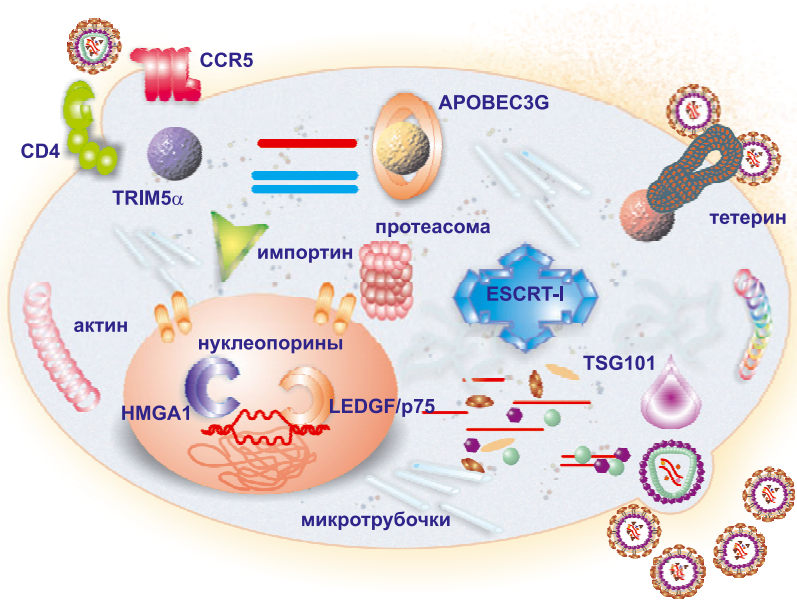
выглядит заметно сложнее, чем схема жизненного цикла вируса… Примеры, которые будут далее приведены, не отражают и малой доли информации, которая накоплена только за последние годы исследований, и при этом большинство механизмов функционирования белков-помощников пока еще не расшифровано.

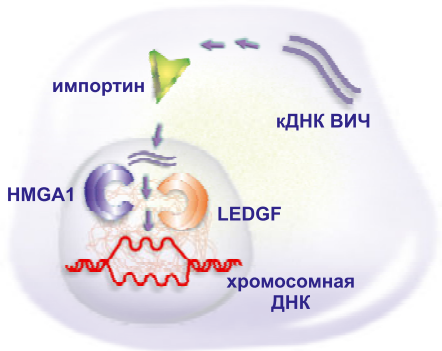
В сущности, клеточные рецепторы ВИЧ – **CD4** и **CCR5** становятся первыми из встреченных вирусом клеточными белками, без которых его размножение не могло бы начаться. Разработки терапевтических средств – ингибиторов этой группы хозяйских белков уже проводятся (см. главу IV).

Для перемещения вирусных компонентов (РНК, кДНК и белков) в цитоплазме на всем пути их следования используются элементы «внутриклеточного транспорта» – **микротрубочки** и сократительные волокна **актина**. Это позволяет многократно ускорить течение процесса размножения вируса, поскольку все компоненты, необходимые для этого, оказываются в нужное время в нужном месте.

Максимальное число клеточных белков задействовано на этапах, предшествующих интеграции, и собственно в интеграционных событиях. Так, для перемещения преинтеграционного комплекса в ядро клетки активно используется аппарат белков – **импортинов** и **нуклеопоринов** ядерной мембраны.

Последовательность хромосомной ДНК в участке встраивания провируса не имеет существенного значения, однако назвать локализацию этого процесса полностью случайной было бы неправильно. В выборе участка интеграции ведущую роль играет, по-видимому, доступность ДНК, то есть окружающая ее структура хроматина. Это означает, что «горячими точками» для интеграции являются **транскрипционно активные** участки ДНК. Для «опознания» такого участка необходимо присутствие белка **LEDGF/p75.** Белок **HMGA1** обладает способностью





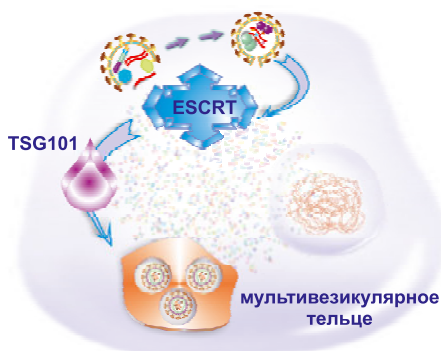
оказывать влияние на укладку ДНК; возможно, придавая ДНК оптимальную конформацию, HMGA1 создает «комфортные условия» интегразе и делает ее работу более эффективной.

Одна из привлекательных мишеней для терапии – хозяйские белки, функционирующие на постинтеграционных этапах размножения ВИЧ. Известно, что вирус узурпирует аппарат **ESCRT-I**, предназначенный для сортировки белков, путем взаимодействия с белком **TSG101**; следствием этого процесса является накопление вируса в мультивезикулярных тельцах макрофагов и усиление их почкования в лимфоцитах. Разобщение этого взаимодействия могло бы предотвратить высвобождение новых вирионов из клеток.

Белки, занятые в процессе **протеасомной** деградации различных клеточных субстанций, играют важнейшую роль как во внутриклеточных событиях, так и в формировании иммунного ответа. **Транскрипция** вирусного генома и **трансляция** вирусных белков полностью опосредованы клеточным синтетическим аппаратом (факторы инициации и элонгации, рибосомные белки, белки модификации нуклеиновых кислот и т.д.). **Сборка** вирионов, на первый взгляд происходящая без участия ферментов, в действительности в огромной степени зависит от взаимного расположения компонентов вируса во времени и пространстве, и заслуга клеточных белков в этом неоспорима.

Итак, взаимодействие аппарата размножения ВИЧ и клетки-хозяина значительно теснее и сложнее, чем это предполагалось даже с учетом представлений о паразитической природе вирусов. Идентификация множества белков клетки, эксплуатируемых вирусом на всех этапах жизненного цикла, представляет большие возможности для антиретровирусной терапии. Эти мишени особенно привлекательны тем, что клеточные белки практически **не подвержены мутационным изменениям**, а значит, проблема лекарственной устойчивости вряд ли может их коснуться.

Тем не менее, прежде чем имеющиеся знания станут основой для разработки новых лекарственных препаратов, нужно получить ответы на многие вопросы. Следует выяснить, насколько явления и процессы, наблюдаемые пока в основном в условиях ***in vitro***, соответствуют действительной



ситуации ***in vivo***; какие из активностей клеточных белков могут быть ингибированы без заметного ущерба для **метаболизма** самой клетки; функцию каких факторов можно «выключить» без заметных **физиологических** последствий.

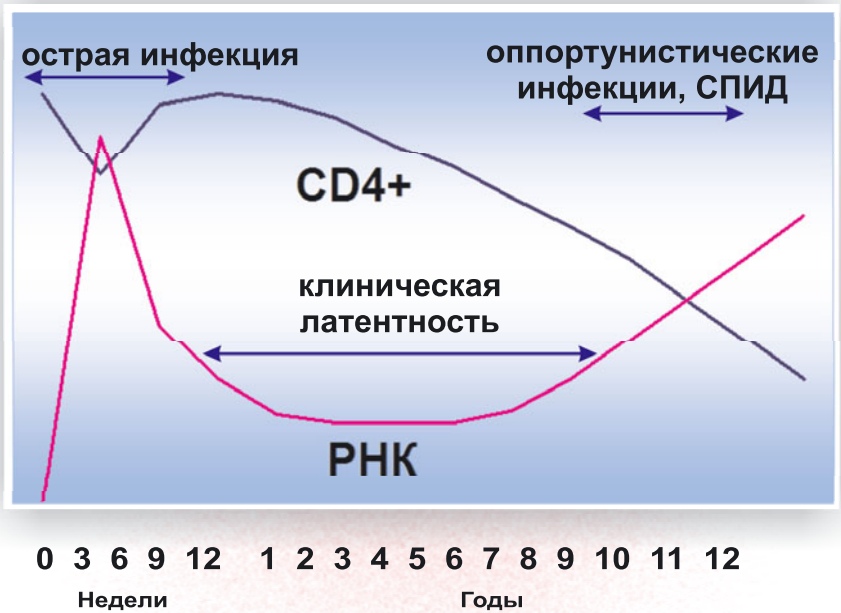
В идеале в роли ингибиторов ВИЧ-ассоциированных факторов клетки могут выступать молекулы, **имитирующие**, а, следовательно, являющиеся **конкурентами** клеточных партнеров этих факторов. Обязательным требованием к таким молекулам должна быть их эффективная доставка внутрь клеток. Глобальных же подходов, как уже понятно читателю, всего два – предотвратить использованием вирусом тех факторов, которые ему помогают, и усилить эффект белков-помощников. Простор для научной фантазии в этих направлениях поистине безграничен…

Современные представления о патогенезе ВИЧ-инфекции

Отличительной чертой ВИЧ-инфекции, как хорошо известно читателю, является постепенное и неотвратимое снижение **числа CD4+** Т-клеток. Ранние гипотезы иммунодефицита связывали этот феномен с прямым (**цитопатическим**) действием вируса на зараженные им клетки. Интенсивное изучение поведения ВИЧ в клетках позволило пролить свет на многие и многие аспекты его биологии, но одновременно с этим становилось понятно, что уничтожением только зараженных клеток объяснить наблюдаемое явление массовой гибели хелперов нельзя, поскольку большинство из гибнущих клеток (около 99%) оказались **незараженными** (это явление принято называть **bystander effect**, в вольном переводе «смерть свидетеля»). Для осознания и интерпретации этого факта понадобилось кардинально пересмотреть представления о ведущих факторах патогенеза ВИЧ-инфекции.

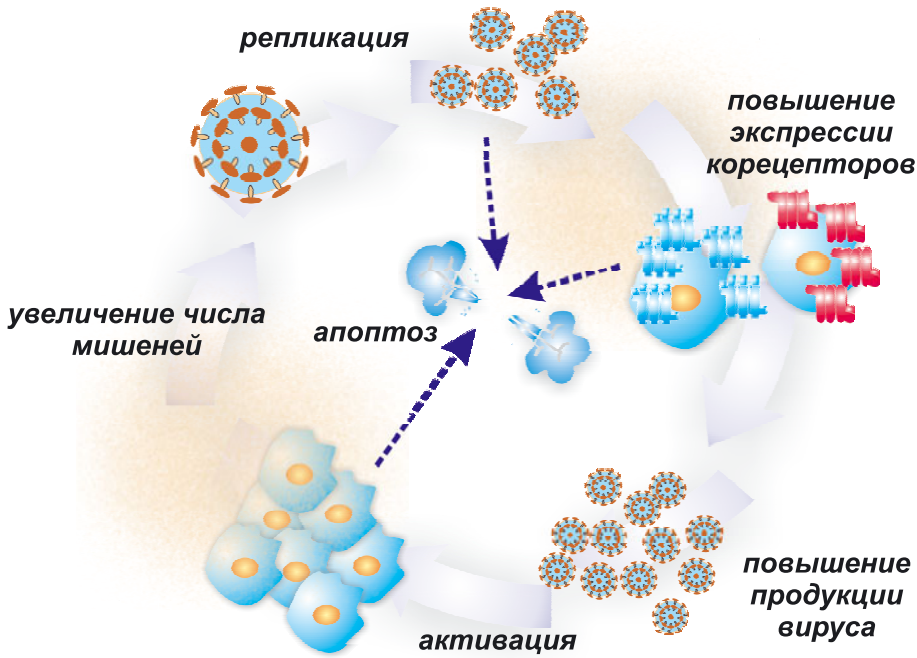
Ранние события патогенеза и активация иммунной системы. Центральной характеристикой **острой ВИЧ-инфекции** является **высокая вирусная нагрузка (ВН)**; причина ее, по всей очевидности, состоит в том, что иммунный ответ на ВИЧ на этой стадии еще не сформирован, и вирус имеет возможность размножаться беспрепятственно. Ситуация усугубляется тем, что именно в период формирования иммунного ответа, и прежде всего клеточного его звена, закономерно образуется большое число **активированных** CD4+ Т-клеток, которые как раз и являются главной мишенью вируса. По окончании острого периода ВН снижается примерно в 100 раз за счет достигнутого частичного иммунного контроля, с одной стороны, и истощения пула активированных клеток, с другой стороны.

На фоне высоких значений вирусной нагрузки отмечается резкое и значительное снижение числа CD4+ Т-клеток, причиной которого являются два феномена – **перераспределение** из кровотока в лимфоузлы и массивная **деструкция** клеток**,** которая **п**роисходит главным образом также в лимфоузлах; это, в свою очередь, неблагоприятно сказывается на состоянии самих лимфоузлов и в последующем оказывает негативное влияние на формирование прочих звеньев иммунного ответа. Согласно распространенной современной точке зрения, именно эти события являются



отправной точкой **гиперактивации** – ключевого события патогенеза ВИЧ-инфекции. Проявлением хронической активации становится формирование **поверхностных маркеров** CD4+ Т-клеток, в числе которых – Ki67, HLA-DR, CD25 и CD38. Их наличие и степень экспрессии, как оказалось, способны **прогнозировать прогрессию** заболевания лучше, чем это делает показатель вирусной нагрузки. Параллельно с этим в активированное состояние приходят и другие иммунные клетки, включая В-клетки, CD8+ Т-клетки (цитотоксические клетки) и естественные киллеры (NK), что позволяет говорить о состоянии **хронической гиперактивации иммунной системы**. Естественным завершением состояния активированных клеток, как известно, является **апоптоз**, или самоуничтожение клеток.

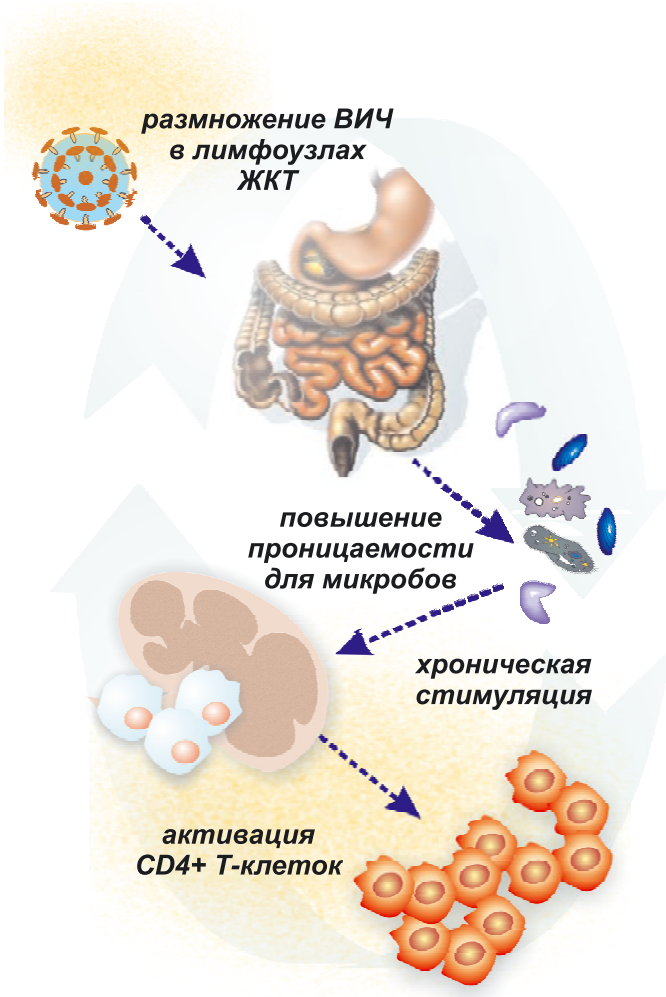
Причины этого феномена понятны не до конца. Показано, что отправной точкой активации в культуре клеток является репликация вируса. Известно, что инфицирование покоящихся клеток (а точнее, клеток, **переходящих** в состояние покоя, или состояние **клеток памяти**) приводит, как правило, к латентной инфекции; результатом активации таких клеток становится **возобновление продукции** вирусных частиц. Также известно, что активация иммунных клеток приводит к повышению **экспрессии корецепторов** – как CXCR4, так и CCR5 (см. далее). Это, в свою очередь, повышает не только уровень продукции вируса, но и интенсивность **апоптоза** CD4+ Т-клеток. Таким образом, процессы репликации и активации иммунных клеток являются **взаимозависимыми** и усиливают друг друга на протяжении всего течения ВИЧ-инфекции, создавая «заколдованный круг», разорвать который при естественном течении заболевания невозможно.



Назначение **ВААРТ**, как правило, сопровождается некоторым снижением содержания маркеров активации, что лишний раз доказывает связь между этим показателем и уровнем репликации вируса. Тем не менее, даже самая успешная терапия не приводит к отмене этого феномена, более того, уровень активации независимо от эффективности лечения продолжает постепенно повышаться, а это, по-видимому, означает, что ведущим звеном активации является не размножение ВИЧ само по себе. Лидирующим на сегодняшний день является предположение об определяющей роли явления **транслокации микробов** (microbial translocation) в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) в качестве причины гиперактивации.

Эта теория объясняет состояние хронической активации иммунной системы, наблюдаемое при ВИЧ-инфекции, **повышением проницаемости** слизистой оболочки кишечника, которое, как считают сторонники теории, вызвано непосредственным воздействием вирусных продуктов, образующихся в многочисленных лимфоузлах ЖКТ, на клетки эпителия. Это, в свою очередь, приводит к хронической стимуляции иммунитета липополисахаридами микробной флоры кишечника, причем начинается этот процесс очень рано и уже не прекращается в ходе развития инфекции.

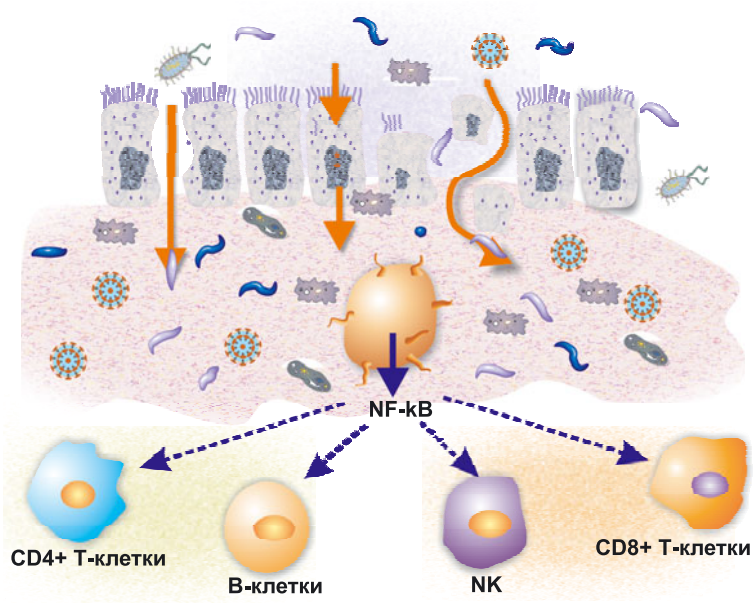
Альтернативная гипотеза, объясняющая причины гиперактивации, связывает этот феномен с **дефицитом Т-регуляторных CD4+** клеток, ответственных за поддержание иммунного ответа. Их число действительно резко снижается в периоде ранней ВИЧ-инфекции, также как и функциональные свойства, что в конечном счете способно привести к дисрегуляции иммунного ответа и активации. Проявляется это формированием



значительного числа цитолитических клеток с фенотипом CD8+/CD38high/HLA-DR+, сопряженного с прогрессией заболевания.

В пользу этого предположения говорят многие факты; так, у пациентов из группы **длительных непрогрессоров** клеток число Т-регуляторных клеток также сохраняется близко к норме, при этом маркеры активации у них также снижены. Тем не менее, говорить о значении этого показателя для гиперактивации пока рано, тем более, что одного численного значения здесь будет недостаточно, поскольку идентификация поверхностных маркеров Т-регуляторных клеток ничего не говорит об их функциональности, а она может быть снижена и при нормальном числе клеток. Вопрос о роли этих клеток еще предстоит выяснить в будущем.

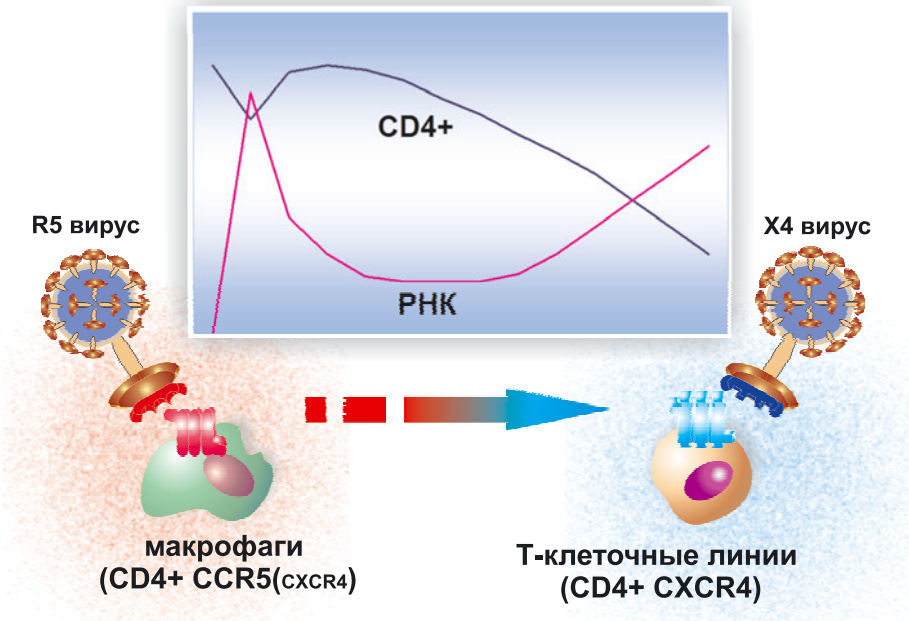
Популяция **CD8+ Т-клеток** на первый взгляд страдает меньше, чем CD4+ как в количественном, так и в функциональном отношении. Роль



цитотоксических клеток (**CTL**) в периоде острой инфекции хорошо изучена, и именно благодаря им удается сдержать и по окончании острой фазы обратить рост вирусной нагрузки. Эти клетки появляются в кровотоке еще до сероконверсии и пика нагрузки, быстро размножаются и так же быстро сокращают объем собственной популяции после установления стабильного (как правило, низкого) уровня репликации ВИЧ.

Парадоксальным образом ВИЧ вызывает довольно **сильный клеточный иммунный ответ**, и высокоэффективные CD8+ Т-клетки можно обнаружить на протяжении всего курса инфекции. Поскольку этот пул клеток также подвержен гиперактивации, скорость их размножения и скорость гибели повышены в ходе ВИЧ-инфекции. Проблема неэффективности цитотоксического ответа на ВИЧ в целом, то есть неспособность CTL ограничивать размножение ВИЧ на стадии хронической инфекции, связана в первую очередь с высоким уровнем изменчивости вируса, при этом даже эффективный ответ «не успевает» за появлением все новых и новых вариантов ВИЧ и направлен всегда против «вчерашнего» вируса. Более подробную информацию читатель получит из других специализированных источников.

R5- и X4- вирусы. Как уже говорилось, ВИЧ имеет возможность инфицировать разные клетки, однако делает это крайне неравномерно; одни варианты вируса предпочитают размножаться в макрофагах, другие выбирают для себя Т-клетки и другие клеточные мишени инфекции; интенсивность размножения также сильно варьирует. В большой степени это зависит от сродства вирусов к CCR5- либо CXCR4- корецепторам на поверхности клеток; в зависимости от этого выделяют CCR5- (R5) и CXCR4 (X4)-тропные вирусы. На ранних этапах



патогенеза ВИЧ-инфекции большинство вирусов имеют макрофагальный R5-фенотип, но позднее часто появляются X4-варианты, способные инфицировать «бессмертные» Т-клетки в культуре.

Природа такого «переключения» (coreceptor switch) остается невыясненной. Спорной также является природа **низкой трансмиссивности** X4-вирусов по сравнению с R5: по одному из предположений, некие свойства вирионов X4 ограничивают их передачу от человека к человеку, по другой версии, передача осуществляется одинаково, но вскоре после нее X4-вирусы элиминируются по не вполне понятным причинам.

Хорошо известно, что появление X4-вирусов знаменует собою начало периода **прогрессирования ВИЧ-инфекции** и СПИДа, однако и здесь имеется неопределенность – ведь этот феномен может быть как причиной снижения иммунитета, так и его следствием; аналогии здесь проводятся между X4 и оппортунистическими инфекциями, когда микроорганизм может размножаться лишь при условии иммунокомпрометации хозяина. Еще больше усложняется картина, если принять во внимание, что X4-вирусы можно встретить примерно у 50% пациентов, а у других они так никогда и не появляются; это означает, что наличие X4-вариантов ВИЧ не является обязательным условием прогрессии ВИЧ-инфекции.

Компартментализация ВИЧ. Так называют распределение ВИЧ между разными клетками, тканями и органами инфицированного организма. Основным **клеточным** компартментом размножения ВИЧ, конечно, становятся **Т-клетки**, имеющие на поверхности CD4-рецептор. Предпочтение при заражении ВИЧ отдает активированным клеткам, то есть именно тем, которые призваны уничтожать инфицирован-

ные вирусом клетки. **Хроническая активация** иммунной системы увеличивает число активированных мишеней для ВИЧ, что, в конечном счете, приводит к снижению общего числа CD4+ Т-клеток и функции иммунной системы.

Активными участниками патогенеза ВИЧ-инфекции становятся также антиген-презентирующие клетки (APC) – **дендритные клетки** (DC) и **макрофаги**, однако их роли заметно различаются. Мишенями для ВИЧ могут быть и те, и другие, потому что CD4-рецепторы у них есть. Тем не менее, DC – профессиональные APC, постоянно присутствующие в лимфоузлах, в реальности редко выступают в роли продуцентов вирусных частиц, а вместо этого способствуют контакту вирионов и CD4+ Т-клеток и таким образом принимают участие в **диссеминации** ВИЧ в организме. В макрофагах вирус, напротив, действительно размножается, хотя и на невысоком уровне; кроме этого, они могут выступить в роли **резервуаров** инфекции (см. далее).

Анатомическая компартментализация определяется клеточным составом органов. Поскольку более 50% Т-клеток сосредоточено в ЖКТ, причем многие из них активированы, именно этот объект страдает в первую очередь и больше всех. Репликация на ранних стадиях ВИЧ начинается в лимфоузлах ЖКТ, постепенно диссеминируя в другие ткани и органы и формируя резервуары инфекции. Важным объектом поражения ВИЧ является ЦНС, где находятся клетки **микроглии и Т-клетки** цереброспинальной жидкости. О влиянии феномена компартментализации на формирование резистентных штаммов ВИЧ речь пойдет в VI-ой главе.

Итак, на протяжении развития патогенетического процесса ВИЧ-инфекции вирус постоянно претерпевает изменения, связанные с формированием иммунного ответа, распределением в пределах организма и изменением сродства к разным клеткам. Размножаясь в Т-лимфоцитах лимфоузлов кишечника в периоде первичной инфекции, вирус вызывает серьезный дефицит этих клеток, сказывающийся на последующих стадиях патогенеза. По окончании этой стадии устанавливается стабильный уровень вирусной нагрузки, и происходит это в значительной степени благодаря включению механизмов врожденного и приобретенного иммунитета – гуморального и клеточно-опосредованного. После этого диверсификация вирусного генома продолжает усиливаться под действием трех основных факторов: 1) **неточность** механизмов репликации ВИЧ («эволюционный шум»); 2) клеточный и гуморальный **иммунный ответ** и 3) **адаптация** вируса к разным типам клеток. Обо всем этом подробно читатель узнает в последующих главах. Перечисленные события **индивидуальной эволюции** ВИЧ приводят к появлению значительного разнообразия популяции вируса, формированию рекомбинантных вариантов, а также резервуаров, хранящих память о всех изменениях генома ВИЧ в пределах организма.

Латентность ВИЧ и резервуары инфекции

В первые годы после изобретения ВААРТ у многих специалистов появилась надежда на то, что, снижая вирусную нагрузку, можно постепенно прийти к полному уничтожению ВИЧ