

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

Н. В. МАТИЕВСКАЯ
И. О. ТОКУНОВА

**ТРОПИЗМ ВИЧ-1:
КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ,
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ, ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ**

Монография

Гродно
ГрГМУ
2018

УДК 616.98:578.828.6HIV:578.233.22]-036

ББК 55.145

М33

Рекомендовано Редакционно-издательским советом ГрГМУ
(протокол № 01 от 11 января 2018 г.).

Авторы: зав. каф. инфекционных болезней ГрГМУ,
д-р мед. наук, доц. Н. В. Матиевская;
аспирант каф. инфекционных болезней ГрГМУ,
И. О. Токунова.

Рецензенты: д-р. мед. наук, проф., зав. каф. детских инфекционных
болезней УО «БГМУ» О. Н. Романова;
д-р. мед. наук, проф. зав. каф. клинической лабораторной
диагностики и иммунологии ГрГМУ С. А. Ляликов.

Матиевская, Н. В.

М33 Тропизм ВИЧ-1: клинико-эпидемиологические, иммунологические,
генетические аспекты: монография / Н. В. Матиевская,
И. О. Токунова. – Гродно : ГрГМУ, 2018. – 136 с.
ISBN 978-985-558-935-9.

В монографии представлены результаты собственных исследований и обзор современной научной литературы по проблеме тропизма ВИЧ-1 у пациентов, проживающих на территории Республики Беларусь; распределение вирусов разного тропизма, результатов филогенетического анализа региона петли V3 гена gp120 в сопоставлении с изолятами референсных образцов вирусов, резервированных в международных базах; представлены иммунологические механизмы формирования иммуносупрессии, клинико-лабораторные проявления и исходы ВИЧ-инфекции в зависимости от тропизма вируса.

УДК 616.98:578.828.6HIV:578.233.22]-036

ББК 55.145

ISBN 978-985-558-935-9

© Матиевская Н. В., Токунова И. О., 2018
© ГрГМУ, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	7
Глава 1 ТРОПИЗМ ВИЧ. ИСТОРИЯ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА.....	9
1.1 Тропизм ВИЧ. История вопроса	9
1.2 Характеристика хемокиновых рецепторов и переключение тропизма вируса	11
1.3 Тропизм ВИЧ к CCR5 и CXCR4 и восприимчивость к ВИЧ. Антагонисты CCR5	17
1.4 Методы определения тропизма ВИЧ	31
1.5 Генотипические методы исследования. Показания для тестирования на ВИЧ, интерпретация результатов	41
1.6 Полиморфизм генов цитокинов TNF α и IL-2.....	45
1.7 Динамика тропизма ВИЧ на фоне АРТ.....	47
Глава 2 ОПИСАНИЕ ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОВ, ОБОРУДОВАНИЯ.....	50
2.1 Характеристика пациентов, включенных в исследование.	50
2.2 Этиологическая диагностика ВИЧ-инфекции и оппортунистических инфекций	52
2.3 Определение тропизма ВИЧ.....	53
2.4 Изучение показателей иммунитета.....	54
2.5 Определение полиморфизма генов фактора некроза опухоли- α (TNF- α) (G-308A) и интерлейкина-2 (IL-2)(T330G)..	55
2.6 Общеклинические и биохимические методы исследования	59
2.7 Методы статистического анализа полученных результатов	59
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРОПИЗМА И СУБТИПОВ ВИЧ ПО НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПЕТЛИ V3 БЕЛКА gp120 ГЕНА env ВИЧ-1.....	61

3.1 Распределение пациентов по тропизму ВИЧ в изучаемой группе с учетом показателя FPR.....	61
3.2 Результаты филогенетического анализа последовательности V3 петли гена env ВИЧ-1 в зависимости от тропизма вируса	65
Глава 4 ИММУННЫЙ СТАТУС ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТРОПИЗМА ВИРУСА	68
4.1 Характеристика пациентов, у которых выполнены иммунологические исследования	68
4.2 Показатели содержания В-, Т-лимфоцитов (ТЛ) и их субпопуляций (CD3+CD4+ТЛ, CD3+CD8+ТЛ) у пациентов с разным тропизмом вируса	69
4.3 Иммунологические показатели у пациентов в зависимости от наличия выраженной иммуносупрессии (СПИД).....	74
4.4 Ассоциация полиморфизма генов цитокинов TNF-альфа (G-308A) и IL-2 (T330G) с иммунологическими показателями ВИЧ-инфицированных пациентов в зависимости от тропизма вируса	83
Глава 5 КЛИНИЧЕСКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ, ИСХОДЫ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ И ОТВЕТ НА АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТРОПИЗМА ВИРУСА	89
5.1 Клинические проявления ВИЧ-инфекции в зависимости от тропизма ВИЧ.....	89
5.2 Эффективность АРТ в зависимости от тропизма ВИЧ	97
5.3 Частота и причины замен схем АРТ у пациентов, состоящих на диспансерном учете в КДК Гродненской инфекционной больницы	106
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	117
Список использованных источников	117

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АРП	– Антитретровирусные препараты
АРТ	– Антитретровирусная терапия
ВААРТ	– Высокоактивная АРТ
ВГС	– Вирус гепатита С
ВИЧ (HIV)	– Вирус иммунодефицита человека
ВН	– Вирусная нагрузка
ВО	– Вирусологический ответ
ВОЗ	– Всемирная Организация Здравоохранения
ГОИКБ	– Гродненская Областная Инфекционная Клиническая Больница
ИЛ 2 (IL)	– Интерлейкин 2
ИО	– Иммунологический ответ
ИП	– Ингибитор протеазы
ИРИ	– Иммунорегуляторный индекс
ИФА	– Иммуноферментный анализ
ИС	– Иммунная система
кДНК	– Комплементарная ДНК
НИОТ	– Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
HeR5тр	– He R5-тропный вариант ВИЧ
ННИОТ	– Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
ОИ	– Оппортунистические инфекции
ООН	– Организация Объединённых Наций
ПГЛ	– Персистирующая генерализованная лимфаденопатия
ПИН	– Потребители инъекционных наркотических препаратов
ПЦР	– Полимеразная цепная реакция
РБ	– Республика Беларусь
R5тр	– R5-тропный вариант ВИЧ
РНПЦ	– Республиканский Научно-Практический Центр
РСК	– Реакция связывания комплемента
ПМК	– Периферические мононуклеары крови
ПрЭП	– Предэкспозиционная профилактика
ПЦР	– Полимеразная цепная реакция
ТБ	– Туберкулез
ТЛ	– Т-лимфоциты
УЗ	– Учреждение здравоохранения
УЗИ	– Ультразвуковое исследование

УО	– Учреждение образования
УО «ГрГМУ»	– Учреждение образования «Гродненский Государственный медицинский университет»
ХГС	– Хронический гепатит С
ХР	– Хемокиновый рецептор
CD4+ТЛ	– CD4+ Т-лимфоциты
FPR	– False Positive Rate
FTC	– Эмтрицитабин
HLA	– Human leukocyte antigen
Ig G	– Иммуноглобулины группы G
Ig M	– Иммуноглобулины группы M
MVC	– Маравирок
LPV/r	– Лопинавир/Ритонавир
NSI-вирусы	– Синцитий не индуцирующие вирусы
NVP	– Невирапин
SI-вирусы	– Синцитий индуцирующие вирусы
SNP	– Single Nucleotide Polymorphism
TDF	– Тенофовир
Th1	– Т-хелперы 1 типа
Th2	– Т-хелперы 2 типа
TNF- α (ФНО- α)	– Фактор некроза опухоли альфа
ZDV	– Зидовудин
ЗТСТ	– Ламивудин

ВВЕДЕНИЕ

ВИЧ-инфекция продолжает оставаться значимой проблемой здравоохранения в Республике Беларусь в связи с продолжающимся ростом новых случаев инфицирования, с вовлечением в эпидпроцесс преимущественно лиц молодого работоспособного возраста, с необходимостью пожизненного приема антиретровирусной терапии, высокой летальностью [20, 30]. С другой стороны, предоставление всеобщего доступа к АРТ с 2018 г. позволит увеличить продолжительность и улучшить качество жизни ВИЧ-инфицированных пациентов. ВИЧ-инфекция на фоне пожизненной АРТ переходит в категорию хронической инфекции [47].

Тропизм ВИЧ – важное иммунобиологическое свойство вируса, которое заключается в тропности вируса к определенному хемокиновому рецептору CCR5 или CXCR4, выполняющему роль корецептора для входа вируса в клетки человека [26, 124]. При первичной ВИЧ-инфекции в организме инфицированного пациента определяется CCR5-тропный вариант ВИЧ. Однако с течением времени у части пациентов происходит переключение тропизма и вирус начинает использовать наряду с CCR5 новый ко-рецептор – CXCR4. В связи с этим постепенно появляются вирусы с двойным тропизмом (R5/X4-тропные), а позднее, на более поздних стадиях ВИЧ-инфекции, и «чистые» X4-тропные варианты. [50, 69, 173]. В клинической практике тропизм ВИЧ определяется для решения вопроса о возможности назначения пациенту антиретровирусного препарата – антагониста CCR5, который блокирует цикл репликации вируса на уровне связывания gp120 с корецептором CCR5 при внедрении вируса в клетки человека. Данный препарат эффективен лишь при условии наличия у пациента инфекции R5-тропного вируса [36, 47, 99-101, 130-132].

Тропизм ВИЧ-1 к хемокиновым рецепторам связывают со структурой вариабельного участка gp120 – V1-V3 [138, 165]. Большинство исследований по определению тропизма в мире выполнено на изолятах ВИЧ-1, относящихся к субтипам В и С, которые являются доминирующими в странах Западной Европы,

Африки, в США [12, 85, 151, 178]. Известно, что на территории Республики Беларусь (РБ) и в странах СНГ длительное время циркулирует субтип А, который выделяется более чем у 90% пациентов, при этом по своим филогенетическим характеристикам он идентичен вирусам, циркулирующим в России и на Украине. [10, 11, 13, 30, 33]

В работе установлены патоиммунологические особенности формирования иммуносупрессии при разном тропизме ВИЧ, проанализированы клинические и лабораторные проявления и исходы ВИЧ-инфекции, влияние полиморфизма генов TNF-альфа и ИЛ-2 на течение ВИЧ-инфекции при разном тропизме вируса.

Широкое применение АРТ в РБ началось с 2007 г., с 01.01.2018 г. введен универсальный доступ к АРТ, что позволяет предполагать постепенный рост частоты замен АРТ в используемых схемах терапии в связи с непереносимостью препаратов, возникновением неблагоприятных эффектов терапии, нежелательных комбинаций с другими препаратами, отсутствием эффективности терапии, формированием резистентности ВИЧ к наиболее широко используемым в настоящее время группам антиретровирусных препаратов из группы ненуклеозидных и нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы, ингибиторов протеазы. Это обосновывает необходимость внедрения в перспективе новых групп препаратов, не имеющих перекрестной резистентности с указанными препаратами. В связи с этим представляло интерес определить частоту распространения вирусов с разным тропизмом среди ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих на территории РБ, рассчитать количество потенциальных кандидатов для назначения антагониста CCR5 в перспективе.

ГЛАВА 1

ТРОПИЗМ ВИЧ. ИСТОРИЯ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА

1.1 Тропизм ВИЧ. История вопроса

С момента сообщения Центром по контролю и профилактике болезней (CDC) о выявлении первых случаев неизвестного ранее заболевания в США в 1981 г., несмотря на все принимаемые органами здравоохранения меры по его ограничению, распространенность ВИЧ-инфекции в популяции постоянно росла и приобрела статус пандемии [4, 6, 8, 127]. На сегодняшний день данная проблема является актуальной не только для врачей-инфекционистов, но и для всего общества в целом. Широкое внедрение антиретровирусной терапии (АРТ) решает многие проблемы ВИЧ-инфицированных пациентов: своевременное назначение АРТ позволяет свести к нулю прогрессирование ВИЧ-инфекции у значительного большинства пациентов, восстановить функцию иммунной системы, предотвратить развитие тяжелых оппортунистических инфекций, сравнить продолжительность жизни у ВИЧ-инфицированных и у неинфицированных, значительно улучшить качество жизни. Однако, несмотря на успехи ВААРТ, из-за развивающейся резистентности к применяемым препаратам и присущих им побочных эффектов и токсичности, продолжается поиск новых групп препаратов. Одной из таких групп являются антагонисты хемокиновых CCR5-рецепторов [13, 47, 82, 99].

Первый хемокин обнаружен в 1977 г. [152] и с тех пор было идентифицировано большое суперсемейство хемокинов. Хемокины представляют собой небольшие белки с молекулярной массой 8-10 кДа, состоящие не более чем из 100 аминокислот, первоначально продуцирующиеся клеткой в виде более крупных белков-предшественников. Функция хемокинов заключается в контроле клеточной миграции. Некоторые хемокины регулируют движение клеток иммунной системы, направляя лимфоциты к лимфатическим узлам. Другие участвуют в развитии ткани, стимулируя ангиогенез. При воздействии на организм внешних

агентов, например, вирусов, происходит выделение провоспалительных хемокинов. Эффекты хемокинов проявляются их воздействием на рецепторы, связанные с G-белком (GPCR). Хемокины классифицируются как C, CC, CXC и CX3C в зависимости от структуры и количества остатков цистеина. Добавление «R» используется для обозначения рецептора [50].

Первые гипотезы о важной роли, которую играют хемокины в патогенезе ВИЧ-инфекции, были выдвинуты в результате проведенных исследований в лаборатории Р. Галло, которые показали, что высокие уровни некоторых хемокинов могут ингибировать репликацию вируса ВИЧ *in vitro*. Тогда было установлено, что в группе ВИЧ-отрицательных исследуемых имелся высокий уровень нескольких типов циркулирующих хемокинов, таких как RANTES (regulated upon activation T cell expressed and secreted), секретируемых нормальными Т-лимфоцитами, и макрофагальные белки воспаления MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α) и MIP-1 β (macrophage inflammatory protein 1b) [115]. Таким образом, полученные данные привели к возникновению гипотезы о том, что некоторые хемокины могут предотвратить развитие ВИЧ-инфекции путем связывания с неустановленным кофактором вируса ВИЧ [144]. В дальнейшем, когда в 1980-х гг. была открыта важная роль CD4-лимфоцитов как рецепторов ВИЧ, стало очевидно, что для возникновения заражения ВИЧ необходимо наличие и других факторов. Например, при проведении экспериментов оказалось, что клетки мышей, экспрессирующие CD4-лимфоциты, могут не инфицироваться ВИЧ [114]. Достоверность данных гипотез была подтверждена в мае 1996 г. Э. Бергером и его коллегами, открывшими корецептор для ВИЧ, получивший название CXCR4. Было установлено, что данный хемокиновый рецептор совместно с CD4-лимфоцитами является кофактором для инфицирования вирусом ВИЧ, приспособленным для поражения именно Т-хелперов, но не макрофагов. [104]. Незадолго до этого, 19 марта 1996 г., М. Samson опубликовал первый отчет, показывающий свойства молекулярного клонирования, экспрессии и связывания лиганда CCR5 [134] (затем

обозначенный как CC-CCR5). Эти данные побудили исследователей изучить роль CCR5 при проникновении ВИЧ в клетку. Уже через несколько недель после публикаций материалов об открытии CXCR4 дополнительные публикации сообщали о роли хемокиновых рецепторов CCR5 и CCR3 как кофакторов для проникновения в клетки тропного к макрофагам или несинцитий-индуцирующего NSI типа ВИЧ [56, 66].

1.2. Характеристика хемокиновых рецепторов и переключение тропизма вируса

Механизмы, благодаря которым вирус ВИЧ проникает в клетки человека, изучен практически полностью. Установлено, что связывание CD4-рецептора, расположенного на поверхности клеток, с вирусным гликопротеином gp120 вызывает конформационные изменения вирусной оболочки. В результате этих изменений происходит формирование связи комплекса CD4-gp120 с хемокиновыми рецепторами CXCR4 или CCR5 (XP) [22, 84, 126]. В зависимости от тропизма ВИЧ происходит взаимодействие региона V3 белка gp120 с одним из XP. Рецептором для ВИЧ является дифференцировочный антиген CD4 (CD – аббревиатура от Cell Differentiation), по своему строению имеющий гомологии с определенными участками иммуноглобулинов. Аналогичные гомологии имеет и белок вируса gp120, что определяет тропность ВИЧ. Расположенный на мембране иммунокомпетентных клеток Т-хелперов рецептор CD4 выполняет функцию распознавания (в комплексе с белками HLA II класса) антигенов. [98, 165, 188]. Фиксация вируса через gp120 ВИЧ-1 (или gp105 в случае инфицирования ВИЧ-2) с мембранным рецептором CD4 клетки хозяина блокирует основную функцию этих иммунокомпетентных клеток – восприятие сигналов от антигенпрезентирующих клеток. Последующая за рецепцией репликация вируса ведет к гибели этих иммунокомпетентных клеток, выпадению функции, ими выполняемой, что и определяет развитие иммунодефицита [119, 120, 127].

Т-лимфоциты с хелперным фенотипом – это не

единственные клетки со встроенным в мембрану антигеном CD4. Не менее 40% моноцитов периферической крови и некоторые клетки, представляющие антиген в лимфатических узлах, коже и других органах, а также примерно 5% всех В-клеток организма несут CD4 и могут быть инфицированы ВИЧ [91, 125].

В последние годы все большее внимание привлекают корецепторы, и особенно хемокины (хемокины – полипептиды, вызывающие движение клеток в определенном направлении). У человека выделено около 40 подобных белков, некоторые из них используются вирусом иммунодефицита в качестве корецептора, с помощью которого вирус проникает внутрь клетки [164]. Хемокиновые рецепторы состоят из семи трансмембранных доменов, амино- и карбоксильных окончаний [44]. CC-рецепторы часто являются в значительной степени гомологичными, причем CC хемокиновый рецептор 5 типа (CCR5) и CC хемокиновый рецептор 2 типа (CCR2) имеют на 75% аналогичную структуру [57, 66]. Несмотря на значительную схожесть состава этих рецепторов, они связываются с разными лигандами и опосредуют различные эффекты. В состав белка CCR5 входят 352 аминокислоты с молекулярной массой 40,6 кДа [65, 134]. Белок содержит также характерное аминное окончание (N-терминал), семь трансмембранных доменов (TMD), состоящих из гидрофобных остатков, трех внеклеточных петель (ECL), трех внутриклеточных петель (ICL) и цитоплазматического или карбоксильного хвоста (C-терминал). Эти области важны для связывания хемокинового лиганда, функционального ответа рецептора и активности корецептора ВИЧ [45, 58, 85].

Хемокиновый рецептор CCR5 экспрессируется в разнообразных популяциях клеток, в том числе макрофагах, Т-лимфоцитах, дендритных клетках, фибробластах, клетках эндотелия, эпителия, а также клетках центральной нервной системы: нейронах, астроцитах и других [174, 181]. Рецептор играет определенную роль в воспалительном ответе, направляя клетки на участки воспаления. Другие хемокиновые рецепторы работают совместно с CCR5 для стимуляции Т-клеточных функций [69]. Рецепторы усиливают ко-стимуляцию Т-клеток и высвобождение цитокинов из CD4+Т-лимфоцитов. Кроме того,

лиганды для CCR5 увеличивают активацию ответов Т-лимфоцитов и усиливают продукцию антигенспецифических Т-клеток [55]. Во время воспаления уровень экспрессии CCR5 регулируется CD8+Т-лимфоцитами, что позволяет клеткам перемещаться в сторону их взаимодействий. Это увеличивает вероятность появления CD8+лимфоцитов, сталкивающихся с антигенспецифическими клетками. Таким образом, CCR5 усиливает адаптивный иммунный ответ [59, 62].

Известно, что R5-тропный вирус преобладает на стадии первичной инфекции, однако в динамике развития ВИЧ-инфекции примерно у половины пациентов наблюдается переключение тропизма ВИЧ с R5 на X4. На поздних стадиях ВИЧ-инфекции при прогрессии заболевания, формировании СПИДа и уменьшении количества CD4 Т-лимфоцитов происходит повышение уровня X4-тропных вариантов вируса. Группа вирусов с двойным тропизмом (R5X4-тропные варианты ВИЧ) является неоднородной [168]. В их состав входят вирусы, использующие главным образом CCR5-корцептор (так называемые «двойные» R-тропные варианты), а также «двойные» X-тропные типы вируса, взаимодействующие преимущественно с CXCR4-корцептором. Установлено также, что на ранних стадиях заболевания определяются чаще «двойные» R-тропные варианты вируса, тогда как «двойные» X-тропные появляются позже. В динамике развития ВИЧ-инфекции у половины ВИЧ-инфицированных пациентов «переключения» тропизма вируса так и не происходит. У этой части пациентов CCR5-тропный тип вируса доминирует вплоть до развития терминальной стадии заболевания [21, 179]. Плотность CD4-рецепторов на поверхности клеток является важным фактором для ВИЧ-инфекции, хотя CD4+ лимфоциты периферической крови имеют относительно постоянную плотность рецепторов на клеточной мембране. Патогенность R5-тр и не R5-тр вирусов в условиях *in vivo* связана преимущественно с экспрессией корцепторов на поверхности разных клеток организма. На CD4-лимфоцитах экспрессируются CXCR4-корцепторы (также на моноцитах, гемопоэтических клетках-предшественниках Т-лимфоцитов и на клетках тимуса), в

то время как CCR5-корцепторы встречаются на клетках памяти Т-лимфоцитов и макрофагах [54]. В связи с этим происходит ускоренное снижение уровня CD4-лимфоцитов, так как использование вирусом CXCR4-корцепторов позволяет ему повреждать клетки, участвующие в онтогенезе Т-лимфоцитов. По этой причине обнаружение появления CXCR4-тропного вируса имеет значение для прогнозирования исходов, мониторинга прогрессирования заболевания и решения вопроса о выборе терапии [26, 45, 156]. Роль регуляторных fox3 экспрессирующих Т-клеток неоднозначна в патогенезе ВИЧ-инфекции. Позитивная роль данных клеток связывается с торможением процессов активации иммунитета, со снижением риска развития синдрома реконструкции иммунной системы на фоне восстановления иммунитета, сдерживанием иммунопролиферативных оппортунистических инфекций [16, 49, 52]. В связи с этим снижение данной популяции иммунных клеток в ситуации возрастания активации иммунных клеток при формировании СПИДа может рассматриваться как неблагоприятный фактор в патогенезе ВИЧ-инфекции у пациентов с не R5тр ВИЧ [60, 173, 183].

Одна из гипотез подчеркивает, что X4-тропные вирусы более чувствительны к иммунному ответу организма, чем вирусы R5-тр, и как следствие – лучше распознаются и подавляются иммунной системой. На поздней стадии заболевания, когда наблюдается выраженная дисфункция иммунной системы хозяина, могут появиться X4-тропные вирусы.

Существует гипотеза утверждающая, что вирусный фенотип подвергается воздействию пула клеток-мишеней для ВИЧ. Это предположение было основано на разной экспрессии CCR5 и CXCR4 на «наивных» CD4+Т-лимфоцитах, на клетках памяти и на различиях в популяционной динамике этих клеток во время течения болезни. Увеличение скорости распространения «наивных» CD4+Т-лимфоцитов с высоким уровнем экспрессии CXCR4 приводит к «выбору» в пользу X4-тропных вариантов вирусов [88, 103].

Каждая из рассмотренных гипотез представляет разные взгляды на механизмы переключения тропизма и взаимодействие

вируса с иммунной системой. Кроме того, возможно, что несколько механизмов переключения тропизма вируса существуют одновременно друг с другом.

Результаты недавних исследований поддерживают гипотезу о сложности переключения тропизма к корецепторам и предполагают наличие комбинации между сосуществующими популяциями R5 и X4-тропных типов вируса [112, 117, 135]. Рекомбинанты состоят из фрагмента региона env V1-V2 R5-тропного типа вируса (который, как было предположено, является регулятором устойчивости к нейтрализующим антителам) и производной env V3-петли (основной определитель корецептора) у X4-тропного типа вируса [175]. Было выдвинуто предположение о том, что рекомбинация между иммунорезистентным R5-тр вирусом и иммуночувствительным X4-тр типом может способствовать переключению использования одного варианта корецептора на другой [111, 119].

Интерес представляют выявленные различия в переключении тропизма у вируса ВИЧ разных субтипов. При использовании конкурентного анализа для изолятов первичных подтипов ВИЧ-1 В и С было установлено, что все изоляты подтипа С вытеснены изолятами подтипа В. Кроме того, было установлено, что подтип С отличается от других изученных подтипов (А, В и D) [33] с точки зрения более низкой репликативной способности. Таким образом, если подтип С отображает более низкую репликативную способность вируса, вероятно потребность в меньшем количестве мутаций, необходимых для перехода от CCR5 к CXCR4. Тем самым более низкая репликативная способность, приводящая к меньшей эволюционной скорости, в сочетании с требованием дополнительных мутаций для переключения на CXCR4 у подтипа С может объяснить низкую частоту использования CXCR4 корецепторов при поздней стадии заболевания [68].

В 2006 г. результаты исследования репликативных способностей рекомбинантного штамма CRF02_AG и предполагаемых «родительских» изначальных штаммов, подтипов ВИЧ-1 А и G были представлены двумя независимыми исследованиями [111]. Оба исследования показали, что вариант

CRF02_AG имеет более высокую скорость репликации вируса, чем подтип А или G. Это указывает на то, что при наличии рекомбинации между двумя подтипами возникал штамм с более высоким уровнем репликации. Показано, что репликативная способность вируса обратно коррелирует с количеством Т-лимфоцитов CD4+ [40, 43], тем самым связывая репликативную способность вируса и тяжесть заболевания. Как обсуждалось выше, смена корцептора с CCR5 на CXCR4 представляет собой один из путей эволюции биологического фенотипа ВИЧ-1 во время прогрессирования заболевания. Подтип ВИЧ-1 С инфекции широко распространен в мире (>50%), но только у 15% лиц с ВИЧ-1 подтипом С происходит переключение тропизма, ведущее к появлению CXCR4-тропного варианта вируса во время прогрессирования заболевания и формирования СПИДа [45]. Обобщенные данные, основывающиеся на исследовании инфекций ВИЧ-1 подтипа В, свидетельствуют о том, что ВИЧ-1-инфекция приводит к двум разным фенотипическим путям: либо к смене ко-рецептора, либо к адаптивным изменениям популяции вируса R5, включая фенотипические и молекулярные изменения гликопротеина оболочки (Env) структур, параллельно с прогрессированием заболевания [51].

В работе белорусских исследователей определялась распространенность R5 и X4 тропных вариантов ВИЧ-1 у 126 первично выявленных пациентов с ВИЧ/СПИД на территории Республики Беларусь. В исследование были включены образцы, полученные из разных регионов страны: из Минска и области – 74 (58,8%), из Могилевской области – 18 (14,3%), из Гомельской – 13 (10,3%), из Брестской и Витебской по 9 (7,1%), из Гродненской – 3 (2,4%). Таким образом количество пациентов, проживающих на территории Гродно, включенных в исследование было незначительным. В результате проведенных исследований было установлено, что 96 образцов (76,2%) имели R5-тропные варианты ВИЧ, а 30 (23,8%) X4 тропные варианты и X4 тропные варианты вируса (В. Ф. Еремин и др., 2016).

Изучение образцов ВИЧ-1, полученных последовательно

во время прогрессирования заболевания, показало, что R5-тропные варианты вируса, появившиеся после наступления стадии СПИДа, имели повышенную репликативную способность в культурах клеточных линий и первичных Т-лимфоцитов [69]. Сообщено, что «поздние» R5-тр вирусы могут проявлять повышенный тропизм к макрофагам в результате возникающей у них способности использовать более низкие уровни CCR5 на клетках хозяина [85, 93]. Аналогично «поздние» вирусы демонстрировали повышенный цитопатический эффект и апоптоз в клеточной культуре [94, 112]. Следовательно, эти вирусы могут способствовать истощению CD4+ Т-клеток. В попытке найти объяснение развитию иммунодефицита, вызванного R5тр вирусами у пациентов, у которых не произошло переключения тропизма вируса, были изучены патогенные процессы при ВИЧ-инфекции в лимфоидной ткани *ex vivo* [64, 106].

Результаты исследований показали, что группа R5тр вирусов, выделенная у пациентов, у которых не произошло переключения тропизма, истощает больше клеток-мишеней (CD4 + CCR5 +), чем штаммы R5тр вируса, которые сменили тропизм [103].

1.3 Тропизм ВИЧ к CCR5 и CXCR4 и восприимчивость к ВИЧ. Антагонисты CCR5

В 1995 и 1996 гг. исследователи из Aaron Diamond AIDS Research Center начали обследование мужчин, инфицированных ВИЧ, у которых был отмечен высокий уровень хемокинов, продуцируемых клетками *in vitro*. Оказалось, что некоторые пациенты не были инфицированы вирусами ВИЧ первичного или NSI-типа, но были заражены вирусами SI-типа [105,157]. Благодаря этим данным, было сделано предположение о существовании некоторого защитного механизма, связанного с CCR5 рецептором, но не рецептором CXCR4. В дальнейшем было установлено, что этим «механизмом» стало наличие у некоторых пациентов особенностей в структуре гена хемокинового рецептора CCR5, расположенного на коротком

плече хромосомы 3 в позиции 21 (3p21) [94, 107]. У этих пациентов было отмечено существование полиморфизма: а именно делеции 32 пары нуклеотидов в кодирующей области гена CCR5 [22, 170]. Данная мутация влияет как на формирование устойчивости к ВИЧ, так и на характер течения болезни. На современном этапе изучения ВИЧ было подтверждено, что у гомозиготных носителей полиморфизма CCR5-Δ32 существует устойчивость к ВИЧ-инфекции [27, 28]. При наличии у пациента гетерозиготного варианта мутации данного гена, отмечается более медленное прогрессирование болезни, снижена восприимчивость к инфекции и отмечается более позднее начало СПИДа [2, 121, 180]. Данная мутация CCR5 delta 32 распространена преимущественно в странах Европы и Западной Азии. Частота ее встречаемости в некоторых регионах составляет до 5-10%. Около 15% лиц европеоидной расы являются носителями гетерозиготного варианта делеционной аллели и еще около 1% – гомозиготного [31, 39, 87]. Широкий интерес к данной теме возник после доказанного излечения от ВИЧ-1 инфекции пациента, которому в 2007 г. в Германии была выполнена пересадка стволовых клеток костного мозга от гомозиготного донора по мутации Δ32 гена CCR5 [77, 128]. К сожалению, данный случай успешной терапии у так называемого «берлинского пациента» так и остался единственным. В дальнейшем более не удалось повторить сочетание редко встречаемого полиморфизма CCR5 delta 32 и совместимости по системе HLA периферической крови образцов костного мозга, а также достичь стойкой ремиссии. Однако идеи о возможности воздействия на CCR5 и CXCR4 рецепторы продолжали оставаться актуальными.

В настоящее время для лечения пациентов с инфекцией, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), существует более 30 отдельных антиретровирусных препаратов (АРВП) и их комбинаций. Тем не менее, несмотря на достигнутые успехи, остаются проблемы с соблюдением пациентами режимов лечения из-за неудобства приема, токсичности препаратов и резистентности ВИЧ к АРВП. Перед лечащим врачом всегда стоит сложный выбор правильной схемы

антиретровирусной терапии (АРВТ) для каждого конкретного пациента, так как необходимо учитывать множество факторов, связанных как с особенностями самого пациента, так и со свойствами препаратов для лечения ВИЧ-инфекции и сопутствующих заболеваний. Особо сложные задачи возникают при смене режимов АРВТ, когда количество активных препаратов ограничено.

За последнее десятилетие число пациентов, получающих антиретровирусную терапию (АРТ), существенно увеличилось (свыше 8 млн человек), что обеспечило снижение смертности и заболеваемости СПИДом. Дальнейший успех программ АРТ потребует понимания появления моделей резистентности к лекарственным средствам у ВИЧ-инфицированных среди лиц, у которых лечение не удалось, и управления АРТ как с точки зрения отдельных лиц, так и с точки зрения общественного здравоохранения. Многими исследователями изучались данные появления резистентности к лекарственным средствам у ВИЧ-инфицированных среди лиц, у которых в условиях ограниченных ресурсов стартовая терапия и терапия второй линии оказались неэффективными [168].

В соответствии с рекомендациями ВОЗ большинство стран применяют аналогичные подходы к первоначальному антиретровирусному лечению, причем большинство программ выбирают схемы первой линии на основе нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) и 2 нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ). Практически все страны переходят на отказ от ставудина (d4T), который первоначально широко использовался из-за его низкой стоимости и двукратной фиксированной дозы с ламивудином (3ТС) и невирапином (NVP) [17, 47, 177], а принимают терапию на основе тенофовира (TDF) из-за более благоприятного долгосрочного профиля безопасности и комбинации фиксированной дозы один раз в день с 3ТС или эмтрицитабином (FTC) плюс эфавиренц (EFV) или терапию с использованием зидовудин (ZDV) [47, 161]. Схемы второго ряда включают комбинации ингибиторов протеазы (ИП) с 2 НИОТ. На сегодняшний день фиксированные схемы назначения препаратов

третьей линии приняты еще не во всех странах мира.

Наблюдение за возникновением резистентности к лекарственным средствам является определяющим в мониторинге АРТ по рекомендациям ВОЗ. Мониторинг базируется на раннем выявлении низкой эффективности стартовых схем АРТ, наблюдении за передаваемой лекарственной устойчивостью и оценки резистентности вируса к лекарственным средствам, возникшей во время терапии [139, 150]. Наряду с проводимыми мероприятиями ВОЗ, многие исследовательские группы оценивают существующие программы лечения и появление резистентности к лекарственным средствам среди разных групп населения. В настоящее время частота формирования лекарственной резистентности ВИЧ варьирует в зависимости от первоначального выбора стартовой схемы, стратегий мониторинга лечения, индивидуальной приверженности пациентов и других факторов [7, 41].

Распространенность резистентности к АРП первой линии, применяемой при лечении ВИЧ, неоднократно анализировалась на протяжении многих лет. В систематическом обзоре Барта и др. [190], а также в других исследованиях, в которых сообщалось о выделении РНК ВИЧ в крови пациентов, находящихся на АРТ, положительные результаты были получены по меньшей мере через 3 месяца после начала АРТ. Уровень ВН составлял 1000 коп/мкл. Всего по результатам проведенных 89 исследований с 13 288 пациентами со средней продолжительностью лечения 10 месяцев распространенность подавления репликации ВИЧ составила: 78% – после 6 месяцев лечения, 76% – через 12 месяцев и 67% – через 24 месяца. Среди исследований, сообщающих о неудаче лечения в связи с развитием резистентности к ВИЧ-инфекции (27 исследований с 734 пациентами), наиболее распространенными мутациями были мутация M184V, обнаруженная у 65% пациентов, и мутация K103N у 52% пациентов. В меньшей степени были распространены тимидин-аналоговые мутации (TAMs, M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F и K219Q/E): от 5 до 20% пациентов, а мутация K65R обнаружена у 5% пациентов. В более позднем обзоре, включавшем 9 опубликованных исследований из

8 стран, в которых сообщалось о результатах формирования резистентности к ВИЧ через 12 месяцев, установлено, что среди 4248 пациентов недостаточная эффективность проводимой на протяжении 12 месяцев терапии отмечена в 573 (13,5%) случаях. Наиболее распространенными мутациями являлись мутации к НИОТ (прежде всего M184V), обнаруженные у 55% субъектов, и мутации к ННИОТ, обнаруженные в 46% случаев [194].

Среди 36 исследований в 12 странах, в которых проводился эпиднадзор за лекарственной устойчивостью АРП в рамках деятельности ВОЗ, общая резистентность ВИЧ среди пациентов, планирующих начать АРТ первой линии, составляла от 4,8% (в 2007 г.) до 6,8% (в 2010 г.), и это увеличение было обусловлено ННИОТ-связанными мутациями. В частности, в Восточной и Южной Африке отмечается увеличение распространенности резистентности к лекарственным препаратам [100]. Является ли резистентность вируса к терапии последствием инфицирования пациента изначально резистентным штаммом, или же резистентность приобретена на фоне проводимой терапии – до настоящего времени точно не установлено.

Для выполнения оценки приобретенной резистентности службой эпидемиологического надзора ВОЗ через 12 месяцев проводится разделение пациентов на следующие группы: первая – отсутствие резистентности (вирусная нагрузка менее 1000 копий/мл); вторая – возможная устойчивость: ВН более 1000 копий/мл, но не обнаружено резистентности по результатам тестов или клинические данные о результатах терапии пациентов достоверно неизвестны (например, самостоятельное прекращение лечения); третья – документально подтвержденная резистентность (ВН более 1000 копий/мл с выявленными сформированными мутациями) [194]. Среди 29 обследованных пациентов, у которых оценивали резистентность через 12 месяцев, 76,1% находились в группе с отсутствием резистентности, 5,1% были в зарегистрированной группе с достоверной резистентностью, а 18,8% были в группе с возможной резистентностью. Среди пациентов, у которых определялась ВН ВИЧ, резистентность была подтверждена у 72,1%. Как и в других исследованиях, преобладающие мутации,

приводившие к формированию резистентности, состояли из мутаций ННИОТ (69,5% случаев), мутаций НИОТ (62,5%) и комбинации этих двух групп препаратов (59,9%). В большинстве случаев (85%) резистентность была приобретена во время терапии, и только 15% неудач обусловлены базовым сопротивлением вируса ВИЧ.

Pharm Access African Studies для оценки резистентности (PASER) представляет собой многостраничное когортное исследование, в котором приводятся дополнительные данные о резистентности к лекарственным средствам в начале исследования и через 12 месяцев после начала лечения [176]. Когорта PASER включает большее количество пациентов, получающих терапию первой линии на основе TDF, тем самым выступая в качестве полезного ресурса для программ, которые отказываются от применения в схеме первой линии d4T. В частности, 37% когорты получили ZDV, 27% – d4T и 33,5% – TDF. Среди тех, у кого оценка терапии проводилась через 12 месяцев, у 71% был обнаружен штамм ВИЧ с появившимися мутациями, приводившими к возникновению резистентности, у 29% выявлен вирус дикого типа. В данной группе пациентов почти всегда резистентность (96% случаев) была приобретена во время терапии. Преобладающими мутациями вновь были K103N (28,9% случаев) и M184V (53,5%), но дополнительные мутации НИОТ варьировали в зависимости от основной схемы лечения. В недавнем обзоре четырех рекомендованных ВОЗ схем комбинация TDF/ЗТС/NVP была связана с повышенным риском отказа пациента от приема терапии по сравнению со схемой ZDV/ЗТС/NVP, TDF/ЗТС/EFV или TDF/FTC/EFV. Вариант мутации K65R также был более распространен среди пациентов, для которых терапия TDF/ЗТС/NVP признана неэффективной.

На основании данных мониторинга, полученных через 12 месяцев после начала лечения [176, 194] о прогнозируемой активности различных НИОТ, были получены следующие данные: в целом независимо от выбора препаратов НИОТ для стартовой схемы терапии при возникновении неэффективности лечения прогнозируется, что ZDV будет полностью активен у

90% пациентов и что TDF будет активен в 73-85% случаев. Абакавир и диданозин будут иметь меньшую активность (примерно у 60% пациентов), в основном снижение активности возникает у пациентов при установлении мутации M184V. [72, 160]. Прогнозируемая активность и NVP, и EFV невелика (у 10-30% пациентов), и активность этравирин (ETR) также может быть недостаточна (по прогнозам – только у 41% пациентов).

Отмечено успешное применение терапии первой линии в условиях ограниченных ресурсов. Только около 3% всех пациентов, получающих лечение, переходят на прием терапии второй линии [81]. Как уже упоминалось, клинический и иммунологический мониторинг обнаруживает неудачу уже после определения уровня ВН. Это приводит к накоплению большего числа сложных мутаций, которые делают стандартные схемы лечения препаратами ННИОТ второго ряда менее эффективными. Таким образом, оценка результатов лечения схемами второго ряда среди пациентов с резистентным вирусом, выявленным во время применения стартовой схемы лечения, является крайне важной.

Результаты использования схемы второго ряда были удовлетворительными и в значительной степени аналогичными в разных условиях. Среди 19 исследований, в которых сообщается о результатах применения второй линии в странах с низким и средним уровнем дохода, доля пациентов, у которых терапия была неудачной, составила 21,8% через 6 месяцев, 23,1% – через 12 месяцев, 26,7% через 24 месяца и 38% – через 36 месяцев [172]. Среди 5 исследований, сообщающих об эффективности второй линии терапии, все обнаружили ассоциацию между приверженностью к лечению и полученными результатами терапии, т.е. низкая приверженность к терапии была связана с ее неэффективностью. Использование отбора проб волос для определения уровня лопинавира в качестве маркера приверженности к лечению привело к выводу, что у пациентов с плохим эффектом от терапии были самые низкие уровни концентрации препарата.

Только небольшое количество исследований оценивали резистентность к ИП при неэффективности схем второго ряда.

Наиболее часто используемый ИП для этих исследований – препарат лопинавир в комбинация с ритонавиром – LPV/r. В странах Африки наличие штаммов ВИЧ, устойчивых к ИП, обнаруживается примерно в 18% от генотипированных вирусов [190]. Распространенность лекарственной резистентности была самой высокой для препаратов ритонавир (RTV)- и RTV-усиливаемые комбинации атазанавира (ATV/r). В то же время наличие резистентности к ИП очень редко встречается у пациентов в развитых странах, которым данная группа назначается впервые. Учитывая потенциал ИП, ответ на терапию может быть адекватным даже у пациентов, инфицированных вирусом, проявляющим резистентность к НИОТ на высоком уровне. ИП имеют относительно высокие показатели вирусологического подавления при использовании в качестве монотерапии [42].

Понимание принципов формирования лекарственной резистентности ВИЧ может помочь в разработке стратегий профилактики лекарственной устойчивости. В частности, наиболее вероятными мутациями будут мутации ННИОТ и мутация M184V, причем мутация K65R, вероятно, развивается с использованием TDF-содержащих комбинаций. После этого можно ожидать накопления лекарственной устойчивости с комбинациями, содержащими ZDV. Следовательно, использование мониторинга уровня ВН ВИЧ для выявления вирусологической неэффективности при приеме терапии до 12 месяцев от начала лечения будет препятствовать формированию комплексной лекарственной устойчивости и должно быть предпочтительным по сравнению с клиническим или иммунологическим мониторингом. Оптимизация приверженности к лечению и сохранение всех компонентов медицинской помощи имеет решающее значение для предотвращения резистентности. При использовании подходов ВОЗ к оценке приобретенной резистентности было выявлено наличие достаточно обширной группы пациентов с наличием «возможной резистентности», появившейся в результате недостатков диспансерного наблюдения за ними в клиниках. Отслеживание пациентов с низкой приверженностью к терапии

может уменьшить потерю общего числа наблюдений в группе исследуемых и позволит проанализировать результаты у пациентов, возобновляющих терапию препаратами первого ряда [47]. Однако это не может быть осуществлено в странах с недостаточно развитой системой здравоохранения. Наличие части пациентов, имеющих вирус «дикого типа», резистентного как для АРП первой линии, так и для второй линии, указывает на несоблюдение принципов применения ВААРТ как на причину неудачи лечения. Учитывая наличие пациентов, у которых применение схемы второго ряда не было результативным и у которых нет типа ВИЧ, обладающего устойчивостью к ИП, рассматривается вопрос о роли тестирования резистентности перед переключением на схемы третьей линии [61].

В настоящее время существуют пробелы в знании влияния моделей формирования резистентности к препаратам первой линии и эффективности использования препаратов второго ряда [101]. Множественные когорты пациентов и многоцентровые исследования должны быть объединены, чтобы иметь достаточную мощность для оценки влияния резистентности на результаты лечения. Кроме того, частота и характер резистентности при назначении схем второго ряда остается недостаточно изученными. Тестирование на резистентность позволит сделать оптимальный выбор антиретровирусной терапии, сохраняя возможности для лечения в течение всей жизни пациентов.

В последние годы активно изучается новая перспективная группа препаратов, блокирующих рецепторы CCR5, из которых в практику вошел только один.

Хотя структура хемокиновых рецепторов ВИЧ и их роль в патогенезе заболевания на сегодняшний день изучена достаточно подробно, все же многие вопросы использования блокаторов хемокиновых рецепторов в терапии ВИЧ-инфекции до сих пор остаются открытыми. Сразу несколько исследовательских центров в конце 90-х – начале 2000-х годов занимались вопросом о возможности синтеза новой группы препаратов – антагонистов хемокиновых рецепторов CCR5 [99, 130]. Антагонисты рецепторов являются несколько нетипичными по сравнению с

традиционно используемыми АРВ-препаратами, поскольку лекарственное средство связывается непосредственно с клеточным фактором хозяина, а не ВИЧ. При разработке клинической программы (в дополнение к демонстрации безопасности и эффективности будущей группы) возникло несколько существенных вопросов [118, 130, 186]. Во-первых, был необходим коммерчески доступный, клинически подтвержденный анализ для выявления пациентов, инфицированных именно R5-тропным штаммом вируса ВИЧ-1. Этот аспект был основополагающим, поскольку группа антагонистов CCR5 рецепторов воздействует только на R5-тропный тип ВИЧ-1 [82, 86, 99]. Во-вторых, несмотря на очевидно здоровый фенотип лиц, имеющих мутацию CCR5 Δ 32 [158], оставалась неизвестной относительная безопасность долгосрочного воздействия антагонистов CCR5 на организм, поскольку блокирование CCR5 могло отличаться от врожденного отсутствия рецептора CCR5, где иммунная система созрела в отсутствие CCR5 и компенсационных механизмов. У ВИЧ-1 инфицированных пациентов при прогрессировании заболевания и уменьшении количества CD4 лимфоцитов также отмечалось повышение уровня CXCR4-тропных штаммов вируса. Это привело к опасениям, что избирательное воздействие антагониста CCR5 на R5-тропные может привести к возрастанию минорных популяций CXCR4 тропных популяций вируса, что приведет к дальнейшему прогрессированию ВИЧ-инфекции и снижению количества CD4 лимфоцитов [159]. Наконец группе ученых из Великобритании (компания Pfizer Global Research and Development) удалось решить данные задачи, и в декабре 2000 г. было объявлено о создании препарата «маравирик», или селзентри (Selzentry) [132, 146]. Клинические испытания проводились на пациентах, уже получавших ранее АРТ. На основании полученных результатов о наличии у препарата достаточной противовирусной активности против широкого спектра ВИЧ-1 изолятов, а также хорошего профиля безопасности и приемлемой фармакокинетики, в 2007 г. маравирик был одобрен для применения в схемах АТР у ВИЧ-инфицированных пациентов [145]. Были разработаны и другие

аналогичные антагонисты CCR5: Vicriviroc (Schering-Plough) и Aplaviroc (GlaxoSmithKine). В краткосрочном исследовании у ВИЧ-инфицированных пациентов *аплавирок*, первый антагонист CCR5, допущенный для участия в клинических испытаниях, продемонстрировал значительную антиретровирусную активность, однако в последующих испытаниях второй фазы тестирование было прекращено из-за увеличения случаев идиосинкразической гепатотоксичности. При тестировании препарата Vicriviroc (VCV) (Schering-Plough) было выявлено значительное уменьшение уровня вирусной нагрузки у пациентов. Два последующих исследования во время второй фазы испытаний подтвердили антиретровирусную активность и безопасность данного препарата, однако в третьем испытании VCV показал более низкие уровни вирусологической активности по сравнению с другими антиретровирусными препаратами, и его дальнейшая разработка была прекращена [166, 187].

В сентябре 2007 г. был разрешен к применению первый антагонист рецепторов CCR5, разработанный компанией «Pfizer», *маравирок* (MVC, Целзентри). В общей сложности 956 аналогов было разработано, прежде чем получить, наконец, MVC, который показал хорошую противовирусную активность, не блокировал калиевые каналы, **не быстро** метаболизировался, имея хорошую биодоступность. Это был первый антиретровирусный препарат, который не действует непосредственно на вирус. MVC, связываясь с рецептором CCR5, приводит к его конформационным преобразованиям и таким образом блокирует присоединение gp120 ВИЧ к активному центру CCR5. Клинические исследования монотерапии показали, что у пациентов, инфицированных R5-тропным вирусом, через 10-15 дней лечения препаратом MVC уровень РНК ВИЧ снижается на 1,6 log₁₀ (примерно в 40 раз) [169]. В большинстве современных рекомендаций MVC предлагают использовать в составе схем АРВТ у пациентов, ранее не ответивших на АРВТ (ЕАКС, ВОЗ, Россия). Специалистами США рекомендуется использовать препарат MVC у пациентов, ранее не получавших лечение, которым нельзя назначить другие варианты схем АРВТ [193]. *Мравирок* рекомендуется комбинировать с зидовудином (ZDV) и

ламивудином (ЗТС), данные комбинации являются наиболее изученными. Перед применением MVC необходимо определить тропизм вируса к R5-рецепторам. В 2011 г. препарат был зарегистрирован на территории Российской Федерации. Препарат был рекомендован для лечения пациентов с ВИЧ-инфекцией, уже находившихся на АРВТ. Например, при наличии множественной резистентности ВИЧ к АРВП у пациентов, когда рассматривается вопрос о введении в схему АРВТ препаратов нового класса, в том числе и антагонистов рецепторов CCR5 в сочетании с препаратами известных классов, обладающими другим спектром резистентности (дарунавир – DRV, этравири – ETR). Также маравирик рассматривается как вариант замены препарата эфавиренз (EFV) при развитии лекарственной непереносимости последнего. А также при возникших на фоне его приема психических расстройствах или гепатотоксичности, при нарушениях липидного обмена у пациентов, принимающих ингибиторы протеазы ВИЧ (ИП), или при диарее на фоне приема лопинавира, усиленного ритонавиром (LPV/r); в схемах альтернативного режима у пациентов с сопутствующим туберкулезом, у пациентов старше 50 лет или при нарушениях липидного и углеводного обмена либо в случае риска развития сердечно-сосудистой патологии [145, 169]. Данные рекомендации базируются на показателях, полученных в результате проведенных крупных международных исследований по изучению применения препарата MVC в составе схем АРВТ у пациентов как ранее получавших, так и не получавших лечения ВИЧ-инфекции. Исследования MOTIVATE 1 и MOTIVATE 2 (Maraviroc versus Optimized Therapy in Viremic Antiretroviral Treatment Experienced Patients) – это рандомизированные многоцентровые двойные слепые исследования с идентичной структурой, проходившие в разных регионах мира (MOTIVATE 1 – в США и Канаде; MOTIVATE 2 – в Австралии, Европе и США) [99]. Анализ подгрупп объединенных данных с 48-й недели испытаний MOTIVATE проводился на основе таких параметров, как этническая принадлежность пациента, исходный уровень ВН, количество CD4+Т-лимфоцитов, тропизм вируса, наличие генетического полиморфизма и схемы назначенной АРТ.

Результаты показали, что MVC эффективен у группы пациентов, инфицированных R5-тропный ВИЧ-1, которые ранее лечились другими АРТ-препаратами, включая пациентов с низким исходным уровнем CD4+Т-лимфоцитов или высоким уровнем ВН. Исследование MERIT оценивало действие препарата MVC в составе схем АРВТ у пациентов с ВИЧ-инфекцией, ранее не получавших терапии, по сравнению со схемой, содержащей эфавиренц (Maraviroc versus Efavirenz Regimens as Initial Therapy), в которое был включен 721 пациент с ВИЧ-инфекцией [36]. Проведенный через пять лет анализ показал, что 50,8% и 45,9% пациентов, получавших MVC и EFV, соответственно, поддерживали уровень ВН ниже 50 копий/мл. В среднем увеличение количества CD4+Т-лимфоцитов составляло 293 клетки/мкл у пациентов, получавших маравирок, по сравнению с 271 клеткой/мкл у пациентов, получавших эфавиренц. Количество пациентов, прекративших прием препарата из-за развития непереносимости или побочных эффектов, также было ниже в группе принимавших блокатор ССR5-рецепторов. Результаты проведенных исследований убедительно показали, что схемы АРВТ, которые включают в себя препарат маравирок (MVC), высокоэффективны и безопасны при длительном приеме. Данные схемы применимы у пациентов, которые инфицированы R5-тропным типом ВИЧ, вне зависимости от наличия или отсутствия предшествующей АРВТ, исходного уровня РНК ВИЧ и количества лимфоцитов CD4+. При этом получение пациентом данного препарата оказалось независимым фактором увеличения количества лимфоцитов CD4+, что подчеркивает его эффективность и безопасность. Кроме того, MVC обладает рядом положительных свойств, включая минимальное влияние на липидный состав крови и фармакокинетику одновременно принимаемых лекарственных препаратов, что позволяет применять его при сочетанной патологии (вирусные гепатиты, туберкулез). MVC также не оказывает негативного влияния на функцию печени, включая повышение уровня билирубина и активности аминотрансфераз, не требует усилителя, в отличие от ИП, характеризуется отсутствием связи с приемом пищи. Перед включением в схему

АРВТ препарата MVC крайне важно провести исследование тропизма ВИЧ к R5-рецепторам и оптимизировать базовый режим лечения, учитывая индивидуальные особенности пациента, предшествующий опыт лечения и результаты исследования резистентности ВИЧ к лекарственным препаратам. Хотя препарат MVC и не лицензирован в странах Евросоюза для лечения пациентов, ранее не получавших АРВТ, в рекомендациях EACS предусмотрена возможность назначения MVC в составе альтернативных режимов первой линии терапии при непереносимости или в отсутствие выбора препаратов из группы НИОТ [47]. Таким образом, на основании доказанной эффективности и безопасности препарата MVC при длительном применении он может быть рекомендован пациентам с ВИЧ-инфекцией разных категорий, ранее получавших АРВТ, у которых обнаружен R5-тропный вирус. Изменение схемы АРВТ и включение в нее препарата MVC может быть связано как с неэффективностью предшествующего режима лечения, так и с развитием НЯ, обусловленных терапией. Истинная резистентность к MVC редка, так как большинство случаев вирусологической неудачи связаны с увеличением количества ранее не обнаруживаемых X4-тропных штаммов ВИЧ-1 [166]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что MVC неэффективен против двойных/смешанных R5X4-тропных популяций ВИЧ-1. Хотя были зафиксированы мутации, связанные с резистентностью к MVC, наблюдаемые мутации варьировали в зависимости от штаммов ВИЧ-1, и никакие конкретные идентифицированные образцы мутаций не могут прогнозировать устойчивость к MVC. В дополнение к своей роли в борьбе с ВИЧ-1 инфекцией данные клинических испытаний и исследования на животных показывают, что MVC может помочь в лечении других заболеваний, включая рак и воспалительные заболевания [193]. Дополнительные исследования необходимы для дальнейшего ознакомления с безопасностью долгосрочного использования MVC, его эффективности против ВИЧ-1, противовирусной эффективности в резервуарах ВИЧ-1, таких как ЦНС и органы лимфоидной системы, и его потенциальную роль в постконтактной профилактике.

Продолжается испытание препарата в качестве средства для предэкспозиционной профилактики ВИЧ. В 2016 г. был опубликован отчет по второй фазе клинических испытаний препарата Маравирок для предэкспозиционной профилактики (ПрЭП), который испытывался на 406 мужчинах-гомосексуалистах [145]. Среди всех испытуемых, получавших профилактику, у пятерых был выявлен ВИЧ. В четырех случаях наступление заражения ВИЧ может быть связано с тем, что испытуемые нарушали схему приема препарата. В пятом случае нарушений правил приема не отмечено, однако заражение все же произошло, причем результат проведенного теста на наличие лекарственной устойчивости у этого испытуемого был отрицательным. В другом исследовании проводились испытания маравирока как ПрЭП на 188 женщинах. Не произошло ни одного случая передачи ВИЧ.

1.4 Методы определения тропизма ВИЧ

Учитывая, что антагонисты CCR5 корцепторов эффективны только при наличии в организме пациента преимущественно R5-тр типа вирусов, а также то, что переключение тропизма к корцептору происходит в неопределенный момент, становится очевидной необходимость определять тропизм вируса к корцептору до начала терапии данной группой препаратов. Определение тропизма вируса перед стартом лечения позволяет избежать ненужных затрат и уменьшить воздействие негативных факторов на пациента [103].

Существующие методы определения тропизма ВИЧ можно разделить на две группы: фенотипические и генотипические [92, 97, 147]. На протяжении долгого периода тропизм вируса определяли с помощью фенотипических методов. Данные методы определения тропизма ВИЧ основаны на культивировании инфицированных клеток хозяина или инженерного рекомбинантного вируса, произведенного от популяции вирусов пациента, в культуре индикаторных клеточных линий, конституционно экспрессирующих CCR5, CXCR4 или оба корцептора [96, 124, 185]. В конце 1980-х гг. появилась первая

тест-система – МТ-2-анализ, также называемый традиционным фенотипическим методом, позволявшая дифференцировать штаммы ВИЧ на синцитий, не индуцирующие (NSI) вирусы, которые в настоящее время известны как ССR5-тропные, и синцитий индуцирующие (SI) вирусы, известные как Х4-тропные вирусы или Х4/R5 вирусы с двойным тропизмом. МТ-2-анализ был основан на возможности инфицирования Х4-тропным ВИЧ культуры МТ-2 клеток, которые на своей поверхности экспрессировали ХР СХСR4. Таким образом, вирусы, которые не могли инфицировать МТ-2 клетки, относились к синцитий неиндуцирующим. Способность ВИЧ реплицироваться в индикаторных МТ-2-клетках ассоциировалась с выраженным слиянием клеток и формированием синцития, что доказывало наличие Х4-тропных вирусов [67]. Известны две широко использовавшиеся версии МТ-2: одна, в которой клетки пациента непосредственно сокультивировались с клеточной культурой МТ-2, и другая, в которой вирусные частицы вначале выделялись из клеток пациента, а затем культивировались с ВИЧ серонегативными фитогемагглютинин-стимулированными мононуклеарами периферической крови. МТ-2-анализ не являлся технически сложным, однако необходимость в наличии жизнеспособных клеток пациента (свежих или криоконсервированных) и лабораторий третьего уровня биологической безопасности ограничивала его внедрение в клиническую практику. Основным недостатком данного анализа является необходимость выделения вируса из стимулированных периферических мононуклеаров крови (ПМК) пациента. Стандартная процедура выделения вируса требует совместного культивирования клеток ВИЧ-инфицированного пациента и ВИЧ-негативного донора, стимулированных фитогемагглютинином или CD3/CD28 антителами в присутствии интерлейкина-2. Недостатком такой стимуляции является вероятность реактивации интегрированных геномов ВИЧ-1, некоторые из которых могут в момент проведения исследования находиться в нереплицирующемся (неактивном) состоянии в организме пациента. Более того, длительное культивирование образцов крови, так же, как и пассаж изолятов вируса,

потенциально способно накапливать вирусы, свойства которых не отражают корректно характеристики вирусной популяции *in vivo*. Свойства периферических мононуклеаров пациента, стимулированных *in vitro*, могут различаться при сравнении с циркулирующими ПМК того же пациента [53]. Еще один недостаток данного анализа связан с отсутствием возможности разделять CXCR4-тропные вирусы и вирусы с двойным тропизмом. Достаточное накопление изолятов вируса требует высокой квалификации сотрудников лаборатории, что также ограничивало широкое использование данного метода в клинических целях. С учетом указанных трудностей традиционные фенотипические анализы, такие как MT-2 cells, Ghost cells, U87 cell lines, U373-MAGI cell lines, не нашли широкого применения в рутинной клинической практике и в основном использовались в исследовательских лабораториях в научных целях [53].

Новое поколение фенотипических тестов представлено рекомбинантными анализами, разработанными Trofile, Phenoscript, Virco. Они позволяют определять тропизм вируса без культивирования ВИЧ, выделенного от пациента в клеточной культуре. Для системы Trofile существует наибольшее количество клинически подтвержденных данных (около 25 000 проанализированных образцов). Платформы XtrackC/PhenX-R и Virco сочетают генотипические и фенотипические методы определения тропизма ВИЧ [89]. В отличие от традиционных анализов, принципом рекомбинантных является генерирование псевдовирусов, часть генома которых представлена нуклеотидной последовательностью, которая получена из вирусной популяции пациента. На первой стадии РНК ВИЧ-1, выделенная из плазмы пациента, подвергается обратной транскрипции для получения комплементарной ДНК (кДНК). Затем полученная вирусная кДНК используется в качестве матрицы для амплификации региона *env* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В результате амплифицированные фрагменты ДНК, представляющие собой разнообразие нуклеотидных последовательностей региона *env* вирусов, присутствующих у пациента, клонируются в специальный вектор

экспрессии. Полученный вектор позволяет генерировать белки env, соответствующие вирусной популяции пациента. Наконец для того чтобы генерировать псевдовирус, оба вектора должны быть трансформированы в клеточную линию для изготовления окончательного рекомбинантного вируса. ВИЧ-1-геномный вектор генерирует вирусные частицы, использует белки пациента, произведенные вектором env-последовательностей, чтобы закончить сборку псевдовирусов. При определении тропизма псевдовирусы используются во всех фенотипических анализах, чтобы инфицировать клетки-мишени двух линий. Эти клеточные линии экспрессируют на своей поверхности CD4-рецептор и один из ХР – CXCR4 или CCR5. Тип используемых клеток зависит от применяемой тест-системы. После завершения первого цикла анализа в последующих циклах (проба мультицикл) вирусной репликации инфицированные клетки экспрессируют интегрированный индикаторный ген, который может быть доставлен псевдовирусом или является частью клеточного гена. Результаты исследования оцениваются с помощью биолюминесцентного или колориметрического сигналов, которые используются для качественной и количественной оценки вирусных частиц, а также для определения вирусного тропизма. Контроль в определении тропизма вируса может быть подтвержден использованием специфических антагонистов корцепторов на этапе псевдовируса. Результат исследования оценивается с учетом типа инфицированных индикаторных клеток, Х4-тропные вирусы инфицируют CXCR4/CD4-индикаторные клетки, в то время как CCR5/CD4-клетки остаются неинфицированными. С другой стороны, R5-тропный вирус будет преимущественно инфицировать CCR5/CD4-клетки. Популяции со смешанным тропизмом могут инфицировать обе группы клеток [53, 89]. Один из самых известных фенотипических анализов – Trofile. Этот коммерческий анализ длительное время являлся наиболее используемым для определения тропизма ВИЧ-1 в клинических исследованиях. Он позволяет получить быстрые и точные результаты, отражающие свойства вируса в плазме пациента. Этот анализ проводится у пациентов, имеющих вирусную

нагрузку выше 1000 копий/мл [78, 142]. Trofile уже был использован в ряде оценок при клинической разработке нескольких ингибиторов проникновения. Продемонстрирована высокая точность и приемлемая воспроизводимость результатов. Анализ может быть использован для определения тропизма у разных субтипов вируса (B, C, D, E, EA) с достаточной степенью достоверности. Одним из преимуществ Trofile является то, что для определения тропизма вируса анализируется достаточно обширный регион гена *env* размером около 2,5 kb. [143]. Этот регион амплифицируется в ПЦР и представляется на поверхность экспрессирующего вектора, в то время как другие рекомбинантные методы анализируют значительно меньшие по размеру фрагменты регионов. Несмотря на то, что петля V3 gp120 считается основным регионом, определяющим характер тропизма ВИЧ, фрагмент связывания вируса дополнительно включает и другие регионы gp120. Регионы V1, V2, V4, V5 и C4 могут играть определенную роль в формировании тропизма ВИЧ. В связи с этим увеличение протяженности анализируемого региона позволяет повысить точность исследования на тропизм. В качестве индикаторных используются клетки линии U87, которые экспрессируют на своей поверхности CCR5/CD4 либо CXCR4/CD4. Достоверность исследования Trofile зависит главным образом от чувствительности и точности RT-PCR в выявлении квазивидов ВИЧ. В связи с этим важно наличие детектируемого уровня ВН ВИЧ (не менее 1000 копий/мл). Предел выявления минорных популяций вируса в соответствии с инструкцией компании-производителя Trofile составляет от 5 до 10%. К преимуществам Trofile относят безопасность в использовании рекомбинантного вектора, который не способен к репликации. Окончательно не определена точность Trofile в идентификации минорных популяций мутантных вариантов ВИЧ, таких как X4-тропные варианты при инфекции не B-субтипом ВИЧ. Частота неопределенных результатов при использовании анализа Trofile составила от 4 до 6% на 250 000 исследований. Длительность исследования по определению тропизма ВИЧ с помощью Trofile – до 26 дней [86,136]. Второй распространенный фенотипический анализ для определения тропизма ВИЧ-1 –

Phenoscript EnvT M (VIRalliance, Париж, Франция). Он позволяет на одной платформе определять тропизм вируса, а также оценивать чувствительность вируса к ингибиторам проникновения ВИЧ-1. В данном анализе используется 2180 пар нуклеотидов региона env для тестирования на тропизм или резистентность к препаратам. Определение тропизма проводится на основании анализа 900 пар нуклеотидов региона V1-V3. Способный к репликации env рекомбинантный вирус продуцируется в НЕК 293-Т-клеточной культуре посредством гомологичной рекомбинации. Полученными рекомбинантными вирусами производят заражение индикаторов клеток U373MG-CD4, которые экспрессируют либо CCR5/CD4, либо CXCR4/CD4. Принцип работы Phenoscript EnvTM подобен Trofile. Но для оценки результатов используется колориметрический метод, основанный на Tat-индуцированной экспрессии галактосидазы. Частота тропизма в образцах пациентов с ВН ВИЧ от 1000 до 10 000 копий/мл достигала 92%. При вирусной нагрузке ниже 1000 копий/мл успех определения тропизма зависит от возможности выполнения ПЦР-амплификации. Данный анализ продемонстрировал достоверность в определении тропизма при инфекции не В-субтипом ВИЧ. Частота определения тропизма (env V1-V3) данным методом при тестировании 300 образцов субтипа А ВИЧ достигала от 67 до 100%. Общая частота определения тропизма для не В-субтипа при использовании данного рекомбинантного анализа составила 71% [53, 162]. Методы XtrackC и PhenX-R (InPheno AG, Базель, Швейцария) сочетают в себе две специфические реакции: проба на основе гибридизации (XtrackC) и репликативный фенотипический анализ (PhenX-R). На первом этапе исследования XtrackC проводится быстрое тестирование методом геносортинга для идентификации R5- и X4-тропных вирусов. Для этого используются флуоресцентно-меченые зонды, специфичные для R5- и X4-тропных вирусов. Сомнительные результаты и образцы с подозрением на вирус двойного тропизма затем оценивают на второй стадии с использованием репликативного фенотипирования. В отличие от описанных одноцикловых анализов этот метод позволяет проводить репликацию

рекомбинантного вируса в 3-4 циклах, ограничиваясь в общей сложности четырьмя днями. Это приводит к увеличению точности обнаружения минорных популяций ВИЧ. Добавление соответствующих классов препаратов позволяет выделить вирусы с двойным тропизмом из смешанной популяции ВИЧ во время повторных циклов репликации. Преимущества XtrackC и PhenX-R заключаются в их высокой чувствительности в определении минорных популяций вируса и сокращении продолжительности исследования за счет подключения генотипической основы: до четырех дней – при использовании XtrackC и 14 дней – при PhenX-R. PhenX-R-анализ реплицирует популяцию рекомбинантных вирусов на этапах мультицикла. Это позволяет обеспечить более высокую чувствительность метода при обнаружении минорных квазивидов вируса и дает возможность выделить из популяций со смешанным тропизмом вирусы, имеющие двойной тропизм. Однако приходится сталкиваться с теми же проблемами, что и в традиционных анализах, где дополнительная репликация рекомбинантных вирусов может привести к доминированию той популяции вируса, которая *in vitro* имеет более высокую способность к инфицированию клеток. Способность рекомбинантного вируса к репликации позволяет оценивать функциональные свойства вируса. При этом необходимо учитывать, что такие исследования не подходят для лабораторий с недостаточным уровнем безопасности [78, 80, 142, 162]. Платформа определения тропизма Virco состоит из четырех анализов. Все анализы основаны на одностадийной амплификации с предварительной обратной транскрипцией области gp120 ВИЧ-1, включающей регион от V1 до V4 (называемый NH2-V4), который имеет длину в 1307 пар нуклеотидов. В зависимости от целей исследования каждый из 4-х анализов может быть выполнен отдельно: 1) предсказание тропизма на основании популяционного секвенирования V3-петли; 2) клональный генотипический анализ на основании оценки региона NH2-V4 gp120; 3) клональный фенотипический анализ на основании оценки региона NH2-V4 gp120; 4) популяционный фенотипический анализ на основании оценки региона NH2-V4 gp120. Фенотипически тропизм определяется с

помощью анализа экспрессии EGFP, используется сканирующий аргон-лазерный микроскоп. В настоящее время эта платформа применяется только для исследовательских целей, но не в клинической практике. По предварительной оценке, данный анализ может обнаруживать менее пяти процентов минорных популяций вируса при исходной вирусной нагрузке ВИЧ выше четырех логарифмов МЕ/мл (более 10 000 МЕ/мл). Недостатком рассматриваемого метода является низкая чувствительность в выделении минорных популяций вируса при низкой вирусной нагрузке и невозможность разделить популяции вирусов с двойным тропизмом и смешанную популяцию. Кроме того, пока не накоплен достаточный объем информации о достоверности данного метода при исследовании разных субтипов ВИЧ [53, 78, 80]. Сейчас выпускается несколько усовершенствованных фенотипических тест-систем. Так, на смену первоначально лицензированной тест-системе Trofile пришла усовершенствованная тест-система Trofile-ESTA – enhanced sensitivity tropism assay, которая в настоящее время заменила Trofile. ESTA обладает более чем в 10-100 раз превосходящей Trofile чувствительностью в определении минорных популяций X4-тропных вариантов ВИЧ. Например, в образцах, классифицированных (по результатам Trofile) как R5-тропные, при исследовании методом ESTA в 15% были выявлены вирусы с двойным тропизмом. Эта тест-система более чувствительна в обнаружении резистентных к CCR5-антагонистам X4-тропных вирусов в случаях, когда они составляют небольшую долю в вирусной популяции, где преобладают CCR5-тропные штаммы [86, 96, 143]. Потенциальная польза от применения новых, более чувствительных тест-систем продемонстрирована в нескольких исследованиях (Saag, 2008; Su, 2008). Однако тест-системы для фенотипирования дорогостоящи и сложны в использовании. Для проведения исследования необходима вирусная нагрузка не менее 500-1000 копий/мл. Кроме того, до получения результата проходит несколько недель. Оценка требует высокой квалификации специалистов, в связи с чем существует необходимость направления результатов в референс-лабораторию. Технически метод сложно выполнить, и около 15% образцов остаются неопределенными. Это ограничивало широкое

использование фенотипических методов в клинической практике. Поэтому сохранялась потребность в разработке методик, более простых для выполнения и требующих меньших затрат времени. Генотипический метод, основанный на анализе петли V3 gp120, в настоящее время является более доступной и быстро выполнимой альтернативой фенотипическим методам. В связи с доступностью, короткими сроками получения результатов, достоверностью в определении тропизма генотипический метод нашел широкое распространение во многих европейских лабораториях. Ретроспективный анализ с помощью данного метода образцов, включенных в рандомизированные исследования по маравироку (MOTIVATE, MERIT), как и ряд других исследований, продемонстрировал достоверность генотипических методов в отборе пациентов, отвечающих на маравирик-содержащие режимы антиретро-вирусной терапии (АРВТ) [14, 75, 140, 149]. Например, в исследовании, включавшем 160 пациентов, которым маравирик назначался либо в качестве терапии спасения (при вирусной нагрузке ВИЧ более 50 копий/мл), либо по другим причинам – (при вирусной нагрузке ВИЧ менее 50 копий/мл). Вирусологический ответ на маравирик-содержащие режимы к 96-й неделе терапии составил 69% [97]. В исследовании, включавшем 71 пациента, маравирик назначался по результатам генотипического тестирования провирусной ДНК пациентам с недетектируемой вирусной нагрузкой ВИЧ (менее 50 копий/мл). Недетектируемый уровень вирусной нагрузки ВИЧ сохранялся в течение 36 недель у 88% пациентов, в течение 48 недель – у 82% [75, 79].

Оценка эффективности использования первой российской стандартизированной генотипической методики для определения тропизма в лаборатории ЦНИИ эпидемиологии (Москва) проводилась в сотрудничестве с Институтом вирусологии Кельнского университета. Вирусный тропизм определялся путем анализа плазмы крови при исследовании вирусной РНК ВИЧ и клеточной фракции при исследовании провирусной ДНК ВИЧ. Экстракцию нуклеиновых кислот проводили в Центральном НИИ эпидемиологии. Каждый образец был разделен на две равные части, одна из которых анализировалась в ЦНИИ эпидемиологии, а вторая была отправлена в Германию. При сравнении

результатов двух лабораторий получено 100% совпадение, когда исследовалась вирусная РНК (17 образцов). При сравнении результатов анализа провирусной ДНК получено совпадение в 93% (26 из 28 образцов). Итоговая корреляция между нуклеотидными последовательностями составила 97,8% в ходе анализа вирусной РНК и 95,9% – для последовательностей, полученных с матрицы провирусной ДНК. Показано, что исследование провирусной ДНК более эффективно, так как происходит уменьшение количества невалидных образцов [24]. В последние годы предложено несколько рекомендаций по проведению и интерпретации результатов генотипического тестирования тропизма ВИЧ [86, 96]. Необходимо отметить, что как фенотипические, так и генотипические методы определения тропизма являются популяционными исследованиями. Такие исследования уступают по точности клональным анализам, основанным на изучении тропизма каждого вирусного квазивида. Наиболее современный метод определения тропизма ВИЧ – ультраглубокое секвенирование V3-петли – основан на клональном анализе. Этот метод имеет наиболее высокую чувствительность в отношении выявления минорных популяций CXCR4-тропных вариантов ВИЧ, а также их количественной оценки. Данный метод прогнозирования вирусологического ответа на маравирик-содержащие схемы АРВТ соответствует прогностической ценности оригинального анализа Trofile по целому ряду параметров или превышает таковые [38, 74, 75]. Преимуществом глубокого секвенирования по сравнению со стандартным популяционным секвенированием является то, что последнее не может надежно выявить вирусную популяцию, присутствующую в образце менее чем в 20%, тогда как глубокое секвенирование надежно выявляет минорные субпопуляции, вплоть до 1% представленности. Таким образом, как и ESTA, глубокое секвенирование может определять тропизм вируса с большей точностью, обнаруживая минорные не R5-тропные варианты. Ультраглубокое секвенирование на GS FLX и GS Junior instruments от Roche/454 (Branford, CT) использует клональную амплификацию и секвенирование тысяч индивидуальных вариантов для каждого образца. При

проведении большого ретроспективного анализа для оптимизации терапии маравироком в Viremic Antiretroviral Treatment-Experienced Patients (MOTIVATE) данным методом среди получавших маравирик было определено в два раза больше пациентов с не R5-тропным вирусом, чем оригинальным Trofile-анализом. Технически чувствительность данной тест-системы может быть 0,5% или ниже, что достигается путем клональной амплификации. Однако необходимо учитывать, что в реальности чувствительность ультраглубокого секвенирования зависит от вирусной нагрузки в исследуемых образцах. По сравнению с другими генотипическими и фенотипическими методами чувствительность данной тест-системы в рутинной клинической практике, при определении минорных X4-тропных вирусных популяций, может быть недостаточной у пациентов, имеющих низкую вирусную нагрузку. При этом методики ультраглубокого секвенирования остаются дорогостоящими. В перспективе значительное снижение стоимости исследования может быть достигнуто путем использования молекулярных идентификаторов (MIDs), что позволит объединять и одновременно секвенировать несколько образцов [38, 74].

1.5 Генотипические методы исследования. Показания для тестирования на ВИЧ, интерпретация результатов

В международных рекомендациях по проведению генотипического исследования на тропизм вируса выделяют 3 группы пациентов, которым показано тестирование на определение тропизма ВИЧ [86, 96]. 1-я группа – пациенты, не получающие АРВТ, так называемые «наивные» пациенты. Тропизм ВИЧ рекомендуется исследовать в особых клинических ситуациях для решения вопроса о возможности включения маравирока в стартовую схему АРВТ. К таким ситуациям относят: первичную резистентность ВИЧ к АРВТ, индивидуальную непереносимость стандартных стартовых режимов АРВТ, предотвращение нежелательных взаимодействий АРВП с другими лекарственными средствами, которые уже получает пациент. Необходимо отметить, что в настоящее время в клинической

практике такие исследования практически не выполняются, так как мараширок пока, как правило, является компонентом повторных схем АРВТ. Вторая группа – пациенты, получающие АРВТ. В случае неэффективности текущей схемы АРВТ (ВН ВИЧ более 50 копий/мл) тропизм рекомендуется определять параллельно с исследованием на резистентность к разным классам АРВП для рассмотрения возможности включения мараширока в альтернативные схемы терапии. Третья группа – пациенты, получающие эффективную схему АРВТ (вирусная нагрузка ВИЧ – на недетектируемом уровне). Необходимость включения мараширока в схемы АРВТ у таких пациентов может быть связана с формированием нежелательных явлений или взаимодействий с другими препаратами текущих АРВП. В таком случае в качестве матрицы используется провирусная ДНК, которая выделяется из периферических мононуклеаров крови пациента. Допустимо также использовать РНК из плазмы, взятой накануне назначения АРВТ [38, 74, 75, 96].

Существует несколько компьютерных алгоритмов, позволяющих по результатам секвенирования петли V3 региона gp120 ВИЧ классифицировать полученные последовательности в зависимости от тропизма вируса. К наиболее широко используемым в клинической практике относятся компьютерные алгоритмы geno2pheno и PSSM. Оба алгоритма имеют сопоставимую с Trofile чувствительность в отборе пациентов, отвечающих на мараширок. Установлено, что конкордантность между обоими алгоритмами достигает 88%. Тем не менее, алгоритм geno2pheno значительно шире используется в клинической практике. Недостатком данного алгоритма является невозможность автоматической интерпретации тропизма вируса – R5- или X4-тропного [96].

Для разделения вирусов с разным тропизмом используется FPR – false positive rate – величина, определяющая вероятность, с которой данный вирус будет ложно определен как CXCR4-тропный. Образцы крови, имеющие показатель FPR больше заданного уровня разделения, считаются инфицированными R5-тропными вирусами при показателе ниже заданного уровня – не R5-тропными, содержащими как вирусы с

двойным тропизмом (CCR5/CXCR4), так и «чистые» CXCR4-тропные вирусы. Таким образом, чем выше показатель FPR, тем выше вероятность того, что в группе R5-тропного вируса присутствуют «чистые» CCR5-тропные вирусы. При снижении показателя возникает возможность более точного выделения CXCR4-тропных вирусов, в то время как в группу R5-тропного варианта вируса могут попадать вирусы с двойным тропизмом, которые хуже отвечают или не отвечают вовсе на терапию антагонистами CCR5. Матрицей для определения тропизма может служить вирусная РНК, выделенная из плазмы пациентов при наличии детектируемого уровня вирусной нагрузки ВИЧ. При невозможности выделить РНК (недетектируемый уровень ВН ВИЧ) матрицей может служить провирусная ДНК, полученная из клеток крови пациента. В заключение о результатах генотипического исследования образцов на тропизм рекомендуется обязательно включать величину FPR при использовании алгоритма geno2pheno [корцептор] [97]. Частота вирусологического ответа на схемы, содержащие маравирок, при определении тропизма ВИЧ по однократной амплификации петли V3 при FPR, равной 10%, была сравнима с частотой вирусологического ответа при определении тропизма методом тройной амплификации (FPR – 5,7%). В связи с этим обновленные европейские рекомендации не требуют проведения амплификации в трех повторах [96]. В исследовании, включавшем образцы (1221), инфицированные субтипом В ВИЧ, продемонстрировано, что очень низкие значения FPR (2% и менее) позволяют выделить пациентов с низким уровнем CD4, имеющих высокий риск развития тяжелого заболевания, инфицированных «чистыми» X4-тропными вариантами ВИЧ, не чувствительными к антагонистам CCR5. В связи с этим FPR, равный 2%, предлагается как суррогатный маркер иммуносупрессии. В то время как структура пациентов при FPR в пределах 2-10% крайне неоднородна и может включать популяцию, инфицированную вирусами с двойным тропизмом, преимущественно использующими CCR5-корцептор (R5+/X4-), и поэтому способными отвечать на терапию антагонистами CCR5 [175]. Считается, что общая чувствительность генетических

методов для выделения Х4-тропных образцов при инфекции не-В-субтипом ниже, чем при В-субтипе. Например, при уровне FPR, равном 20%, чувствительность для выделения Х4-тропных образцов при В-субтипе составляла 94%, в то время как при не-В-субтипе – 63% при сравнении с фенотипическим методом Phenoscript EnvTM. Причина более низкой точности генотипических алгоритмов при не В-субтипе ВИЧ связана с ограниченным количеством результатов фенотипических методов определения тропизма, внесенных в статистическую базу данных алгоритма, что снижает точность результатов. В связи с этим рекомендуется указывать в результатах тестирования на тропизм и дополнительно – наличие у пациента не В-субтипа ВИЧ. Интерпретация результатов тропизма ВИЧ при не В-субтипе проводится по тем же принципам, как и при субтипе В. Исключение составляет субтип С, для которого существует отдельная программа «matrix C» в алгоритме PSSM [37]. В алгоритме geno2pheno существует возможность повышения точности определения тропизма путем введения дополнительных данных, таких как уровень CD4 Т-лимфоцитов, ВН ВИЧ, наличие делеции в 32 нуклеотиде гена CCR5. Однако эти дополнения приемлемы лишь у пациентов, не получающих АРВТ, кроме того, они не валидированы. Поэтому в настоящее время отсутствуют рекомендации об использовании клинических данных в определении тропизма вируса [86]. Знание субтипа ВИЧ позволяет наиболее точно интерпретировать результаты генотипического метода при установлении тропизма ВИЧ. Это особо важно для субтипа А ВИЧ, широко распространенного в странах СНГ, так как наибольшее количество исследований по определению тропизма ВИЧ выполнено для субтипа В [10, 11, 12]. Субтип вируса может быть определен по результатам секвенирования областей, которые расположены в регионе pol. В данном регионе закодированы протеаза и обратная транскриптаза, которые исследуются при определении резистентности ВИЧ к препаратам АРВТ. Анализ данного фрагмента позволяет определить субтип вируса с помощью алгоритмов Stanford, geno2pheno и других. Алгоритм REGA позволяет определить субтип по любому фрагменту вирусного

генома. Для сравнения точности определения субтипа ВИЧ по регионам env с использованием geno2pheno было выполнено сравнение данного метода определения субтипа ВИЧ по сравнению с субтипированием региона pol и env с помощью алгоритма REGA/Comet и филогенетического анализа по региону pol и env. Установлено, что совпадение результатов субтипирования, выполненного алгоритмом geno2pheno, для региона env и субтипирования региона pol, выполненного филогенетическим методом, составило 83,5%, при использовании алгоритма REGA/Comet – 84,7%. Уровень совпадения субтипирования по региону env, выполненного алгоритмом geno2pheno и филогенетическим анализом, составил 90,6%, алгоритмом Comet – 91,8%. Основным недостатком определения субтипа ВИЧ по env с использованием алгоритма geno2pheno является низкая чувствительность метода для выявления рекомбинантных форм ВИЧ. Авторы указывают, что точность определения субтипа повышается с увеличением протяженности анализируемого фрагмента генома. В то же время преимуществом данного метода можно считать возможность одновременного определения тропизма и субтипа вируса по одному региону [32]. К недостаткам генотипических методов можно отнести более низкий порог чувствительности обнаружения субпопуляции X4-тропных вариантов ВИЧ (FPR – 15-20%), отсутствие стандартизированной методики [32, 37].

1.6. Полиморфизм генов цитокинов TNF α и IL-2

С развитием молекулярной генетики стало очевидным, что предрасположенность к мультифакториальным заболеваниям, эффективность и безопасность их лечения в значительной степени определяется специфичным набором полиморфных вариантов генов. Известно, что каждый ген расположен в одной из 23 пар хромосом. Две аллели могут быть одинаковыми – гомозиготный генотип, или отличаться друг от друга – гетерозиготный вариант. Генетический полиморфизм – это нуклеотидные вариации в определенном участке геномной последовательности, включая вставки, делеции,

однонуклеотидные делеции (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), составляющие до 90% всех вариаций генома [29, 99].

Цитокины вовлечены в иммунопатогенез ВИЧ-инфекции с ранних стадий заболевания. Баланс про- и противовоспалительных цитокинов играет важную роль в системной иммунной активации и, следовательно, в прогрессировании заболевания ВИЧ-инфекции. [29, 70, 163].

Ген TNF α локализуется в 6 хромосоме в регионе класса III главного комплекса гистосовместимости между HLA-B и HLA-DR. В промоторной области расположены SNP этого гена. Большинство исследований выполнены по полиморфизму – 308G/A промоторной области гена TNF-A [1, 3].

Фактор некроза опухоли альфа (TNF α) является важным провоспалительным цитокином, играющим роль в регуляции дифференцировки, пролиферации и гибели клеток, а также при воспалении, врожденных и адаптивных иммунных реакциях. Наличие полиморфизма в регуляторной области приводит к нарушению транскрипции гена TNF α , что в свою очередь влияет на уровень циркулирующего цитокина и тем самым увеличивает восприимчивость человека к разным заболеваниям (инфекционным, опухолевым, аутоиммунным, нейродегенеративным и др.) [1, 35, 71].

Для гена TNF- α в международных базах данных HuGEN и GeneCards представлена информация о разном количестве полиморфизмов и их возможной ассоциированности с инфекционными, аутоиммунными заболеваниями, злокачественными и доброкачественными новообразованиями: HuGEN – 43 (34 SNP, 9 инсерций-делеций) и GeneCards – 95 SNP [148]. Наиболее распространенные G308/308A полиморфизмы гена TNF- α , расположенные в промоторном регионе, влияющие на уровень продукции медиатора, в мировых популяциях распределены в соотношении 0,900:0,100. По многочисленным данным, полиморфизм TNF- α – 308G/A, наличие гетерозиготного варианта генотипа GA ВИЧ-инфицированных пациентов ассоциируется с медленным прогрессированием заболевания [3, 93, 163, 184].

Ген IL-2 локализован в 4 хромосоме человека в области

q26 -q28 около генов, кодирующих другой цитокин – эпидермальный ростовой фактор (EGF, 4q25-q27) [71].

Данные литературы о влиянии полиморфизма гена IL-2 (T330G) на течение и исходы ВИЧ-инфекции противоречивы. Так, в российском исследовании показано, что аллель T и гомозиготный генотип TT обладают протективным эффектом в отношении прогрессирования ВИЧ-инфекции, в то время как неблагоприятные исходы ВИЧ-инфекции ассоциировались с аллелем G промоторного региона гена IL-2 [3].

В то же время в других работах не отмечено ассоциаций между генетическим полиморфизмом генов IL-2 – 330G/T +160T/G у жителей Северной Америки и прогрессированием ВИЧ-инфекции [70].

1.7. Динамика тропизма ВИЧ на фоне АРТ

Динамика изменения тропизма к ко-рецепторам у инфицированных ВИЧ-1 пациентов под влиянием АРТ на настоящий момент до конца не изучена. Частота переключения тропизма вируса у пациентов находящихся на АРТ, в настоящее время достоверно не установлена.

По результатам большинства исследований у пациентов, получающих АРТ не менее 2 лет тропизм вируса остается неизменным приблизительно у 80% пациентов.

В когортном наблюдательном проспективном исследовании оценивалась частота переключения тропизма в 2-х группах пациентов: 1-я группа – 124 пациента с персистирующей детектируемой вирусной нагрузкой ВИЧ (ДВН) на фоне АРТ и 2-я группа – 71 пациент с недетектируемой ВН ВИЧ (НДВН). Тропизм ВИЧ определялся генотипическим методом дважды: после начала АРТ и приблизительно через 2 года, медиана интервала между двумя определениями составила 22,9 (20-28,5) месяца. В обеих группах было зафиксировано переключение тропизма ВИЧ. При этом переключение тропизма с неR5тр на R5тр вирус было установлено у 32% пациентов с ДВН и у 20% с НДВН ($p>0,05$). Переключение тропизма с R5тр на не R5тр вирус имело место у 14% и 16% пациентов, соответственно

($p > 0,05$). Предиктором переключения тропизма с неR5тр на R5тр был низкий уровень CD4+Т-лимфоцитов. У 22 (18%) пациентов с ДВН и 4 (6%) пациентов с НДВН было отмечено прогрессирование ВИЧ-инфекции с развитием СПИД-ассоциированных заболеваний в динамике наблюдения ($P=0,02$). Риск прогрессирования заболевания независимо ассоциировался с такими факторами как переключение тропизма на фоне АРТ, возраст пациента, уровень CD4+Т-лимфоцитов, вирусная нагрузка. Авторы пришли к выводу, что переключение тропизма ВИЧ на фоне АРТ может происходить в разных направлениях, со статистически не различимой частотой у пациентов как с ДВН, так и НДВН, может рассматриваться как неблагоприятный фактор в отношении прогрессирования ВИЧ-инфекции. Для подтверждения выдвинутой гипотезы необходимо проведение исследований в более обширных группах пациентов. По данным одного из последних подобных исследований, тропизм ВИЧ оставался стабильным у 87% пациентов, у 2 пациентов произошло переключение, соответственно, с X4 на R5 и с R5 на X4. Показано, что как R5-тропные, так и не R5-тр штаммы вируса сохраняются в резервуарах и после длительного подавления репликации вируса в плазме [59]. В более ранних исследованиях было подтверждено, что стабильность использования корцепторов CCR5 коррелирует с поддержанием ВИЧ-РНК менее 2,5 log копий/мл. Были обнаружены корреляции между стабильностью тропизма (использования корцепторов) и остаточной вирусемией, изменением провирусной ДНК и репликативной способности вируса. В связи с чем было выдвинуто предположение, что в дальнейшем изучение этого аспекта даст новое представление о механизмах переключения тропизма ВИЧ к корцепторам у пациентов с неопределяемым уровнем ВН, находящихся на АРТ [168]. Безусловно установленным на данный момент фактором, который может предсказать скорую смену тропизма ВИЧ от R5 к не R5-тр, считается низкий уровень CD4 Т-лимфоцитов [109, 135]. Таким образом, наличие нестабильного корцепторного тропизма, независимо от направления перехода тропизма, связано с неблагоприятными колебаниями уровня CD4-лимфоцитов и

повышенным риском прогрессирования заболевания, особенно у пациентов с определяемым уровнем ВН. Это может помочь объяснить, почему значительное число пациентов, диагностированных на поздней стадии заражения ВИЧ-1, были инфицированы имели R5tr штаммами вируса [155, 156, 168].

Результаты воздействия тропизма на долгосрочную оценку риска прогрессирования заболевания у пациентов, получающих АРТ, отсутствуют. Большинство предыдущих исследований оценивали риск прогрессирования заболевания по отношению к корецепторному тропизму с помощью алгоритма geno2pheno, определенного в один момент времени, что давало противоречивые результаты [173].

Таким образом, были сделаны следующие выводы:

1. Тропизм ВИЧ является важным иммунобиологическим свойством вируса, отражающим способность вируса к мутации в динамике развития ВИЧ-инфекции.

2. В настоящее время разработаны современные методы исследования тропизма, которые позволяют достоверно установить характер тропизма вируса и адаптированы к применению в широкой клинической практике.

3. Несмотря на длительное изучение тропизма ВИЧ в мире, в Республике Беларусь данные исследования проведены в недостаточном количестве.

4. Остается много нерешенных вопросов о влиянии переключения тропизма на клинко-иммунологические проявления, исходы ВИЧ-инфекции; о влиянии полиморфизма генов цитокинов на течение ВИЧ-инфекции при переключении тропизма ВИЧ. Не проводились исследования о наличии филогенетической взаимосвязи последовательностей петли V3 гена gp120 и характером тропизма вируса.

5. Не оценивалось влияние АРТ на течение ВИЧ-инфекции с учетом тропизма вируса у пациентов, проживающих в РБ.

ГЛАВА 2

ОПИСАНИЕ ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОВ, ОБОРУДОВАНИЯ

2.1 Характеристика пациентов, включенных в исследование.

Исследование проводилось на кафедре инфекционных болезней УО «Гродненский государственный медицинский университет» (заведующий кафедрой – д-р мед. наук, доцент Матиевская Н. В.); на базе консультативно-диспансерного отделения и диагностической лаборатории УЗ «Гродненская областная инфекционная клиническая больница» (главный врач канд. мед. наук, доцент Кроткова Е. Н.); на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора; в научно-исследовательской лаборатории УО «Гродненский государственный медицинский университет» (заведующий – канд. мед. наук, доцент Курбат М. Н.).

Объектом исследования были 470 пациентов с диагнозом ВИЧ-инфекция, состоящих на учете в консультативно-диспансерном кабинете (КДК) УЗ «Гродненская областная инфекционная больница». Среди них 234 (49,8%) мужчины и 236 (50,2%) женщин, средний возраст – $39,1 \pm 6,1$ лет). Среди пациентов было 126 (26,8%) жителей г. Гродно и 344 (73,2%) жителя Гродненского района. На 1-й стадии ВИЧ-инфекции находилось 238 (50,6%) чел., на 2-й – 40 (8,6%), на 3-й – 144 (30,6%), на 4-й – 48 (10,2%). СПИД диагностирован в 115 (24,5%) случаях. Парентеральный путь инфицирования ВИЧ установлен у 67 (30,6%) пациентов, половой путь инфицирования – у 402 (85,5%). Коинфекция вирусом гепатита С присутствовала у 80 (17,1%) пациентов, коинфекция вирусом гепатита В – у 1 пациента, коинфекция вирусом гепатита В+С – у 2 пациентов.

У 98 пациентов определен тропизм ВИЧ. Для выполнения поставленных задач проведено проспективное контролируемое клиническое исследование открытым методом.

В группе исследования по определению тропизма ВИЧ было 55 (56,1%) женщин и 43 (43,9%) мужчины (средний возраст – $36,4 \pm 5,8$ лет). В среднем стаж врачебного наблюдения пациентов составил ($3,5 \pm 1,8$ года). Среди пациентов было 25 (25,5%) жителей г. Гродно и 73 (74,5%) жителя Гродненского района. На 1-й стадии ВИЧ-инфекции находилось 49 (50%) пациентов, на 2-й – 12 (12,2%), на 3-й – 27 (27,6%), на 4-й – 10 (10,2%). СПИД был диагностирован в 32 (32,7%) случаях. Парентеральный путь инфицирования ВИЧ был установлен у 30 (30,6%) пациентов, половой путь инфицирования – у 68 (69,4%). Коинфекция вирусом гепатита С присутствовала у 44 (44,8%) пациентов, коинфекция вирусом гепатита В+С – у 1 (1,02%).

Среди включенных в исследование пациентов работали 45 (45,9%) пациентов, 53 (54,1%) пациента указали, что нигде не работали. В браке состояли 56 (57,1%) обследуемых.

Антиретровирусную терапию получали 62 (63,2%) пациента.

За время наблюдения умерли 13 (13,2%) пациентов. Причинами смерти в 7 случаях стала терминальная стадия ВИЧ-инфекции, в 4 – развитие тяжелых форм туберкулеза, 1 случай онкологического заболевания (рак слепой кишки), и в 1 случае непосредственной причиной смерти стала термическая травма и ожоговая болезнь у пациента с диссеминированным туберкулезом легких. Группу контроля составили 16 здоровых лиц (3 мужчин и 13 женщин, без маркеров парентеральных гепатитов и ВИЧ-инфекции, средний возраст $32,5 \pm 15,1$ лет).

В зависимости от тропизма ВИЧ пациенты были разделены на 2 группы: 1-я группа – 63 (64,2%) пациента, инфицированных R5-тропным вариантом ВИЧ, 2-я группа – 35 (35,8%) пациентов, инфицированных не R5-тропным вариантом.

Критерии включения в исследование по тропизму ВИЧ: верификация диагноза ВИЧ-инфекция (ИФА, иммунный блоттинг, ПЦР), наличие результата определения тропизма ВИЧ, иммунологического и вирусологического мониторинга, добровольное (с письменным информированным согласием) участие пациентов в исследовании.

Основу методологии составили 2 общепринятых метода клиничко-лабораторного обследования пациентов: общеклинический,

который включает клинико-anamнестические сведения, объективные данные, результаты общепринятых лабораторных исследований, а также специальные методы, реализация которых позволила ответить на поставленную цель и задачи работы.

2.2 Этиологическая диагностика ВИЧ-инфекции и оппортунистических инфекций

Диагноз ВИЧ-инфекции устанавливался на основании определения антител к ВИЧ методом ИФА (тест-системы: ИФА-Рекомбинант-НIV 1, 2, СП ООО «Фармлэнд», Республика Беларусь; ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН, ООО НПО «Диагностические системы», Российская Федерация; Enzygnost® HIV Integral II, Siemens, Германия) с подтверждением иммуноблотом (тест-система ИФА-лайн-блот-ВИЧ 1,2 ЗАО «Эколаб», Российская Федерация).

Стадии ВИЧ-инфекции устанавливались на основании клинической классификации ВИЧ (ВОЗ, 2012). СПИД верифицировался при наличии у пациента 4-й клинической стадии и/или иммуносупрессии, установленной на основании показателя CD4+Т-лимфоцитов 200 кл/мкл и ниже.

Все пациенты были обследованы на серологические маркеры ВГВ и ВГС с помощью тест-систем «АмплиСенс HB-FL» и «АмплиСенс HCV-FL» (ИФА), у некоторых выполнялось качественное и количественное определение РНК вируса гепатита С методом ПЦР.

Определение вирусной нагрузки ВИЧ в сыворотке крови выполнялось с использованием коммерческой тест-системы «АмплиСенс ВИЧ Монитор», соответственно, производства Центрального НИИ эпидемиологии (г. Москва, Россия) согласно инструкциям, прилагаемым к наборам.

Антитела классов М и G к вирусам простого герпеса 1 и 2 типов, вирусов Эпштейн-Барр, токсоплазме определялись методом иммуноферментного анализа на базе клинической лаборатории УЗ «ГОИКБ». Определение иммуноглобулинов классов М и G к вирусам простого герпеса 1 и 2 типов в крови выполнялось методом ИФА с использованием тест-системы

«Herpes Ig M, Ig G», (Вектр Бест, Россия). К вирусу Эпштейн-Барр – «Anti-EBV CA ELISA Ig M , Ig G » (Германия), к токсоплазме определялось «Toxoplasma Ig M , Ig G» (Вектор Бест, Россия).

2.3 Определение тропизма ВИЧ

Определение тропизма ВИЧ-1 к корцепторам CCR5 и CXCR4 было выполнено генотипическим методом путем определения нуклеотидной последовательности петли V3 гена белка оболочки (*gp120*) ВИЧ в 107 образцах плазмы и лимфоцитов крови (у 9 пациентов определение тропизма выполнено дважды в динамике наблюдения). Матрицей для определения тропизма у пациентов с детектируемым уровнем вирусной нагрузки (ВН) ВИЧ была РНК (n=47), при недетектируемом уровне ВН ВИЧ – ДНК провируса, выделенная из лимфоцитов крови (n=60). Редактирование нуклеотидных последовательностей и получение консенсусной нуклеотидной последовательности проводилось с помощью программного обеспечения «ДЕОНА» (МедАйТи Групп, Россия).

Пример нуклеотидной последовательности петли V3 гена *env* ВИЧ-1 пациента, инфицированного не R5 тропным ВИЧ (FPR-1,5):
TGTRTCAGRCCTKACARMAAAAAMTATAASAACAAGTATAC
GTATAGGACCAGGAMAAMCSTTCTATGCAACAGGTGATGT
AATAGGGGACCCSAAGGAAAGCAUATTGT.

Анализ нуклеотидной последовательности производился на сайте <http://www.geno2pheno.org/> Института информатики Макса Планка (Max Planck institut informatik, Германия).

Определение тропности вируса осуществлялось на основании показателя FPR (false positive rate) – величине, определяющей вероятность, с которой данный вирус будет ложно определен как X4-тропный. CCR5-тропным считался образец при наличии показателя FPR более 20%. При величине FPR менее 20% образцы рассматривались как не CCR5-тропные (R5/X4, либо R4-тропные).

Определение субтипа ВИЧ проводилось на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена

белка оболочки с помощью ресурса REGA HIV-1 Subtyping Tool – Ver, 3.0.

Филогенетический анализ последовательностей петли V3 гена белка оболочки ВИЧ проводился при помощи ПО MEGA ver.6.06. Дерево построено методом Maximum Likelihood с использованием модели эволюции НКУ. Полученное дерево было протестировано методом статистического бутстрэпа, количество выборок составило 1000.

2.4 Изучение показателей иммунитета

Показатели клеточного иммунитета были определены в 2-х группах пациентов: 1-я группа – 34 пациента, инфицированных R5 тропным (R5тр) ВИЧ; 2-я группа – 19 пациентов, инфицированных R5 тропным (не R5тр) ВИЧ. Группу контроля составили 16 здоровых лиц (3 мужчин и 13 женщин, без маркеров парентеральных гепатитов и ВИЧ-инфекции, средний возраст $32,5 \pm 15,1$ лет). СПИД устанавливался при наличии у пациента 4-й клинической стадии ВИЧ (ВОЗ, 2012) и/или уровня CD4+T-лимфоцитов менее 200 кл/мкл.

Иммунофенотип клеток крови определяли методом проточной цитометрии. Исследуемый образец крови в количестве 100 мкл инкубировали с соответствующими моноклональными антителами на протяжении 15 мин при температуре 4°C. Использовали следующие панели антител:

1) CD4 FITC, клон MEM-241, CD8 PE, клон MEM-31, CD3 PerCP, клон UCST1, HLA-DR APC, клон MEM-12 (ExBio, Чехия);

2) CD3 FITC, клон UCST1, CD16 PE, клон 3G8, CD56 PE, клон LT56, CD45 PerCP, клон MEM-28, CD19 APC, клон LT19 (ExBio, Чехия);

3) CD195 (CCR5) FITC, клон 2D7/CCR5 (BD, США), CD184 (CXCR4) PE, клон 12G5 (BD, США), CD4 PerCP-Cy5.5, клон MEM-241 (ExBio, Чехия), CD25 APC, клон MEM-181 (ExBio, Чехия).

Для корректной настройки параметров компенсации готовили single-stained контроли. Лизировали эритроциты

раствором хлорида аммония на протяжении 15 мин при температуре 18–25°C. Затем клетки осаждали путем центрифугирования в течение 5 мин, удаляли супернатант и суспендировали клетки в 300 мкл фосфатного буферного раствора. Учет проводили на проточном цитометре FACSCalibur. В каждом образце подсчитывали не менее $5 \cdot 10^5$ клеток. Данные анализировали при помощи программы Weasel версии 3.2. Рассчитывали относительное содержание субпопуляций клеток (%), абсолютное содержание (клеток/мкл), а также относительную интенсивность экспрессии молекул клетками, которую выражали в условных единицах флуоресценции (усл. ед.).

2.5 Определение полиморфизма генов фактора некроза опухолей- α (TNF- α) (G-308A) и интерлейкина-2 (IL-2)(T330G)

Для проведения анализа частотных характеристик генотипов у пациентов были выбраны два гена кандидата: фактор некроза опухолей- α (TNF- α) (G-308A) и интерлейкин-2 (IL-2)(T330G). Определение полиморфизмов генов TNF- α (G-308A) осуществляли методом realtime PCR (ПЦР в режиме реального времени, анализатор Rotor-Gene 6000) с аллель-специфичными праймерами, синтезированными в НПФ «Литех», Россия. Определение полиморфного варианта T330G гена интерлейкина-2 (IL-2) проводили методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией результата с применением соответствующего набора реактивов производства «Литех» (РФ). Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов цельной крови. Определение вирусной нагрузки ВИЧ выполняли с использованием коммерческой тест-системы «АмплиСенс ВИЧ Монитор» (г. Москва, Россия).

Для выявления полиморфизмов генов интерлейкина-2 и TNF-alpha выделяли ДНК набором реагентов «ДНК-ЭКСПРЕСС-КРОВЬ» («Литех», РФ), предназначенным для выделения геномной ДНК из лейкоцитов цельной венозной крови. Согласно инструкции, в пробирку типа «Эппендорф» с замком вносили 1000 мкл цельной венозной крови и центрифугировали со скоростью 3000 об/мин при комнатной температуре в течение

5 минут. После центрифугирования кровь разделялась на плазму и форменные элементы. Плазму над слоем клеток крови аккуратно удаляли, не захватив при этом поверхностно расположенный слой лейкоцитов. Закрытые пробирки выдерживали при -20°C до полного замораживания форменных элементов (в течение 1 часа). После этого содержимое пробирки полностью размораживали при комнатной температуре. Далее вносили реактив «ДНК-экспресс-кровь» в объеме, равном объему оставшихся в пробирке форменных элементов. Содержимое пробирки в течение 10 секунд тщательно перемешивали на встряхивателе (вортексе) и устанавливали пробирку в предварительно прогретый до 98°C термостат на 15 минут. После этого содержимое пробирки центрифугировали со скоростью 14000 об/мин при комнатной температуре в течение 15 секунд. Полученный таким образом супернатант использовали в качестве исследуемого образца ДНК.

Определение полиморфного варианта T330G гена интерлейкина-2 (И-2) проводили методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией результата с применением соответствующего набора реактивов производства «Литех» (РФ). Набор реагентов состоял из нескольких компонентов, включающих Taq ДНК-полимеразу, разбавитель, две реакционные смеси для выявления каждой аллели. Рабочую реакционную смесь для обеих аллелей готовили согласно инструкции производителя, исходя из количества исследуемых образцов и отрицательного контроля. В пробирки с 20 мкл реакционной смеси «Аллель 1» и «Аллель 2» вносили по 5 мкл раствора исследуемой ДНК. Для отрицательных контрольных проб использовали по 5 мкл разбавителя. Амплификацию исследуемого локуса ДНК проводили на термоциклере Applied Biosystems 2720. В термостат, прогретый до 94°C , помещали отцентрифугированные при 2400 об/мин пробирки и проводили амплификацию по следующей программе: 93°C – 1 мин., далее 35 циклов 93°C – 10 сек., 64°C – 10 сек., 72°C – 20 сек., 72°C – 1 мин., охлаждение до 10°C . Разделение продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле, приготовленном на TAE-буфере и окрашенном

Zubrgreen. Визуализацию и регистрацию ПЦР продуктов осуществляли с помощью системы гель-документирования «GelDocXR+ ImagingSystem». При интерпретации результата в одном исследуемом образце учитывали наличие светящихся полос, которые соответствовали ампликонам каждой аллели. При этом в отрицательном образце контролировали выявление лишь более подвижной полосы димеров праймеров и отсутствие полос ампликонов.

Выявление полиморфизма гена TNF- α (G-308A) осуществляли с применением набора реагентов «SNP-экспресс-РВ» производства НПФ «Литех», РФ. Данная реакционная система позволяет выявить указанный полиморфный вариант гена методом ПЦР в режиме реального времени. Сущность метода заключается в том, что с образцом выделенной ДНК проводятся две реакции амплификации с двумя парами аллель-специфичных праймеров. В реакционной смеси присутствует интеркалирующий краситель SYBR green, флуоресценция которого возрастает при встраивании в образующийся двухцепочечный продукт.

Для проведения исследования из компонентов набора готовили 2 реакционные смеси, исходя из количества анализируемых образцов и наличия положительного и отрицательного контроля. Согласно инструкции, рабочая смесь для каждой аллели включала (из расчета на 1 пробу) 17,5 мкл разбавителя, 2,5 мкл реакционной смеси для выявления соответствующей аллели, 0,2 мкл Taq-полимеразы, 0,2 мкл красителя SYBR green. В рабочие пробирки вносили по 20 мкл приготовленной реакционной смеси и 5 мкл раствора ДНК. В отрицательный контроль добавляли аналогичное количество разбавителя, а в положительный – контрольный образец ДНК. Амплификацию исследуемого локуса ДНК проводили на амплификаторе «Rotor Gene Q» (Qiagen) с регистрацией флуоресценции красителя по каналу Green в режиме реального времени. Программа амплификации включала следующие стадии: 93°C – 1 мин., далее 35 циклов 93°C – 10 сек., 60°C – 10 сек., 72°C – 20 секунд.

Детекция продуктов амплификации осуществлялась прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании полученных данных происходило автоматическое

построение кривых накопления флуоресцентного сигнала по двум аллелям каждого образца. При анализе результата использовали значение порогового уровня флуоресценции, равное 0,15. При значении критического уровня амплификации (Ct) менее 27 результат считался положительным, а при Ct более 30 – отрицательным. В случае гетерозиготной формы указанного гена разность между циклами не превышала 1,5 циклов. Отрицательный контрольный образец характеризовался низким уровнем флуоресценции сигнала в обеих аллелях, в то время как в положительном образце специфическая реакция амплификации происходила в каждой аллели.

Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей между разными группами использовали критерий χ^2 Пирсона, применяя онлайн тест программу http://gen-exp.ru/calculator_or.php. Уровень значимости менее 0,05 свидетельствовал об отклонениях от закона Харди-Вайнберга. Обработка результатов генетических исследований осуществлялась с использованием критерия отношения шансов OR с расчетом для него 95% доверительного интервала.

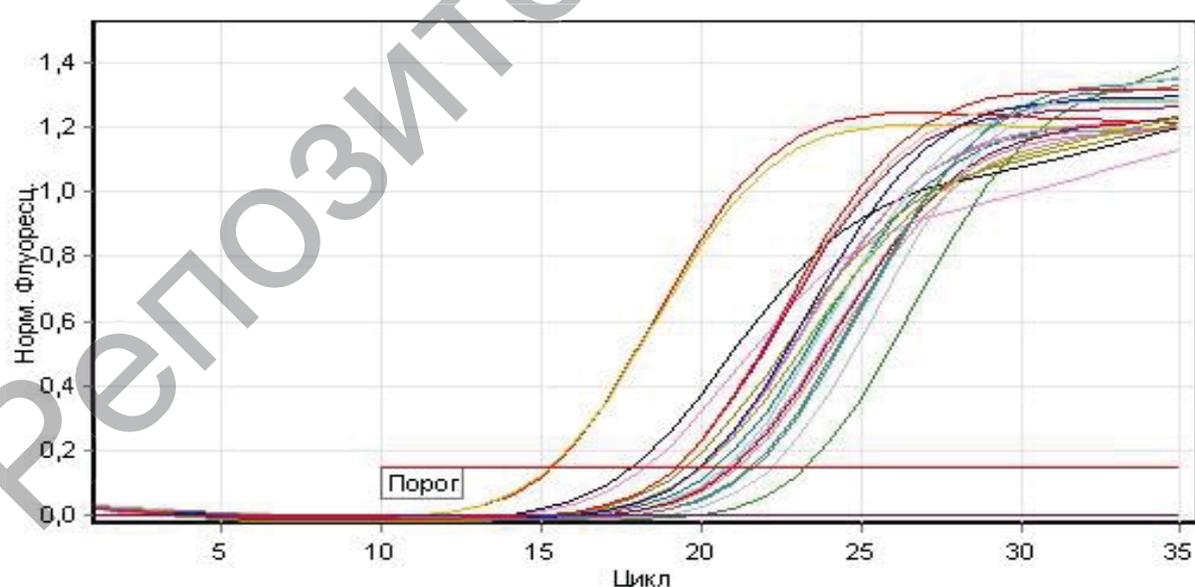


Рисунок 2.1. – Кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум аллелям образцов при определении полиморфизма гена TNFalpha (308GA)

2.6 Общеклинические и биохимические методы исследования

Всем пациентам проводилось комплексное обследование согласно утвержденным клиническим протоколам, включающим общеклинические лабораторные методы исследования: общий анализ крови, общий анализ мочи. Биохимические показатели крови (АлАТ, АсАТ), определяли набором ООО «Анализ Мед» (Республика Беларусь) на биохимическом анализаторе ARCHITECT c8000, компании Ebbott (США) с использованием модифицированного, оптимизированного кинетического метода.

2.7 Методы статистического анализа полученных результатов

Статистический анализ полученных данных проводился с помощью программного обеспечения STATISTICA на персональном компьютере с использованием пакета «Statistica» версии 10 для Windows (StatSoft, Inc., США), лицензионный номер 31415926535897. Количественные данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения ($M \pm m$), категориальные данные – в виде абсолютной и относительной частоты.

В случае нормального распределения данных результаты представлялись в виде среднего и стандартного отклонений. Поскольку большинство количественных признаков не подчинялось закону нормального распределения, при сравнении использовались непараметрические методы. При анализе категориальных данных применен точный двусторонний тест Фишера как альтернатива критерию χ^2 -Пирсона сравнения распределений в независимых выборках, а также с помощью языка «R» версии 3.4.3 [137] (в качестве интегрированной среды разработки использовалась среда «RStudio» версии 1.1.383 [153]. Построение моделей выживаемости и кривых Каплана – Майера проводилось с помощью пакета «survival» [154, 182] расширения языка «R». Построение обобщённых линейных моделей при использовании «R» выполнялось с помощью базового пакета «stats» [153]. Расчет доверительных интервалов для долей

(процентов) осуществлялся методом Гудмана [133]. Достоверность различий в группах была принята при уровне статистической значимости, $p < 0,05$.

Таким образом, правомерны следующие выводы:

1. В исследование была включена группа ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих на территории Гродненской области.

2. Набор методических «инструментов» представлен современными молекулярно-генетическими, иммунологическими методами, позволяющими решить поставленные задачи в связи с соответствием их мировому стандарту при наличии сертификации и регистрации в РБ применяемых диагностических материалов (реагентов, тест-систем) и оборудования.

3. Используемые статистические методы обработки полученных данных позволяют судить о достоверности исследований и делать обоснованные заключения.

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРОПИЗМА И СУБТИПОВ ВИЧ ПО НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПЕТЛИ V3 БЕЛКА GP120 ГЕНА ENV ВИЧ-1

3.1 Распределение пациентов по тропизму ВИЧ в изучаемой группе с учетом показателя FPR

Распределение образцов плазмы крови 98 ВИЧ-инфицированных пациентов по уровню FPR представлено в таблице 3.1.

Таблица 3.1. – Распределение пациентов по показателю FPR при определении тропизма ВИЧ

<i>FPR</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
0,0-2,0 (не-R5-тропный)	3	3,06
2,0-10,0 (не-R5-тропный)	14	14,29
10,0-20,0 (не-R5-тропный)	18	18,37
20,0-40,0 (R5-тропный)	25	25,51
40,0-60,0 (R5-тропный)	18	18,37
60,0-100,0 (R5-тропный)	20	20,4
Всего	98	100

Как видно из таблицы 3.1, у 35,7% пациентов установлен не R5-тропный вирус, представленный популяциями X4-тропного варианта и X4/R5 вируса с двойным тропизмом. В то время как у 64,3% подтверждена инфекция R5-тропным вирусом. При этом группа пациентов, инфицированных не R5-тропным вариантом ВИЧ, неоднородна по своей структуре: пациенты, имеющие низкие показатели FPR (до 5%), могут быть отнесены к группе инфицированных «чистым» X4-тр. вариантом вируса, который использует для входа в клетки только ко-рецептор CXCR4. Количество таких пациентов было невелико – 5 (5,1%). Пациенты, имеющие показатель FPR более 5%, но менее 20%, инфицированы вирусом с двойным тропизмом, использующим как CXCR4, так и CCR5 ко-рецепторы, составили 30 (30,6%). Учитывая, что по состоянию на 1 января 2018 г. в Республике Беларусь зарегистрировано 24 686 случаев ВИЧ-инфекции, количество

людей, живущих с ВИЧ, на 1 января 2018 г. составило 19 231, в Гродненской области зарегистрировано 1095 пациентов, количество людей, живущих с ВИЧ, было 843. Расчетное количество пациентов, инфицированных R5-тропным ВИЧ, в этот период в Гродненской области составило 542 [95%ДИ: 459-616], что позволяет рассматривать данных пациентов как потенциальных кандидатов для терапии антагонистами CCR5. Расчетное количество пациентов, инфицированных не R5-тропным ВИЧ, в Гродненской области составило 301 [95%ДИ: 227-384].

Представляло интерес установить характер тропизма ВИЧ-1 у пациентов с учетом клинических стадий ВИЧ-инфекции.

Распределение пациентов по разным стадиям ВИЧ-инфекции (в зависимости от тропизма вируса) представлено в таблице 3.2.

Таблица 3.2. – Распределение пациентов по стадиям ВИЧ-инфекции

<i>Показатель</i>	<i>1-я группа R5Tp, n=63</i>	<i>2-я группа Не R5Tp, n=35</i>	<i>P*</i>
1-я клиническая стадия	31 (49,2%)	18 (56,7%)	>0,05
2-я клиническая стадия	8 (12,7%)	4 (13,3%)	>0,05
3-я клиническая стадия	19 (30,2%)	8 (20,0%)	>0,05
4-я клиническая стадия	5(7,9%)	5 (10,0%)	>0,05
СПИД	19 (30,2%)	13 (33,3%)	>0,05

Примечание – *– Тест χ^2

Как видно из таблицы 3.2, отсутствовали статистически значимые различия в частоте распределения пациентов по клиническим стадиям ВИЧ-инфекции, частоте СПИДа, что подчеркивает отсутствие корреляции между тропизмом ВИЧ и клиническими проявлениями ВИЧ-инфекции. Известно, что R5-тропный вирус является доминирующим на стадии первичной инфекции, однако у 50% пациентов в динамике развития ВИЧ-инфекции происходит смена тропизма ВИЧ с R5 на X4 [1, 2, 6, 9]. Как видно из таблицы 3.2, 30,2% с R5-тропным ВИЧ были на стадии СПИДа, несмотря на отсутствие переключения тропизма вируса, в то время как среди пациентов на 1 и 2 клинической стадии ВИЧ-инфекции находилось 70% пациентов 2-й группы. Таким образом, клинические данные пациентов не позволяют предполагать характер тропизма ВИЧ-1.

В таблице 3.3 представлены показатели FPR на разных стадиях ВИЧ-инфекции с учетом характера тропизма ВИЧ.

Таблица 3.3. – Показатели FPR у пациентов на разных стадиях ВИЧ-инфекции

	<i>1-я группа R5Tp, n=63</i>		<i>2-я группа Не R5Tp, n=35</i>	
	<i>FPR, Me</i>	<i>Min-max</i>	<i>FPR, Me</i>	<i>Min-max</i>
1-я клиническая стадия	45,6	21,2-95,2	9,25*	1,3-18,3
2-я клиническая стадия	49,6	21,2-85,9	14,3*	13,8-19,1
3-я клиническая стадия	41,6	21,2-98,9	8,4*	3,15-15,8
4-я клиническая стадия	45,95	31,9-78,7	16,5*	5,3-19,4
СПИД	45,9	21,2-98,8	14,05*	1,2-19,4

Примечание – * – $p < 0,05$ при сравнении групп, Тест Манна-Уитни

Как видно из таблицы 3.3, установлено достоверное различие в уровне показателя FPR в группах на одинаковых стадиях ВИЧ-инфекции, что обосновывает включение данных пациентов в группы разного тропизма вируса, несмотря на одинаковые клинические стадии заболевания.

Знание субтипа ВИЧ позволяет наиболее точно интерпретировать результаты генотипического метода при установлении тропизма ВИЧ. Как указано в рекомендациях по определению тропизма ВИЧ, важным является знание субтипа ВИЧ для наиболее правильной интерпретации характера тропизма ВИЧ, так как частота переключения тропизма различается при разных субтипах вируса. В связи с этим возможность определения субтипа ВИЧ по нуклеотидной последовательности региона V3gp120 является доступным способом определения субтипа. Основным недостатком определения субтипа ВИЧ по env – низкая чувствительность метода для выявления рекомбинантных форм ВИЧ. Однако данное исследование не ставило перед собой таких задач. Определение субтипа вируса проводилось для более точного установления тропизма ВИЧ. Преимуществом данного метода можно считать возможность одновременного определения тропизма и субтипа вируса по одному региону ВИЧ.

Субтип ВИЧ по региону V3gp120 был определен у 94 пациентов в группе. У 91 (96,8%) пациента установлен

субтип А, у 3 – субтип В (3,2%).

Примеры определения тропизма и субтипа ВИЧ у 2 пациентов из группы наблюдения представлены в таблице 3.4

Таблица 3.4. – Тропизм и субтипы ВИЧ по результатам секвенирования региона петли V3 гена env ВИЧ

<i>Матрица</i>	<i>FPR</i>	<i>Тропизм</i>	<i>Нуклеотидная последовательность петли V3 гена env ВИЧ-1</i>	<i>Субтип ВИЧ</i>
ДНК	1,5	CXCR4	TGTRTCAGRCCTKACARMAAAAAMTATA ASAACAAGTATACGTATAGGACCAGGA MAAMCCTTCTATGCAACAGGTGATGTA ATAGGGGACCCAAGGAAAGCAYATTGT	А
ДНК	30,1	CCR5	TGTGCAAGACCCAACAACAATACAAGA AAAAGTATACATATAGGACCGGGGAGA GCAATGTATGCMACAGGAGACATAATA GGAGATATAAGACAAGCACATTGT	В
РНК	38	CCR5	TGTATCAGACCTGGCAACAATACAAGA ACAAGTATACGYATAGGACCAGGACAA ACCTTCTATGCAACAGGTGATGTAATAG GGGACATAAGAAAAGCATATTGT	А
РНК	7,8	CXCR4	TGTATCAGACCTGGCAACAATATAAGA ACAAGTRTACACATGGGACCAGGACAA GCCTTCTATGCAACAGGTGSTATAATAG GAGACATAAGAAAAGCATATTGT	А

Как видно из таблицы 3.4, матрицей для определения тропизма в 2 случаях была ДНК лимфоцитов крови, так как пациенты имели недетектируемый уровень вирусной нагрузки ВИЧ в плазме (<500 коп/мл). По уровню FPR в первом случае у пациента, инфицированного субтипом А ВИЧ, установлен не R5-тропный вирус, во втором случае у пациента с субтипом В ВИЧ – R5-тропный вирус. В двух представленных случаях матрицей была РНК ВИЧ, так как у пациентов имелись детектируемые уровни вирусной нагрузки ВИЧ. Таким образом, у подавляющего большинства пациентов с определенным тропизмом вируса установлен субтип А, что обосновывает использование показателя FPR, равного 20%, при определении тропизма с использованием алгоритма geno2pheno у пациентов, проживающих в Гродненском регионе Беларуси.

3.2 Результаты филогенетического анализа последовательности V3 петли гена env ВИЧ-1 в зависимости от тропизма вируса

Представляло интерес провести филогенетический анализ установленных в ходе секвенирования последовательностей региона петли V3 петли гена env ВИЧ-1 в зависимости от тропизма вируса.

Результаты филогенетического анализа представлены на рисунке 3.1. В анализ была включена 51 последовательность, полученная в ходе данного исследования (R5-тропные варианты отмечены на древе закрашенными треугольниками, не R5-тропные – пустыми треугольниками) и 22 последовательности, полученные ранее на территории РФ, Беларуси, Украины и хранящиеся в базе данных Национальной лаборатории Лос-Аламос, США (отмечены на древе кругом).

Большинство последовательностей, полученных в ходе данного исследования, образовали единый кластер. В этот кластер вошли также 7 последовательностей субтипа А из базы данных Национальной лаборатории Лос-Аламос. Отдельно от остальных находится последовательность 403, она кластеризуется совместно с последовательностями субтипа В из базы данных Лос-Аламос.

При проведении субтипирования полученных последовательностей с использованием REGANIV-1 SubtypingTool – Ver. 3.0. последовательность 403 была отнесена к субтипу В, тогда как все остальные последовательности – к субтипу А.

Как отмечено на представленном рисунке 3.1, зависимости между характером кластеризации исследуемых образцов и их тропизмом не установлено.

Данное заключение является закономерным, так как не R5-тропные изоляты формируются при переключении тропизма R5-тропных вирусов в динамике прогрессирования ВИЧ-инфекции.

Приводим клиническое наблюдение пациента Ш., 28 лет, (образец № 403), у которого был установлен на основании нуклеотидных последовательностей петли V3 гена env субтип В ВИЧ. Пациент был инфицирован ВИЧ на территории России, где работал последние несколько лет. Состоит на учете в консультативно-диспансерном кабинете Гродненской инфекционной больницы с сентября 2013 г., путь инфицирования – половой. Диагноз (апрель, 2016): ВИЧ инфекция, 1 клиническая стадия (CD4 – 252 кл/мкл). ПГЛ. Множественный кариес. Гепатоз. При объективном осмотре жалоб не предъявляет, избыточного питания, увеличены заднешейные и углочелюстные лимфоузлы. Печень +2 см. При проведении лабораторных исследований отмечено повышение уровня ферментов печени: АсАт – 53 Ед/л, АлАт – 76 Ед/л, выявлены IgG к ЦМВ. За все время наблюдения уровень вирусной нагрузки оставался ниже 500 кп/мл, уровень CD4-клеток на момент проведения исследования на тропизм и субтип ВИЧ составлял 805 кл/мкл. Пациент инфицирован R5-тропным вирусом: FPR – 30,1%. В апреле 2016 г. рекомендовано начать АРВ-терапию.

Таким образом, были сделаны следующие выводы:

1. В исследуемой группе ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих на территории Гродненской области РБ, частота встречаемости пациентов, инфицированных R5-тропным ВИЧ, составила 64,3% [95% ДИ: 54,4-73,1], инфицированных не R5-тропным ВИЧ – 35,7% [95% ДИ: 26,9-45,6].

2. У 91 (96,8%) пациента установлен субтип А ВИЧ-1, у 3 – субтип В (3,2%), установленный по региону гена env. Зависимости между характером кластеризации исследуемых образцов на филогенетическом дереве и их тропизмом не обнаружено.

3. Выявлена высокая схожесть нуклеотидных последовательностей V3 петли гена env ВИЧ-1 с последовательностями ВИЧ-1, полученными ранее на территории РФ, Беларуси и Украины и депонированными в базу данных Национальной лаборатории Лос-Аламоса.

ГЛАВА 4

ИММУННЫЙ СТАТУС ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТРОПИЗМА ВИРУСА

4.1 Характеристика пациентов, у которых выполнены иммунологические исследования

Характеристика пациентов в группах наблюдения представлена в таблице 4.1.

Как видно из таблицы 4.1, не отмечено различий в группах по возрасту, полу, путям инфицирования, стадиям ВИЧ-инфекции.

Таблица 4.1. – Характеристика пациентов в группах наблюдения

Показатель	1-я группа R5tr ВИЧ, n=34	2-я группа не R5tr ВИЧ, n=19	P
Возраст, годы	34,1±5,9	33,4±6,3	>0,05*
Стаж ВИЧ-инфекции	4,9	6,6	>0,05*
Мужчины, абс.(%)	14 (41,2%)	10 (52,6%)	>0,05 [♦]
Женщины, абс.(%)	20 (58,8%)	9 (47,4%)	>0,05 [♦]
ПИН n (%)	12 (35,2%)	5 (26,3%)	>0,05 [♦]
1-я клиническая стадия, n (%)	18 (52,9%)	8 (42,1%)	>0,05 [♦]
2-я клиническая стадия, n (%)	4 (11,8%)	2 (10,6%)	>0,05 [♦]
3-я клиническая стадия, n (%)	10 (29,5%)	6 (31,6%)	>0,05 [♦]
4-я клиническая стадия, n (%)	2 (5,8%)	3 (15,7%)	>0,05 [♦]
СПИД, n (%)	10 (29,4%)	7 (36,8%)	>0,05 [♦]
АРТ, n (%)	17 (50%)	7 (36,8%)	>0,05 [♦]

Примечания –

- 1) * – Тест Манна-Уитни;
- 2) [♦] – Test χ^2 ;
- 3) ПИН – потребители инъекционных наркотиков;
- 4) АРТ – антиретровирусная терапия

Как видно из представленной таблицы 4.1, пациенты в группах не различались по полу, возрасту, путям инфицирования ВИЧ, стадиям ВИЧ-инфекции.

4.2 Показатели содержания В-, Т-лимфоцитов (ТЛ) и их субпопуляций (CD3+CD4+ТЛ, CD3+CD8+ТЛ) у пациентов с разным тропизмом вируса

Показатели содержания В-, Т-лимфоцитов (ТЛ) и их субпопуляций (CD3+CD4+ТЛ, CD3+CD8+ТЛ) в группах наблюдения и контроле представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2. – Показатели содержания В-, Т-лимфоцитов и их субпопуляций в группах наблюдения

Показатели медиана (ИКР)	Контроль n=16	1-я группа R5tr ВИЧ, n=34	2-я группа не R5tr ВИЧ, n=19
CD19+ В-клетки (%)	8,20 (5,9-11,6)	5,2 (3,7-6,7)*	4,3 (3,3-5,4)*
CD19+ В-клетки (кл/мкл)	182,18 (109,4-314,7)	89 (48,6-124)*	73,8 (49,9-91,1)*
CD3+ Т-клетки (%)	70,92 (65,6-75,8)	78,4 (68,3-82,3)	78,6 (66,8-89,2)
CD3+ Т-клетки (кл/мкл)	1679,51 (1232,5-2197,1)	1261 (1021-1562)*	1187 (859-1954)
CD3+CD4+ Т-хелперы (%)	41,54 (37,4-46,7)	22,5 (14,6-28,5)*	21,2 (15,9-29)*
CD3+CD4+ Т-хелперы (кл/мкл)	934,38 (653,1-1366,7)	394 (248,7-533)*	335 (132-425)*
CD3+CD8+ Т-цитотоксические лимфоциты (%)	24,12 (20,4-28,6)	50,2 (31,6-63)*	51,8 (40,3-63)*
CD3+CD8+ Т-цитотоксические лимфоциты (кл/мкл)	551,01 (460,1-685,7)	728,5 (495,5-1007)*	815 (374-1253)
Соотношение CD4/CD8	1,69 (1,3-2,1)	0,45 (0,24-0,72)*	0,36 (0,25-0,51)*

Примечания –

- 1) * – $p < 0,05$ (M-U test) при сравнении с контролем;
- 2) ИКР – интерквартильный размах

Как видно из таблицы 4.2, при сравнении содержания В-, Т-лимфоцитов (ТЛ) и их субпопуляций установлено, что как в 1-й, так и во 2-й группе при сравнении с контролем имело место снижение содержания CD19+лимфоцитов ($p < 0,05$), CD3+CD4+ТЛ ($p < 0,05$), ИРИ ($p < 0,05$), увеличение CD3+CD8+ТЛ ($p < 0,05$). Показатели В-, Т-лимфоцитов и их субпопуляций при сравнении в группах пациентов не различались достоверно ($p > 0,05$).

Для оценки активации Т-клеточного иммунитета в зависимости от тропизма вируса была изучена экспрессия молекул HLA-DR и CD25 на Т-лимфоцитах крови и их субпопуляциях (табл. 4.3).

Таблица 4.3. – Показатели экспрессии HLA-DR и CD25 в группах пациентов

Показатели медиана (ИКР)	Контроль, n=16	1-я группа R5tr ВИЧ, n=34	2-я группа не R5tr ВИЧ, n=19
HLA-DR+ клетки (%)	21,20 (18,2-27,5)	46,7 (40,3-56,8)*	37,9 (33,2-47,1)*
HLA-DR+ клетки (кл/мкл)	574,96 (315,9-672,7)	849,3 (536,6-1165,5)*	541,1 (345,1-892,8)
CD3+HLA-DR+ активированные Т-клетки (%)	8,60 (6,09-13,5)	37,2 (27,8-47,7)*	31,3 (27-36)*
CD3+HLA-DR+ активированные Т-клетки (кл/мкл)	176,81 (126,5-267,7)	653,9 (427,2-905,4)*	427,6 (224,8-805,5)*
CD4+ HLA-DR+ активированные Т-хелперы (%)	4,95 (3,9-6,05)	4,34 (3,4-5,6)	4,04 (3,2-4,9)
CD4+HLA-DR+ активированные Т-хелперы (кл/мкл)	101,46 (81,6-145,6)	65,68 (50,7-115,6)*	54,44 (47,8-72,1)*
Экспрессия HLA-DR Т-хелперами (%)	12,8 (8,2-15,7)	26,29 (17,1-30,08)*	18,47 (13,06-31,14)*
Интенсивность экспрессии HLA-DR Т-хелперами (усл. ед.)	80,3 (66,6-95)	82,3 (59,8-95)	80,3 (70,8-98,1)
CD8+ HLA-DR+ активированные Т-цитотокс. лимфоциты (%)	5,43 (4,4-11,4)	37,1 (25,7-45,9)*	30,2 (24,7-36,2)*
CD8+HLA-DR+ активированные Т-цитотокс. лимфоциты (кл/мкл)	114,74 (94,5-225,1)	606,3 (385,2-926,7)*	417,3 (245,7-729,1)*
Экспрессия HLA-DR Т-цитотоксическими клетками (%)	30,7 (17,0-38,3)	64,38 (43,5-71,9)*	54,3 (39,2-62,8)*
Интенсивность экспрессии HLA-DR цитотоксическими клетками (усл. ед.)	58,2 (47,7-83,4)	65,3 (48,2-96,5)	52 (45,5-57,9)
Т-регуляторные клетки (%)	3,5 (3,1-4,8)	1,5 (1,2-2,1)*	1,3 (1,0-1,9)*
Т-регуляторные клетки (кл/мкл)	87,8 (58,7-114,7)	31,0 (16,5-44,0)*	22,1 (8,6-34,2)*
Интенсивность экспрессии CD25+ Т-регуляторными клетками, усл. ед.	8,9 (7,8-10,5)	9,2 (8,1-11)	8,5 (7,4-9,4)

Примечания –

- 1) * – $p < 0,05$ (Тест Манна-Уитни) при сравнении с контролем;
- 2) ИКР – интерквартильный размах

Как видно из представленной таблицы 4.3, у пациентов в группах отсутствовали различия в экспрессии HLA-DR на ТЛ и их субпопуляциях (Т-хелперах и цитотоксических ТЛ). Характерно, что у пациентов 1-й группы имела место значительно более выраженная экспрессия HLA-DR на лимфоцитах крови при сравнении с контролем, в то время как во 2-й группе этот показатель был ниже и не различался с аналогичным показателем в группе контроля. Снижение абсолютного содержания CD4+HLA-DR+ среди лимфоцитов связано в первую очередь со снижением Т-хелперов в обеих группах ВИЧ-инфицированных при сравнении с контролем. В то же время относительное содержание CD4+ТЛ, экспрессирующих HLA-DR, от общего количества CD4+ТЛ в обеих группах ВИЧ-инфицированных пациентов было достоверно выше, чем в контроле, что указывает на более выраженную активацию Т-хелперов при ВИЧ-инфекции при сравнении с контролем.

Учитывая, что АРТ приводит к снижению выраженности экспрессии маркеров активации [48], экспрессия HLA-DR на Т-лимфоцитах и их субпопуляциях была изучена у пациентов, не получающих АРТ. Среди таких пациентов было 17 человек, инфицированных R5tr вариантом ВИЧ, и 12 – инфицированных не R5tr вариантом (табл. 4.4).

Как видно из представленной таблицы 4.4, при сравнении иммунологических показателей пациентов в группах установлены достоверные различия в абсолютном содержании активированных Т-лимфоцитов в группах пациентов. При инфицировании R5tr вариантами ВИЧ имели место более выраженная экспрессия маркера активации HLA-DR на лимфоцитах крови, а также большее содержание активированных ТЛ (CD3+HLA-DR) и активированных цитотоксических лимфоцитов (CD8+HLA-DR) – эффекторных клеток иммунной системы. Установлен ряд прямых коррелятивных связей (Spearman) показателя FRP с абсолютным содержанием (кл/мкл) активированных ТЛ и их субпопуляций: HLA-DRA – $R=0,5$, $p<0,006$; CD3+HLA-DRA+ТЛ – $R=0,45$, $p<0,01$; CD4+HLA-DRA+ТЛ – $R=0,52$, $p<0,004$; CD8+HLA-DRA+ТЛ, – $R=0,51$, $p=0,005$.

Таблица 4.4. – Показатели экспрессии HLA-DR у пациентов, не получающих АРТ, в зависимости от тропизма ВИЧ

Показатель медиана (min-max)	1-я группа R5-тропный, n=17	2-я группа Не R5-тропный, n=12	p*
HLA-DR+ клетки (%)	53,29 (18,5-70,6)*	37,90 (16,9-68,4)	0,03
HLA-DR+ клетки (кл/мкл)	1038,14 (324,7-1669,7)*	541,18 (215,3-1470,1)	0,02
CD3+HLA-DR+ активированные Т-клетки (%)	45,23 (11,7-60,5)	31,31 (7,9-63,8)	0,2
CD3+HLA-DR+Т-клетки (кл/мкл)	713,49 (206,1-1626,5)*	427,67 (143,0-1023,8)	0,05
CD4+HLA-DR+ активированные Т-хелперы (%)	4,36 (1,2-6,7)	4,04 (1,6-8,5)	0,5
CD4+HLA-DR+активированные Т-хелперы (кл/мкл)	70,03 (18,4-163,6)	54,44 (24,1-153,5)	0,06
Экспрессия HLA-DR Т-хелперами (%)	26,3 (8,0-133,7)	18,5 (13,1-31,1)	0,03
Интенсивность экспрессии HLA-DR Т-хелперами (усл. ед.)	87,3 (69,8-95,0)	80,3 (70,8-98,1)	0,6
CD8+HLA-DR+активированные Т-цитотокс. лимфоциты (%)	40,79 (11,0-193,8)	30,25 (8,5-60,3)	0,1
CD8+HLA-DR+активированные Т-цитотокс. лимфоциты (кл/мкл)	764,52 (61,6-1655,3)*	417,30 (152,3-952,4)	0,03
Интенсивность экспрессии HLA-DR цитотоксическими клетками (усл. ед.)	73,6 (48,9-96,5)	52,0 (45,5-78,6)	0,2

Примечание – * – Тест Манна-Уитни

Экспрессия ХР на Т-лимфоцитах пациентов в группах представлена в таблице 4.5.

Как видно из таблицы 4.5, не установлено достоверных различий в экспрессии ХР на иммунокомпетентных клетках крови у пациентов двух групп. В то же время у пациентов 1-й группы имела место более выраженная экспрессия CXCR4+ на Т-хелперах (%), а также доля CD4+ТЛ, экспрессирующих CXCR4+ при сравнении с контролем. Содержание Т-хелперов, экспрессирующих CCR5, а также оба корецептора (CXCR4 и CCR5) были снижены в обеих группах при сравнении с контролем.

Установлено также, что у пациентов, не получающих АРТ, интенсивность экспрессии CCR5 на Т-хелперах была достоверно выше у пациентов 1-й группы по сравнению с пациентами 2-й группы: 10,5 (7,7-12,2) и 8,2 (4,7-13,4), соответственно (p<0,0001).

Таблица 4.5. – Показатели экспрессии CXCR4 и CCR5 лимфоцитами периферической крови в группах пациентов

Показатели медиана (ИКР)	Контроль n=16	1-я группа R5tr ВИЧ, n=34	2-я группа не R5tr ВИЧ, n=19
CXCR4+ клетки (%)	15,51 (11,9-18,6)	17,7 (11,1-25,9)	14,5 (7,8-25)
CXCR4+ клетки (кл/мкл)	345,6 (233,9-478,7)	318,1 (224,8-449,0)	232 (85,9-338,4)
CD4+CXCR4+ Т-хелперы (%)	4,15 (3,07-6,07)	7,4 (3,7-12,3)*	4,28 (1,8-14,05)
CD4+CXCR4+ Т-хелперы (кл/мкл)	82,42 (58,1-187,5)	127,6 (54,9-191,7)	63,9 (19,3-193,4)
Экспрессия CXCR4 Т-хелперами (%)	11,2 (7,7-14,1)	26,5 (14,2-46,6)*	17,1 (1-41,5)
Интенсивность экспрессии CXCR4 Т-хелперами (усл. ед.)	20,67 (17,7-25,6)	28,6 (16,9-36,01)	31,9 (20,9-40,5)*
CCR5+ клетки (%)	6,11 (5,08-8,1)	3,06 (1,8-3,5)*	2,7 (1,6-4,1)*
CCR5+ клетки (кл/мкл)	434,47 (376,5-604,8)	469,5 (312-663,9)	490 (317-584)
CD4+CCR5+ Т-хелперы (%)	16,6 (10,5-20,2)	13,8 (10,1-20,9)	16,2 (18,6-67,4)
CD4+CCR5+ Т-хелперы кл/мкл	119,25 (98,6-184,4)	53,8 (31,5-71,1)*	44,4 (41,6-97)*
Экспрессия CCR5 Т-хелперами (%)	0,24 (0,15-0,45)	0,17 (0,07-0,33)	0,16 (0,01-0,3)
Интенсивность экспрессии CCR5 Т-хелперами (усл. ед.)	6,66 (2,3-8,2)	2,9 (1,15-6,04)*	1,59 (0,1-4,6)*
CD4+CXCR4+CCR5+ Т-хелперы (%)	10,2 (8,8-12,2)	10,5 (8,3-12,2)	9,0 (6,8-12,9)
CD4+CXCR4+CCR5+ Т-хелперы (кл/мкл)	12,2 (9,8-14,4)	12,3 (10,3-14,2)	11,0 (8,2-15)

Примечания –

- 1) * – $p < 0,05$ (Тест Манна-Уитни) при сравнении с контролем;
- 2) ИКР – интерквартильный размах

У пациентов 1-й группы экспрессия CXCR4 имела прямую коррелятивную связь с CD19+лимфоцитами крови (ЛК) – $R=0,42$, $p < 0,02$; с CD4+ТЛ – $R=0,63$, $p < 0,0001$; CD4+CD25+ТЛ – $R=0,62$, $p < 0,0001$; обратная корреляция CXCR4 установлена с вирусной нагрузкой ВИЧ – $R=-0,51$, $p < 0,003$; активированными CD3+HLA-DR+ТЛ – $R=-0,61$, $p < 0,003$; с активированными CD8+HLA-DR+ТЛ – $R=-0,62$, $p < 0,002$.

Экспрессия CCR5 имела прямую связь с содержанием

CD8+ТЛ – R=0,78, p<0,0001, с активированными CD3+HLA-DR+ТЛ R=0,81, p<0,0001; с активированными CD8+HLA-DR+ТЛ – R=0,79, p<0,0001.

У пациентов 2-й группы экспрессия CXCR4 имела прямую коррелятивную связь с активированными CD3+ HLA-DR+ТЛ – R=0,64, p<0,03; CD4+ТЛ – R=0,46, p<0,05; CD3+ТЛ – R=0,50, p<0,03; обратная корреляция CXCR4 была установлена с (CD8+) HLA-DR+ RFI R=-0,74, p<0,01; с (CD4+) HLA-DR+ RFI R=-0,71, p<0,01.

Во 2-й группе экспрессия CCR5 имела прямую связь с содержанием CD8+ТЛ – R=0,89, p<0,001; с активированными CD3+HLA-DR+ТЛ R=0,93, p<0,0001; с активированными CD8+HLA-DR+ТЛ – R=0,88, p<0,001; с экспрессией HLA-DR на ЛК R=0,88, p<0,0001; обратная корреляция CCR5 была установлена с CD4+CD25+ТЛ – R=-0,57, p<0,01.

С целью выявления особенностей формирования иммуносупрессии при разном тропизме ВИЧ были оценены иммунологические показатели у пациентов в зависимости от наличия или отсутствия СПИДа.

С целью установления особенностей клеточного иммунитета и экспрессии ХР на иммунокомпетентных клетках оценивались иммунологические показатели у пациентов в зависимости от наличия выраженной иммуносупрессии (СПИД).

4.3. Иммунологические показатели у пациентов в зависимости от наличия выраженной иммуносупрессии (СПИД)

Показатели клеточного иммунитета у пациентов, инфицированных R5 тропным вирусом, в зависимости от наличия или отсутствия СПИДа представлены в таблице 4.6.

Как представлено в таблице 4.6, у пациентов, инфицированных R5-тропным ВИЧ, при СПИДе установлено снижение абсолютного содержания Т-лимфоцитов, p=0,02, и CD4 Т-лимфоцитов, p=0,004, что является закономерным в динамике прогрессирования ВИЧ-инфекции.

Таблица 4.6. – Показатели содержания В-, Т-лимфоцитов и их субпопуляций у пациентов, инфицированных R5, при разных стадиях ВИЧ-инфекции

Показатели медиана (пределы)	1 группа, R5тр ВИЧ СПИД, n=10	1 группа, R5тр ВИЧ не СПИД, n=24
CD19+ В-клетки (%)	3,7 (2,3-5,8)	5,59 (4,15-6,88)
CD19+ В-клетки (кл/мкл)	53,7 (34,6-86)	99,11 (62,9-125,6)
CD3+ Т-клетки (%)	78,4 (68,6-82,37)	78,5 (64,2-83,9)
CD3+ Т-клетки (кл/мкл)	982 (935-1231)*	1352 (1109-1646)
CD3+CD4+ Т-хелперы (%)	20,5 (11,5-26,8)	23,7 (14,8-30,4)
CD3+CD4+ Т-хелперы (кл/мкл)	333,1 (126,4-381)*	478 (267-608,3)
CD3+CD8+ Т-цитотоксические лимфоциты (%)	60,76 (31,9-69,2)	49,6 (29-59,5)
CD3+CD8+ Т-цитотоксические лимфоциты (кл/мкл)	582,1 (396,5-770)	859,7 (56-1245,6)
Соотношение CD4/CD8	0,22 (0,14-0,67)	0,45 (0,37-0,8)

Примечания – * – $p < 0,05$, тест Манна-Уитни

Показатели экспрессии HLA-DR и CD25 на Т-лимфоцитах у пациентов с R5-тропным ВИЧ в зависимости от наличия СПИДа представлены в таблице 4.7.

Как видно из таблицы 4.7, сравнение показателей экспрессии HLA-DR и CD25 у пациентов с R5тр ВИЧ выявило достоверное снижение при наличии СПИД экспрессии HLA-DR на Т-хелперах.

Показатели экспрессии XP (CCR5 CXCR4) у пациентов с R5-тропным ВИЧ в зависимости от наличия СПИДа представлены в таблице 4.8.

Как видно из таблицы 4.8, у пациентов на стадии СПИДа имело место снижение абсолютного содержания CD4+CCR5+ТЛ по сравнению с пациентами без СПИДа несмотря на то, что интенсивность экспрессии CCR5+ на ЛМ не различалась достоверно у данных пациентов.

Таблица 4.7. – Показатели экспрессии HLA-DR И CD4+/CD25+ у пациентов с R5-тропным ВИЧ в зависимости от наличия СПИДа

<i>Показатели медиана (ИКР)</i>	<i>1-я группа, R5тр ВИЧ СПИД «+», n=10</i>	<i>1-я группа, R5тр ВИЧ СПИД «-», n=24</i>
HLA-DR+ клетки (%)	56,29 (40,35-56,82)	45,92 (42,58-54,5)
HLA-DR+ клетки (кл/мкл)	677,4 (536,6-796,9)	881 (732,5-1277,2)
CD3+HLA-DR+ активированные Т-клетки (%)	45,2 (33,8-47,7)	35,7 (27,8-47,6)
CD3+HLA-DR+ активированные Т-клетки (кл/мкл)	574,6 (427,2-668,3)	713,49 (502,3-977,69)
CD4+ HLA-DR+ активированные Т хелперы (%)	2,57 (2,36-4,25)	4,39 (4,8-4,41)
CD4+HLA-DR+ активированные Т-хелперы (кл/мкл)	40,14 (34,9-50,7)*	87,15 (63,09-119,7)
Экспрессия HLA-DR Т-хелперами (%)	31,74 (15,09-48,6)	25,37 (16,84-29,34)
Интенсивность экспрессии HLA-DR Т-хелперами (усл. ед.)	141,2 (59,4-149,3)	78,3 (68,4-88,0)
CD8+ HLA-DR+ активированные Т-цитотокс. лимфоциты (%)	40,79 (30,78-43,7)	36,4 (25,7-45,97)
CD8+HLA-DR+ активированные Т-цитотокс. лимфоциты (кл/мкл)	526 (385,2-607,9)	660,9 (477,1-956,7)
Экспрессия HLA-DR Т-цитотокс. лимфоцитами (%)	64,38 (43,57-64,46)	63,65 (50,62-71,9)
Интенсивность экспрессии HLA-DR Т-цитотокс. лимфоцитами (усл. ед.)	57,0 (46,7-81,1)	72,1 (48,9-96,5)
Т-регуляторные клетки (%)	1,3 (0,89-2,4)	1,5 (1,24-2,03)
Т-регуляторные клетки (кл/мкл)	21,38 (10,38-44,2)	31,08 (20,8-41,4)
Интенсивность экспрессии CD25+ Т-регуляторными клетками, усл. ед.	8,5 (8,0-10,9)	9,2 (8,0-11,0)

Примечание –* – $p < 0,05$ при сравнении показателей в группах, тест Манна-Уитни

Таблица 4.8. – Показатели экспрессии CCR5 и CXCR4 на лимфоцитах крови у пациентов с R5-тропным ВИЧ в зависимости от стадии ВИЧ-инфекции

Показатели медиана (ИКР)	1-я группа, R5тр ВИЧ СПИД «+», n=10	1-я группа, R5тр ВИЧ СПИД «-», n=24
CXCR4+ клетки (%)	18,7 (5,4-25,9)	17,7 (11,7-25,6)
CXCR4+ клетки (кл/мкл)	248 (53-427)	318,1 (234,6-462,5)
CD4+CXCR4+ Т-хелперы (%)	8,5 (0,6-12,4)	7,1 (4-12)
CD4+CXCR4+ Т-хелперы (кл/мкл)	126,3 (7,1-191)	127 (77,5-210)
CCR5+ клетки (%)	30,9 (16,9-37,1)	28,6 (16,4-35,7)
CCR5+ клетки (кл/мкл)	495 (279-512)	472,7 (317-674,9)
CD4+CCR5+ Т-хелперы (%)	3 (1,7-3,54)	3,1 (2-3,7)
CD4+CCR5+ Т-хелперы кл/мкл	38,7 (31,3-59,3)	61 (34,2-72,3)
Экспрессия CCR5 Т-хелперами (%)	18,5 (10,5-24,8)	12,5 (7,2-17,1)
CD4+CXCR4+CCR5+ Т-хелперы (%)	0,16 (0,01-0,2)	0,18 (0,07-0,3)
CD4+CXCR4+CCR5+ Т-хелперы (кл/мкл)	2,9 (0,14-3,6)	3 (1,2-8,1)
Экспрессия CXCR4 Т-хелперами (%)	24,2 (3,1-56,9)	26,2 (16,2-38,3)
Интенсивность экспрессии CCR5 Т-хелперами (усл. ед.)	10,5 (8,8-11,8)	10,6 (7,4-12,3)
Интенсивность экспрессии CXCR4 Т-хелперами (усл. ед.)	12,5 (11,8-14,4)	12,2 (9,9-14,0)

Примечание – * – $p < 0,05$ при сравнении показателей в группах, тест Манна-Уитни

Показатели клеточного иммунитета у пациентов, инфицированных не R5-тропным вирусом на разных стадиях ВИЧ-инфекции, представлены в таблице 4.9.

Как видно из таблицы 4.9, показатели клеточного иммунитета у пациентов, инфицированных не R5тр вирусом, в зависимости от наличия СПИДа различались как по относительному, так и по абсолютному содержанию Т-хелперов. Иммунорегуляторный индекс (ИСИ) у пациентов со СПИДом был достоверно ниже.

Таблица 4.9. – Показатели содержания В-, Т-лимфоцитов и их субпопуляций у пациентов, инфицированных не R5, в зависимости от наличия СПИДа

Показатели медиана (ИКР)	2-я группа, не R5тр ВИЧ СПИД «+», n=7	2-я группа, R5тр ВИЧ СПИД «-», n=12
CD19+ В-клетки (%)	4,41 (3,37-6,9)	4,26 (2,99-4,69)
CD19+ В-клетки (кл/мкл)	60,43 (17,76-107)	75,34 (50,2-85,67)
CD3+ Т-клетки (%)	70,15 (65,88-90,2)	83,57 (71,85-89,18)
CD3+ Т-клетки (кл/мкл)	692 (510-1261,6)	1273,3 (987-1975,56)
CD3+CD4+ Т-хелперы (%)	9 (5,0-20,9)*	26,57 (20,66-31,92)
CD3+CD4+ Т-хелперы (кл/мкл)	128 (79-271)*	388 (328,9-560,9)
CD3+CD8+ Т-цитотоксические лимфоциты (%)	48,55 (44,37-66)	54,59 (29,8-62,98)
CD3+CD8+ Т-цитотоксические лимфоциты (кл/мкл)	646,5 (374,8-1144,8)	847 (547-1263)
Соотношение CD4/CD8	0,3 (0,08-0,4)*	0,44 (0,36-1,01)

Примечание – * – $p < 0,05$, тест Манна-Уитни

Установлено, что у пациентов, инфицированных не R5тр ВИЧ без СПИДа, имело место значительно более низкое содержание CD19+ЛК, чем у пациентов без СПИДа, инфицированных R5тр ВИЧ ($p < 0,05$). У пациентов с не R5тр ВИЧ со СПИДом также отмечено более низкое содержание CD4+ТЛ, % ($p = 0,05$) по сравнению с инфицированными R5тр ВИЧ. Это указывает на значительно более выраженную иммуносупрессию у пациентов с переключением тропизма вируса, как до развития СПИДа, так и на его фоне.

Показатели экспрессии HLA-DR и CD25 у пациентов с не R5тр ВИЧ в зависимости от наличия СПИДа представлены в таблице 4.10.

Как видно из таблицы 4.10, у пациентов 2-й группы со СПИДом установлено выраженное усиление интенсивности экспрессии HLA-DR+ на CD4+ТЛ на фоне значительного снижения абсолютного содержания активированных ТЛ и Т-хелперов.

Таблица 4.10. – Показатели экспрессии HLA-DR и CD25 у пациентов с не R5-тропным ВИЧ в зависимости от наличия СПИДа

Показатели медиана (ИКР)	2-я группа, не R5тр ВИЧ СПИД «+», n=7	2-я группа, не R5тр ВИЧ СПИД «-», n=12
HLA-DR+ клетки (%)	47,19 (41,84-59,1)*	34,18 (25,02-39,36)
HLA-DR+ клетки (кл/мкл)	595,8 (224,7-1213,7)	541,1 (388,87-717,35)
CD3+HLA-DR+активированные Т-клетки (%)	36,08 (33,9-50,6)*	29,9 (17,5-31,3)
CD3+HLA-DR+активированные Т-клетки (кл/мкл)	549,4 (190,1-958,3)	427,67 (297,9-580,2)
CD4+ HLA-DR+ активированные Т хелперы (%)	4,18 (2,79-4,9)	3,83 (3,22-5,34)
CD4+HLA-DR+ активированные Т-хелперы (кл/мкл)	37,8 (26,2-51,5)*	62,81 (51,9-84,6)
Экспрессия HLA-DR Т-хелперами (%)	25,3 (12,9-47,1)	17,03 (13,06-25,5)
Интенсивность экспрессии HLA-DR Т-хелперами (усл. ед.)	116,2 (108,4-132,6)*	76,7 (57,2-83,2)
CD8+ HLA-DR+ активированные Т-цитотокс. лимфоциты (%)	35,07 (32,3-49,02)	25,74 (18,4-31,4)
CD8+HLA-DR+ активированные Т-цитотокс. лимфоциты (кл/мкл)	525,4 (189,01-897,6)	417,3 (287,38-560,1)
Экспрессия HLA-DR Т-цитотокс. лимфоцитами (%)	62,79 (57-70,3)*	46,46 (36,7-56,6)
Интенсивность экспрессии HLA-DR Т-цитотокс. лимфоцитами (усл. ед.)	82,4 (60-99,8)	49,3 (45,5-58,7)
Т-регуляторные клетки (%)	1,16 (0,34-1,3)*	1,58 (1,1-2,15)
Т-регуляторные клетки (кл/мкл)	8,57 (4,76-22,1)*	23,8 (13,9-41,7)
Интенсивность экспрессии CD25+ Т-регуляторными клетками, усл. ед.	8,40 (7,3-9,4)	8,5 (7,6-9,3)

Примечания –

- 1) * – $p < 0,05$ при сравнении показателей в группах, тест Манна-Уитни;
- 2) ИКР – интерквартильный размах

Относительное содержание активированных CD8+ТЛ в структуре CD8+ТЛ было также значительно больше, чем у пациентов без СПИДа.

Относительное и абсолютное содержание CD4+CD25+ТЛ Т-регуляторных клеток, у пациентов со СПИДом было значительно ниже, чем у пациентов без СПИДа, несмотря на отсутствие различий в интенсивности экспрессии CD25 на

Т-хелперах в группах пациентов.

Показатели экспрессии ХР (CCR5 CXCR4) у пациентов с не R5тр ВИЧ в зависимости от наличия СПИДа представлены в таблице 4.11.

Таблица 4.11. – Показатели экспрессии CCR5 и CXCR4 на лимфоцитах крови у пациентов с не R5-тропным ВИЧ в зависимости от наличия СПИДа

Показатели медиана (ИКР)	2-я группа, не R5тр ВИЧ СПИД «+», n=7	2-я группа, не R5тр ВИЧ СПИД «-», n=12
CXCR4+ клетки (%)	8,57 (4,7-22,1)*	26,54 (15,7-48,28)
CXCR4+ клетки (кл/мкл)	153 (52,74-280)	276,8 (152,63-391,74)
CD4+CXCR4+ Т-хелперы (%)	3,51 (0,76-8,8)	6,53 (2,67-14,65)
CD4+CXCR4+ Т-хелперы (кл/мкл)	19,30 (10,63-157)	121,44 (44,2-199,75)
CCR5+ клетки (%)	35,91 (28,43-46,7)	26,73 (13,5-37,83)
CCR5+ клетки (кл/мкл)	490 (197,5-727,7)	437,9 (326-583,34)
CD4+CCR5+ Т-хелперы (%)	1,62 (0,63-3,8)	3,18 (2,26-5,83)
CD4+CCR5+ Т-хелперы кл/мкл	18,58 (8,52-32,6)*	55,67 (43,65-85,43)
Экспрессия CCR5 Т-хелперами (%)	17,72 (9,68-28,6)	14,65 (9,13-21,7)
CD4+CXCR4+CCR5+ Т-хелперы (%)	0,12 (0-0,4)	0,21 (0-0,44)
CD4+CXCR4+CCR5+ Т-хелперы (кл/мкл)	1,05 (0-3,2)	2,51 (0-6,98)
Экспрессия CXCR4 Т-хелперами (%)	23,18 (13,18-49,2)	23,1 (4,7-46,79)
Интенсивность экспрессии CCR5 Т-хелперами (усл. ед.)	9,80 (8,2-16,8)	8,3 (6,8-11,3)
Интенсивность экспрессии CXCR4 Т-хелперами (усл. ед.)	11,90 (8-20)	10,35 (8,2-13,2)

Примечания –

- 1) * – $p < 0,05$ при сравнении показателей в группах, тест Манна-Уитни;
- 2) ИКР – интерквартильный размах

Как видно из таблицы 4.11, у пациентов 2-й группы при наличии СПИДа установлено значительное снижение экспрессии CXCR4 на ЛК, а также, как и в 1-й группе, снижение содержания

CD4+ CCR5+ТЛ ($p < 0,05$).

Сравнение показателей клеточного иммунитета у пациентов, инфицированных вирусами разного тропизма без учета наличия СПИДа, не выявило различий в уровнях В- и Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. Сравнение этих же показателей у пациентов в зависимости от наличия СПИДа позволило установить более выраженную иммуносупрессию у пациентов с не R5тр ВИЧ, как при отсутствии, так и при наличии СПИДа. Таким образом, переключение тропизма вируса происходит на фоне имеющейся иммуносупрессии.

Установлено, что при естественном течении ВИЧ-инфекции, т.е. без получения АРТ, у пациентов с R5тр ВИЧ имела место более выраженная активация Т-клеточного иммунитета, что проявилось более выраженной экспрессией HLA-DR на Т-лимфоцитах и их субпопуляциях.

Данный факт подтверждается наличием прямых коррелятивных связей экспрессии CCR5 на ЛК с содержанием CD8+ТЛ, активированных CD3+HLA-DR+ТЛ и CD8+HLA-DR+ТЛ в обеих группах.

Прогрессирование ВИЧ-инфекции и формирование СПИДа при инфекции R5тр ВИЧ ассоциировалось со снижением Т-хелперов, экспрессирующих HLA-DR (кл/мкл), что, вероятнее всего, было связано с общим снижением Т-хелперов при СПИДе. В то же время установлена значительно более высокая интенсивность экспрессии HLA-DR на Т-хелперах при СПИДе по сравнению с пациентами без СПИДа, что, думается, позволяет нивелировать количественный недостаток активированных Т-хелперов в условиях иммуносупрессии у пациентов, инфицированных R5тр ВИЧ.

При не R5тр ВИЧ-инфекции СПИД ассоциировался со значимо более выраженными изменениями в популяционном составе иммунокомпетентных клеток. Так, при наличии СПИДа установлено усиление процессов активации Т-клеточного иммунитета, что проявилось увеличением относительной экспрессии HLA-DR на ЛК, Т-лимфоцитах, повышением интенсивности экспрессии HLA-DR на Т-хелперах, увеличением относительного содержания CD8+HLA-DR+Т-лимфоцитов.

Кроме того, (в отличие от пациентов 1-й группы), установлено значимое снижение как относительного, так и абсолютного содержания CD4+CD25+ТЛ – регуляторных Т-хелперов.

Роль регуляторных Т-клеток неоднозначна в патогенезе ВИЧ-инфекции. Позитивная роль данных клеток связывается с торможением процессов активации иммунитета, со снижением риска развития синдрома реконструкции иммунной системы на фоне восстановления иммунитета, сдерживанием иммунопролиферативных оппортунистических инфекций [123, 129, 141]. В связи с этим снижение данной популяции иммунных клеток в ситуации возрастания активации иммунной системы при формировании СПИДа может рассматриваться как неблагоприятный фактор в патогенезе ВИЧ-инфекции у пациентов с не R5тр ВИЧ.

Экспрессия CXCR4 на ЛК не различалась в целом в группах пациентов и в контроле. Однако установлено существенное увеличение экспрессии CXCR4 на CD4+Т-лимфоцитов, а также увеличение относительного содержания CXCR4+CD4+Т-лимфоцитов в структуре CD4+Т-лимфоцитов у пациентов 1-й группы по сравнению с контролем, в то время как во 2-й группе данные закономерности не отмечены (табл. 5). Показано, что усиление экспрессии CXCR4 на CD4+ ТЛ является предиктором переключения тропизма вруса с R5 на X4-тропный ВИЧ в динамике развития заболевания, что позволяет объяснить данные факты [83, 122]. В обеих группах у пациентов установлено снижение содержания CD4+ТЛ, экспрессирующих CCR5 и CD4+ТЛ, экспрессирующих оба корцептора (CCR5 и CXCR4) при сравнении с контролем ($p < 0,05$). В то же время в обеих группах пациентов экспрессия CCR5 имела тенденцию к усилению при прогрессировании ВИЧ-инфекции и формировании СПИДа. Данная особенность может быть связана с усилением процессов активации иммунитета при СПИДе, что подтверждается наличием прямых коррелятивных связей между экспрессией CCR5 на ЛК и содержанием активированных Т-лимфоцитов и активированных цитотоксических лимфоцитов у пациентов в обеих группах.

Во 2-й группе имело место выраженное снижение экспрессии CXCR4 на ЛК при наличии СПИДа, что, возможно, связано с гибелью иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих данный ХР в результате инфицирования их не R5тр ВИЧ.

Экспрессия CXCR4 имела прямую коррелятивную связь с маркерами иммуносупрессии у пациентов в обеих группах – содержанием CD4+ТЛ и CD4CD25+ТЛ. В обеих группах у пациентов была установлена обратная корреляция CXCR4 с активированными CD3+HLA-DR+ТЛ, с активированными CD8+HLA-DR+ТЛ.

На основании проводимых иммунологических исследований установлены разные механизмы формирования СПИДа в зависимости от тропизма вируса. При инфекции не R5тр ВИЧ СПИД приводил к значительно более выраженным иммунологическим нарушениям по сравнению с пациентами без переключения тропизма: снижению Т-хелперов и иммунорегуляторного индекса, снижению экспрессии CXCR4+ на ЛК, CCR5 на Т-хелперах, усилению процессов активации Т-клеточного иммунитета за счет повышения экспрессии HLA-DR на лимфоцитах, Т-лимфоцитах, усиления интенсивности экспрессии HLA-DR на Т-хелперах, увеличения экспрессии HLA-DR на CD8+Т-лимфоцитах, снижения содержания регуляторных CD4+CD25+Т-лимфоцитов на фоне снижения Т-хелперов и иммунорегуляторного индекса, снижению экспрессии CXCR4+ на ЛК, CCR5 на Т-хелперах.

4.4 Ассоциация полиморфизма генов цитокинов TNF-альфа (G-308A) и IL-2 (T330G) с иммунологическими показателями ВИЧ-инфицированных пациентов в зависимости от тропизма вируса

Клиническая характеристика ВИЧ-инфицированных пациентов, у которых был определен полиморфизмов генов TNF- α (G-308A) и IL-2 (T330G), представлена в таблице 4.12.

Таблица 4.12. – Клиническая характеристика ВИЧ-инфицированных пациентов

<i>Показатель</i>	<i>1-я группа R5Tp, n=49</i>	<i>2-я группа He R5Tp, n=25</i>
Мужчины	21 (42,8%)	11 (44%)
Женщины	28 (57,2%)	14 (56%)
ПИН	16 (32,6%)	5 (20%)
Возраст (годы)	35,6 (33-39,5)	34,5 (28-43)
1-я стадия*	23 (46,9%)	16 (64%)
2-я стадия	5 (10,2%)	1 (4%)
3-я стадия	15 (30,6%)	5 (20%)
4-я стадия	6 (12,2%)	3 (12%)
СПИД	17 (34,6%)	9 (36%)
Стаж ВИЧ-инфекции (годы)	3,94 (3,0-5,0)	6,18 (1,5-10)
Проводилась АРТ	37 (75,5%)	15 (60%)
ХГС	22 (44,9%)	10 (40%)

Примечание – * – классификация ВОЗ, 2012 г.

Как видно из представленной таблицы 4.12, пациенты в группах не различались по возрасту, полу, клиническим стадиям ВИЧ-инфекции, частоте СПИДа, который устанавливался, исходя из выраженной иммуносупрессии (CD4+Т-лимфоциты менее 200 кл/мкл) и/или наличии 4-й клинической стадии ВИЧ (классификация ВОЗ). Отсутствовали различия по количеству пациентов, получающих АРТ и имеющих ко-инфекцию вирусом ГС.

Иммунологические показатели пациентов представлены в таблице 4.13.

Как видно из таблицы 4.13, у пациентов 1-й группы имело место более высокое содержание лейкоцитов, экспрессирующих CXCR4+ (% и абсолютное значение) по сравнению с пациентами 2-й группы.

Таблица 4.13. – Иммунологические показатели пациентов

Показатели медиана (ИКР)	1-я группа R5Tp, n=49	2-я группа He R5Tp, n=25
CD3+CD4+ Т-хелперы (%)	22,7 (15,3-27,2)	20,69 (9-25)
CD3+CD4+ Т-хелперы (кл/мкл)	389 (245-550)	328,4 (90-388)
CD3+CD8+ Т-цитотоксические лимфоциты (%)	41(28,6-58,5)	50,05 (42,3-62,9)
CD3+CD8+ Т-цитотоксические лимфоциты (кл/мкл)	720 (476-993)	743,6 (352-1144)
Соотношение CD4/CD8	0,46 (0,25-0,92)	0,36 (0,14-0,44)
CD8+ HLA-DR+ активированные Т-цитотокс. лимфоциты (%)	33,9(27,2-45,9)	32,3 (25,4-46,3)
CD8+HLA-DR+ активированные Т-цитотокс. лимфоциты (кл/мкл)	634 (536,4-926,7)	485,9 (283,7-857)
CXCR4+ клетки (%)	31,08 (19,7-38,9)	17,4 (8,57-23,8)*
CXCR4+ клетки (кл/мкл)	328,3 (227,1-485)	232 (108-281)*
CCR5+ клетки (%)	28,1(15,3-33,7)	33,9 (24,4-42,5)
CCR5+ клетки (кл/мкл)	408 (312-649)	505 (360,8-581)

Примечания –

- 1) * – $p < 0,05$ при сравнении показателей в группах, тест Манна-Уитни;
- 2) ИКР – интерквартильный размах

Распределение генотипов и аллелей генов TNF-а (G-308A) в группах пациентов представлено в таблице 4.14.

Таблица 4.14. – Распределение генотипов и аллелей генов TNF-а (G-308A) в группах пациентов с разным тропизмом ВИЧ

Показатель	Генотипы и Аллели	1-я группа R5Tp, n=49		2-я группа HeR5Tp, n=24		Критерий Пирсона χ^2	OR	95% ДИ
		N	%	N	%			
TNF-а (G-308A)	GG	38	77,6	16	66,7	0,99 p=0,61	1,73	0,59-5,10
	GA	11	22,4	8	33,3			
	G	87	88,8	40	83,3	0,84 p=0,36	1,58	0,59-4,23
	A	11	11,2	8	16,7			

Как видно из таблицы 4.14, установлено, что доминирующим генотипом TNF-а (G-308A) было гомозиготное носительство GG, частота встречаемости которого в обеих группах оказалась примерно одинаковой, составив 66,7 и 77,6%, соответственно. Полученные нами данные согласуются с результатами исследования встречаемости данных генотипов в мировых популяциях: гомозиготное носительство GG – 82,75% и гетерозиготное GA – 16,5% (Ensembl, 2015). При анализе исследуемого полиморфного гена TNF-а (G-308A) в

представленной выборке ВИЧ-инфицированных пациентов отмечено соответствие наблюдаемого распределения генотипов для изученных вариантов генов распределению, ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

Частота носительства аллели G гена TNF- α (G-308A) во всей исследуемой группе составила 0,87; аллели A – 0,209. В обеих группах отсутствовал гомозиготный вариант генотипа AA.

В группе пациентов с не R5-тропным типом вируса отмечены достоверные различия (Me (ИКР), тест Манна-Уитни) при сравнении пациентов с гетерозиготным вариантом генотипа GA TNF- α (G-308A) с гомозиготным вариантом генотипа GG:

CD4+Т-лимфоцитов хелперов (%): 24,38 (22-31) и 16,7 (6,4-25,5) ($p = 0,047$), соответственно.

CXCR4+ клетки (кл/мкл) 157 (93-258) и 51 (14,5-166) $p = 0,034$, соответственно.

Данные результаты подтверждаются наличием прямой коррелятивной связи между TNF GA с содержанием CD4+Т-лимфоцитов хелперов (%): $R = 0,45$, $P < 0,05$; и с содержанием CXCR4+ клеток (кл/мкл): $R = 0,63$, $p < 0,05$ у пациентов, инфицированных не R5-тропным ВИЧ. Таким образом, гетерозиготный генотип генотипа GA TNF- α (G-308A) у пациентов с переключением тропизма ВИЧ ассоциировался с более выраженной экспрессией CXCR4+ на лимфоцитах крови и более высоким относительным содержанием CD4+Т-лимфоцитов.

В таблице 4.15 представлено распределение генотипов и аллелей генов IL-2 T330G у пациентов в исследуемых группах

Таблица 4.15. – Распределение генотипов и аллелей генов IL-2 T330G в группах с разным тропизмом ВИЧ

Генотипы и Аллели	1-я группа R5Tp, n=44		2-я группа Не R5Tp, n=25		Критерий Пирсона χ^2	P	OR	95% ДИ
	N	%	N	%				
TT	19	43,1	8	32	1,35	0,51	1,62	0,58-4,53
TG	20	45,5	12	48			0,58	0,20-71
GG	5	11,4	5	20			0,49	0,01-25,70
T	58	65,9	28	56	1,33	0,25	1,52	0,75-3,09
G	30	34,1	22	44			0,66	0,32-1,34

Как отмечено в таблице 4.15, распределение генотипов и аллелей гена IL-2 T330G в группах пациентов не различалось статистически достоверно. Наблюдаемые распределения генотипов подчинялись равновесию Харди-Вайнберга ($p=0,90$; $\chi^2=1,35$; $df=2$).

Установлено, что у пациентов без учета тропизма ВИЧ, имеющих G аллель (генотипы GG и GT) гена IL-2 T330G по сравнению с пациентами с генотипом TT имело место более высокое содержание CD8+HLA-DR+ активированных Т-цитотоксических лимфоцитов (кл/мкл) (Me (ИКР), тест Манна-Уитни): 764 (563-698) и 412,9 (237,7-632,4) кл/мкл, соответственно, $p=0,032$, что отражает более выраженную активацию клеточного иммунитета.

У пациентов, инфицированных не R5-тропным вариантом ВИЧ, носительство аллели T (генотипы TT и GT) имело прямую достоверную корреляцию с показателем FPR более 10%: $R=0,56$, $p<0,003$. Показатель FPR более 10% у пациентов с переключением тропизма имел обратную корреляцию с наличием гомозиготного генотипа GG гена IL-2 T330G: $R=-0,56$, $p<0,003$. Известно, что низкие показатели FPR отражают наличие «чистого» X4 тропного варианта вируса и ассоциируются с неблагоприятным течением ВИЧ-инфекции. В связи с этим обнаруженные корреляции указывают на ассоциацию благоприятного течения ВИЧ-инфекции у пациентов с переключением тропизма вируса при носительстве аллели T и, напротив, с неблагоприятным течением заболевания и более выраженной активацией иммунитета при носительстве аллели G и генотипа GG.

Таким образом, правомерны выводы:

1. Переключение тропизма ВИЧ ассоциировалось со значительным снижением содержания В-лимфоцитов у пациентов без СПИДа и Т-хелперов – у пациентов с наличием СПИДа.

2. У пациентов, инфицированных R5-тр ВИЧ, не получающих АРТ, имела место более выраженная экспрессия HLA-DR на Т-лимфоцитах, Т-хелперах и цитотоксических Т-лимфоцитах при сравнении с инфицированными не R5-тропным ВИЧ.

3. Развитие СПИДа при инфекции R5-тр ВИЧ ассоциировалось со значительным снижением содержания Т-лимфоцитов, Т-хелперов, активированных Т-хелперов с

повышением интенсивности экспрессии HLA-DR на Т-хелперах. Развитие СПИДа при инфекции не R5-тр ВИЧ ассоциировалось со значительно более выраженными иммунологическими нарушениями: снижением Т-хелперов и иммунорегуляторного индекса, снижением экспрессии CXCR4+ на ЛК, CCR5 на Т-хелперах, усилением процессов активации Т-клеточного иммунитета за счет повышения экспрессии HLA-DR на лимфоцитах, Т-лимфоцитах, усилением интенсивности экспрессии HLA-DR на Т-хелперах, увеличением экспрессии HLA-DR на CD8+Т-лимфоцитах, снижением содержания регуляторных CD4+CD25+Т-лимфоцитов ($p < 0,05$).

4. Не установлено различий в частоте распределения генотипов и аллелей генов цитокинов TNF-альфа (G-308A) и IL-2 (T330G) у ВИЧ-инфицированных пациентов в зависимости от тропизма вируса. Отмечено соответствие наблюдаемого распределения генотипов и аллелей для изученных вариантов генов ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

5. Носительство аллели G (генотипы GG и GT) гена IL-2 T330G у ВИЧ-инфицированных пациентов ассоциировалось с более высоким содержанием CD8+HLA-DR+ активированных Т-цитотоксических лимфоцитов.

У пациентов, инфицированных не R5-тропным вариантом ВИЧ, установлен ряд ассоциаций генотипов и носительства аллелей изучаемых генов с иммунологическими показателями:

- генотип GA TNF- α (G-308A) ассоциировался с более выраженной экспрессией CXCR4+ на лимфоцитах крови и более высоким содержанием CD4+Т-лимфоцитов;
- носительство аллели T (генотипы TT и GT) имело прямую достоверную корреляцию с показателем FPR более 10%: $R=0,56$, $p < 0,003$;
- генотип GG гена IL-2 T330G имел обратную корреляцию с показателем FPR более 10%: $R=-0,56$, $p < 0,003$.

6. Установлено, что у пациентов с переключением тропизма ВИЧ (наличие не R5 тропного варианта) генетическими предикторами благоприятного течения ВИЧ-инфекции были: наличие генотипа GA TNF- α (G-308A) и носительство аллели T гена IL-2 (T330G).

ГЛАВА 5

КЛИНИЧЕСКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ, ИСХОДЫ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ И ОТВЕТ НА АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТРОПИЗМА ВИРУСА

5.1 Клинические проявления ВИЧ-инфекции в зависимости от тропизма ВИЧ

Для оценки особенностей клинических проявлений ВИЧ-инфекции был выполнен сравнительный анализ демографических, эпидемиологических и клинико-лабораторных проявлений заболевания, эффективности АРТ в зависимости от тропизма ВИЧ.

Распределение пациентов по возрасту, полу и продолжительности учета по ВИЧ-инфекции представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1. – Распределение пациентов по возрасту и полу в зависимости от тропизма ВИЧ

Показатель	1-я группа R5Tr, n=63	2-я группа Не R5Tr, n=35	P*
Возраст Me (ИКР), годы	36 (30-43)	35 (30-42)	>0,05**
До 20 лет	0	1(2,8%)	>0,05
20-30 лет	16 (25,4%)	8 (22,8%)	>0,05
30-40 лет	26 (41,2%)	19 (54,4%)	>0,05
40-50 лет	15 (23,8%)	5 (14,3%)	>0,05
>50 лет	6 (9,6%)	2(5,7%)	>0,05
Мужчины	37 (58,7%)	20 (56,7%)	>0,05
Женщины	26 (41,3%)	15 (43,3)	>0,05

Примечания –

1) * – $p < 0,05$;

2) тест χ^2 ** – тест Манна-Уитни

Как видно из представленной таблицы 5.1, возраст пациентов и распределение по разным возрастным категориям не различались достоверно в группах наблюдения. Большинство

пациентов в обеих группах находились в возрасте от 30 до 40 лет. Количество пациентов старше 50 лет было незначительным в группах. Возраст до 20 лет был у 1 пациента 2-й группы.

Пациенты в группах не различались также по полу. Количество мужчин незначительно превышало количество женщин в обеих группах. Это соответствует половой структуре ВИЧ-инфицированных пациентов в Гродненской области в современный период, так как в последние годы отмечается тенденция к росту доли ВИЧ-инфицированных женщин в структуре новых случаев ВИЧ-инфекции [34].

Распределение пациентов по стажу учета по ВИЧ-инфекции представлено в таблице 5.2.

Таблица 5.2. – Распределение пациентов по продолжительности учета по ВИЧ-инфекции в зависимости от тропизма вируса

<i>Показатель</i>	<i>1-я группа R5Tr, n=63</i>	<i>2-я группа Не R5Tr, n=35</i>	<i>p</i>
«Стаж» учета по ВИЧ-инфекции, Ме (ИКР)	3(1-5)	6(2-8)	>0,05**
До 5 лет	32 (50,7%)	13 (37,2%)	>0,05*
5-10 лет	19 (30,1%)	13 (37,2%)	>0,05*
>10 лет	12 (19,2%)	9 (25,6%)	>0,05*

Примечания –

1) * – тест χ^2

2) ** – тест Манна-Уитни

Как видно из таблицы 5.2, продолжительность учета по ВИЧ-инфекции у пациентов 1-й группы была несколько короче, однако без статистически установленного различия ($p > 0,05$), несмотря на необходимость определенного промежутка времени для переключения тропизма вируса. Необходимо учитывать, что продолжительность учета ВИЧ-инфекции далеко не всегда отражает реальный «стаж» заболевания, т.к. пациент, находясь на асимптомной стадии ВИЧ-инфекции, по разным причинам мог не попадать в поле зрения врачей, не зная о своем заболевании. Распределение пациентов по разным срокам учета также не различалось достоверно. Как видно из таблицы 5.2, стаж наблюдения до 5 лет был у 37,2% пациентов из 2-й группы. Такой относительно короткий срок учета пациентов с переключением

тропизма ВИЧ может быть связан (в том числе) и с поздней диагностикой ВИЧ-инфекции. Однако в группе пациентов с R5-тропным ВИЧ у 49,3% пациентов продолжительность наблюдения по ВИЧ-инфекции была более 5 лет, при этом у 12 пациентов – более 10 лет, что не позволяет использовать продолжительность ВИЧ-инфекции как ориентировочный показатель для определения тропизма вируса в каждом конкретном случае.

Распределение пациентов в группах по путям инфицирования представлено на рисунке 5.1.

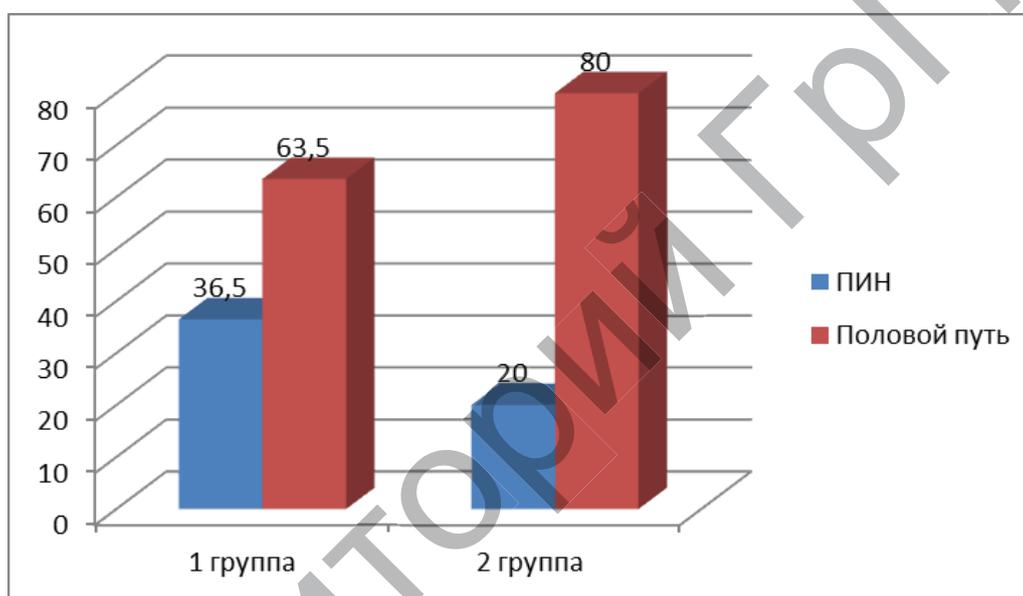


Рисунок 5.1. – Распределение (%) пациентов по путям инфицирования ВИЧ

Как видно из представленного рисунка 5.1, в 1-й и 2-й группах пациентов превалировал половой путь инфицирования – 40 и 18 пациентов, соответственно, $p > 0,05$. Количество пациентов с парентеральным путем инфицирования – 23 и 7, соответственно, $p > 0,05$.

Распределение пациентов по клиническим стадиям ВИЧ-инфекции представлено на рисунке 5.2.

Как отмечено на рисунке 5.2, не установлено статистически достоверных различий в частоте клинических стадий ВИЧ-инфекции у пациентов с разным тропизмом вируса. Так, у

18 (51,4%) пациентов, инфицированных не R5-тропным вирусом, имела место 1-я стадия ВИЧ-инфекции, в то время как у 32 (50,8%) пациентов с R5-тропным ВИЧ имели место симптомные (2, 3 и 4) стадии ВИЧ-инфекции. Стадия СПИД присутствовала в обеих группах ($p > 0,05$). Как указано на рисунке 5,2, 30,2% (19) пациентов 1-й группы были на стадии СПИДа, несмотря на доказанную инфекцию R5-тропным вариантом ВИЧ, что свидетельствует об отсутствии у данных пациентов переключения тропизма вируса на продвинутых стадиях ВИЧ-инфекции. В структуре пациентов со СПИДом пациенты, инфицированные R5Tr вариантом вируса, доминировали и составили 64,2%, что указывает на отсутствие у данных пациентов переключения тропизма вируса на «продвинутых» стадиях ВИЧ-инфекции.

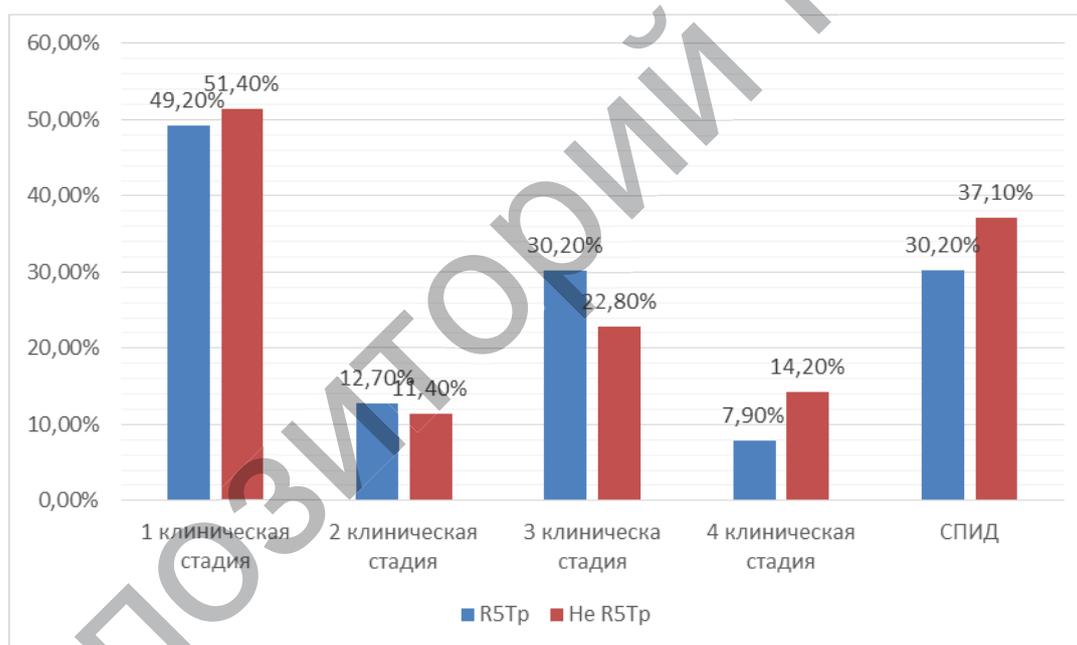


Рисунок 5.2. – Распределение пациентов по клиническим стадиям ВИЧ-инфекции

Появление оппортунистических инфекций (ОИ) при ВИЧ-инфекции – признак формирования иммуносупрессии и прогрессирования заболевания [25, 34, 189, 192]. Частота наиболее распространённых ОИ в группах наблюдения представлена в таблице 5.3.

Таблица 5.3. – Частота оппортунистических инфекций в группах наблюдения

<i>ОИ</i>	<i>1-я группа R5Tp, n=63</i>	<i>2-я группа He R5Tp, n=35</i>	<i>p*</i>
Кандидоз полости рта	17 (26,9%)	10 (28,57%)	>0,05
Волосистая лейкоплакия языка	6 (9,5%)	4 (11,4%)	>0,05
Себорейный дерматит	5 (7,9%)	4 (11,4%)	>0,05
Туберкулез	13 (20,6%)	8 (22,8%)	>0,05
Герпетическая инфекция	4 (6,3%)	1 (2,8%)	>0,05
Онихомикоз	8 (12,6%)	1(2,8%)	>0,05

Примечание – * – тест χ^2 с поправкой Yates

Как видно из таблицы 5.3, наиболее распространенной ОИ в группах наблюдения был орофарингеальный кандидоз, на втором месте по частоте находилась такая грозная инфекция, как туберкулез. Более детальное описание форм туберкулеза и исходов представлено ниже. Среди других оппортунистических инфекций в 1-й группе были установлены: пневмоцистная пневмония, лимфома Ходжкина. Лабораторные маркеры ОИ были изучены у 27 пациентов 1-й группы и 18 пациентов 2-й группы.

Маркеры острых инфекций – Ig M к вирусу простого герпеса (ВПГ) 1 и 2 типа, токсоплазмозу (Тох) и вирусу Эпштейна-Барра (ВЭБ) – не определялись ни у кого из пациентов. Частота обнаружения иммуноглобулинов G к возбудителям ОИ представлена таблице 5.4.

Таблица 5.4. – Лабораторные маркеры оппортунистических инфекций в группах пациентов

<i>Маркер</i>	<i>1-я группа R5Tp, n=27</i>	<i>2-я группа He R5Tp, n=18</i>	<i>p*</i>
Ig G к ВПГ 1 + Ig G к ВПГ 2	14 (51,8%)	6 (33,3%)	>0,05
Ig G к ЦМВ	14 (51,8%)	5 (27,7%)	>0,05
Ig G к Тох	11 (40,7%)	6 (33,33%)	>0,05
Ig G к ВЭБ	2 (7,4%)	3 (16,6%)	>0,05

Примечание – * – тест χ^2 с поправкой Yates

Как видно из таблицы 5.4, не установлено различий в частоте лабораторных маркеров ОИ в группах пациентов.

Разные формы туберкулеза были установлены у 13 (18,5%) пациентов 1-й группы и у 8 (10%) – во 2-й группе ($p>0,05$).

Характеристика туберкулеза у пациентов в группах наблюдения представлена в таблице 5.5.

Таблица 5.5. – Клинические формы туберкулеза у пациентов в группах

<i>ТБ, клинические формы</i>	<i>1-я группа R5Tp, n=63</i>	<i>2-я группа He R5Tp, n=35</i>	<i>p*</i>
Очаговый ТБ легких	2 (3,17%)	2 (5,7%)	>0,05
Инфильтративный ТБ легких	9 (14,2%)	4 (11,4%)	>0,05
Диссеминированный ТБ легких	1 (1,5%)	1 (2,8%)	>0,05
Генерализованный ТБ	1 (1,5%)	0	>0,05
Казеозная пневмония	0	1 (2,8%)	>0,05
МЛУ ¹	4 (6,3%)	1 (2,8%)	>0,05

Примечания –

1) * – тест χ^2 с поправкой Yates;

2) ¹ – МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

Как представлено в таблице 5.5, частота клинических форм туберкулеза не различалась достоверно в группах наблюдения. Наиболее распространенной формой был инфильтративный туберкулез легких, составивший большинство случаев в 1-й группе и 50% – во 2-й. Тяжелые формы туберкулеза (диссеминированный, генерализованный и казеозная пневмония) были представлены единичными случаями в группах, приведшими в 4-х случаях к летальным исходам (по 2 случая в каждой группе). МЛУ возбудителя туберкулеза была установлена у 4 пациентов в 1-й группе. Среди 13 умерших пациентов туберкулез стал непосредственной причиной смерти у четырех пациентов когорты. Это было связано с тяжестью течения заболевания, наличием стадии СПИДа на момент развития туберкулеза, с отсутствием кБАРТ. Терапия ВИЧ-инфекции до возникновения туберкулеза была назначена 7 пациентам, остальным пациентам кБАРТ назначалась после установления диагноза туберкулеза в сроки, рекомендованные нормативными документами [9, 15, 23].

Известно, что ВИЧ-инфицированные пациенты являются доказанным резервуаром парентеральных вирусных гепатитов в связи с единым механизмом передачи возбудителей. Частота маркеров парентеральных гепатитов представлена в таблице 5.6.

Таблица 5.6. – Маркеры парентеральных вирусных гепатитов у пациентов в группах наблюдения

Показатель	1-я группа R5Tp, n=63	2-я группа He R5Tp, n=35	p*
Анти-ВГС	29 (46%)	18 (51,4%)	>0,05
РНК ВГС	13 из 15 (86,7%)	12 из 15 (80,0%)	>0,05
HBsAg	1 (1,5%)	1 (2,8%)	>0,05

Примечание – * – Тест χ^2

Как видно из таблицы 5.6, количество пациентов, у которых были выделены антитела к ВГС, оказалось примерно одинаковым в обеих группах: 29 (46%) пациентов в 1-й группе и 18 (51,4%) – во 2-й, $p > 0,05$. РНК гепатита С определена у 15 пациентов из каждой группы. Частота позитивного результата ПЦР на РНК ВГС статистически не различалась ($p > 0,05$). В обеих группах было по одному случаю ко-инфекции вирусом гепатита В и С.

Приводим клинические примеры течения двух случаев ВИЧ-инфекции с установленным тропизмом вируса.

Клинический пример 1. Пациентка К., 35 лет, замужем, имеет постоянное место работы, инфицирована не R5Tp вариантом ВИЧ (FPR – 13), тропизм ВИЧ определен в 2013 г. Путь инфицирования – половой. Наличие ВИЧ-инфекции установлено в апреле 2013 г. При постановке на учет выставлен диагноз: ВИЧ-инфекция, I клиническая стадия, CD4+Т-лимфоциты – 818 кл/мкл. В течение следующих трех лет общее состояние пациентки оставалось удовлетворительным, жалобы отсутствовали. Клинические проявления оппортунистических инфекций отсутствовали. При лабораторном обследовании получены отрицательные результаты анализов на маркеры вирусных гепатитов, а также не были выявлены Ig M к ЦМВ, ВЭБ, Ig G ВПГ 1,2 методом ИФА. Уровень ВН ВИЧ при постановке на учет – 95 000 копий/мл, однако при повторном определении через 3 месяца, несмотря на отсутствие АРТ, был неопределяемым (<500 копий/мл) и сохранялся таким при последующем наблюдении. Уровень CD4+Т-лимфоцитов оставался достаточным: 514 кл/мкл – в июне 2013 г., а в 2015 г. составил 868 кл/мкл. В связи с данными иммунологическими и вирусологическими показателями пациентка находилась без АРТ согласно действующим на тот период рекомендациям по

назначению терапии. В 2016 г. пациентка забеременела, и при осмотре в мае этого года был установлен диагноз: ВИЧ-инфекция, 1 клиническая стадия (CD4 – 727 кл/мкл). Беременность – 10-11 недель (на 30.05.16). Для профилактики вертикальной трансмиссии ВИЧ и для дальнейшего лечения с 14 недель беременности ей было рекомендовано начать кБАПТ. Назначена схема AZT/ЗТС+LPV/г. В декабре 2016 г. были роды, ребенок наблюдается как ВИЧ-экспонированный. В мае 2017 г. общее состояние пациентки оставалось удовлетворительным, жалобы отсутствовали. Диагноз: ВИЧ-инфекция, 1 клиническая стадия (CD4+ ТЛ – 1078 кл/мкл), уровень ВН был <500 копий/мл, пациентка продолжает получать терапию по схеме, указанной выше.

Клинический пример 2. Пациент С., 45 лет, мужчина, инфицирован R5-тропным вариантом вируса (FRP – 50,3), тропизм определен в 2013 г. Путь инфицирования – половой. Впервые диагноз установлен в феврале 2013 г. уже при наличии выраженной иммуносупрессии. Диагноз: ВИЧ-инфекция, III клиническая стадия (CD4+ТЛ – 60кл/мкл). Персистирующая генерализованная лимфаденопатия. Диссеминированный туберкулез легких в фазе рассасывания и рубцевания. МБТ(-). СЗА 2 ст. Мозжечковая атаксия. Хронический токсический гепатит с исходом в цирроз. Синдром зависимости от алкоголя. Вертеброгенная радикулопатия L5-S1 слева, ремиссия. Плегия левой стопы. Тяжелый иммунодефицит. (CD4+ТЛ – 30 клеток в 1 мкл). Первоначально назначенную АРТ зидоламом и абакавиром (в апреле 2013 г.) пришлось заменить уже в ноябре 2013 г. на зидовудин, ламивудин и лопинавир в связи с неэффективностью, так как изначальный уровень CD4+Т-лимфоцитов – 60 кл/мкл – снизился до 31. Уровень вирусной нагрузки сохранялся на высоком уровне от 230000 коп/мл до 150000 коп/мл. Повторная смена АРТ, которую пациент продолжает получать в настоящее время, произведена в декабре 2014 г. – тенофовир, эмтрицитабин, эфавир. Пациенту назначалась также профилактика ОИ. В 2014 г. наступило клиническое излечение диссеминированного туберкулеза легких, но был выявлен хронический остеомиелит большеберцовой кости

справа, свищевая форма. Однако уже в марте 2015 г. отмечен рецидив туберкулеза в виде очагового туберкулеза правого легкого и экссудативного плеврита. Пациент прошел курс противотуберкулезной терапии и был выписан с улучшением. Отмечен прирост CD4+клеток до 118 кл/мкл, вирусная нагрузка ВИЧ – менее 116 коп/мл.

Таким образом, представленные примеры демонстрируют отсутствие корреляции между клиническими проявлениями ВИЧ-инфекции и характером тропизма вируса. Так, в первом клиническом примере у пациентки с доказанным вариантом не R5тр варианта ВИЧ (FPR – 13) имело место доброкачественное бессимптомное течение ВИЧ-инфекции. Во втором клиническом случае, несмотря на наличие R5тр варианта ВИЧ (FPR – 50,3), имело место тяжелое течение заболевания с наличием выраженной иммуносупрессии, высокой ВН ВИЧ, манифестацией оппортунистических инфекций в виде тяжелого туберкулеза.

5.2 Эффективность АРТ в зависимости от тропизма ВИЧ

АРТ была назначена 41 (65%) пациенту 1-й группы и 21(60%) – 2-й группы ($p>0,05$).

Клиническая характеристика пациентов в зависимости от получения АРТ представлена в таблице 5.6. Как видно из таблицы, в группах не было различий по возрасту, полу, путям инфицирования, количеству пациентов, получающих АРТ.

Как отмечено в таблице 5.7, не установлено достоверных различий в частоте клинических стадий ВИЧ-инфекции в группах. В 1-й группе частота СПИДа была выше среди пациентов, получающих АРТ. При анализе данных о развитии оппортунистических инфекций/заболеваний самыми распространенными в обеих группах отмечены поражения кожи и слизистых. В первой группе у пациентов, получающих АРТ, они встречались у 21 (51,2%) пациента и у 5 (22,7%) – не получающих АРТ. В группе пациентов с не R5Тр вирусом данные заболевания были у 10 пациентов (47,6%), находящихся на лечении, и у 6 (42,8%) – без терапии. Разные формы туберкулеза отмечены в обеих группах пациентов.

Таблица 5.7. – Клиническая характеристика пациентов в группах исследования в зависимости от получения АРТ

Показатель	1-я группа R5Tr, n=63		2-я группа Не R5Tr, n=35	
	на АРТ, n=41	без АРТ, n=22	на АРТ, n=21	Без АРТ, n=14
Мужчины	18 (28,5%)	8 (12,8%)	11 (31,5%)	5 (14,2%)
Женщины	23 (36,5%)	14 (22,2%)	10 (28,5%)	9 (25,8%)
ПИН	12 (19%)	11 (17,4%)	4 (11,4%)	3 (8,5%)
Возраст (годы)	37 (33-43)	32 (24-40)	34 (30-41)	34,5 (28-43)
1-я стадия**	14 (22,2%)	18 (28,6%)	10 (28,5%)	8 (22,8%)
2-я стадия	7 (11,1%)	1 (1,5%)	2 (5,7%)	2 (5,7%)
3-я стадия	15 (23,9%)	3 (4,8%)	6 (17,3%)	2 (5,7%)
4-я стадия	5 (7,9%)	0	3 (8,6%)	2 (5,7%)
СПИД	20 (31,7%)	4 (6,3%)*	8 (22,8%)	6 (17,1%)
Стаж ВИЧ-инфекции (гг.)	6,7 (1-18)	6,4 (1-9)	4,6 (2-13)	4,8 (2-9)

Примечания –

- 1) * – $p < 0,05$, тест χ^2 при сравнении частоты СПИДа у пациентов 1-й группы в зависимости от получения АРТ;
- 2) ** – клинические стадии ВИЧ (ВОЗ, 2012);
- 3) ПИН – потребители инъекционных наркотических препаратов

Схемы АРТ в группах пациентов представлены в таблице 5.8.

Таблица 5.8. – Схемы АРТ в группах пациентов

Показатель	1-я группа R5Tr на АРТ, n=41	2-я группа не R5tr ВИЧ, n=21	P
AZT+3TC+EFV	14 (43,2%)	6 (28,5%)	>0,05
AZT+3TC+NVP	4 (9,1%)	2 (9,5%)	>0,05
ABC+3TC+EFV	4 (6,8%)	0	>0,05
ABC+3TC+LPV/r	2(4,5%)	1 (4,7%)	>0,05
AZT/3TC+LPV/r	6 (11,4%)	3 (14,2%)	>0,05
TDF/FTC/EFV	8 (19,5%)	1 (4,7%)	>0,05
TDF/FTC+LPV/r	1 (2,3%)	3 (14,2%)	>0,05
TDF/FTC+NVP	2 (4,5%)	2 (9,5%)	>0,05
TDF+3TC+LPV/r	0	1 (4,7%)	>0,05
AZT/3TC+ABC	0	2 (9,5%)	>0,05

Примечание – * – тест χ^2 с поправкой Yates

Основными схемами у большинства пациентов: у 32 (78%) пациентов 1-й группы и у 13 (62%) – во 2-й группе были комбинации из двух нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) и одного ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы (ННИОТ) (табл. 5.8). Схемы с ингибитором протеазы (ИП) – лопинавиром/ритонавиром у 9 (22%) пациентов 1-й группы и у 8 (38%) 2-й группы – назначались в большинстве случаев при необходимости замены схемы терапии.

Продолжительность АРТ у пациентов в группах отражена в таблице 5.9.

Таблица 5.9. – Продолжительность АРТ у пациентов в группах

Показатель	1-я группа R5Tr на АРТ, n=41	2 группа не R5tr ВИЧ, n=21	p
Продолжительность АРТ медиана (ИКР)	2,5 (0-11)	1,3 (0-8)	>0,05
До 1 года	1 (2,4%)	3 (14,2%)	>0,05
От 1 года до 2 лет	12 (29,2%)	2 (9,5%)*	>0,05
От 2 до 5 лет	19 (46,3%)	9 (42,8%)	>0,05
От 5 до 10 лет	8 (19,5%)	7 (33,5%)	>0,05
Более 10 лет	1 (2,4%)	0	>0,05

Примечание – * – тест χ^2 с поправкой Yates

Как отражено в таблице 5.9, у большинства пациентов обеих групп продолжительность терапии составляла от 1 года до 5 лет: у 31 (75,6%) пациента в 1-й группе и у 11 (52,3%) – во 2-й. Продолжительность АРТ в целом в группах не различалась достоверно: в 1-й группе она составляла: Me (ИКР) – 2,5 (0-11) года, во 2-й – 1,3 (0-8) года. Установлено, что количество пациентов, получавших АРТ от 1 до 2 лет, было достоверно больше у пациентов 1-й группы: 12 (29,2%) лет и 2 (9,5%) года, соответственно ($p < 0,05$, тест χ^2).

Анализ лабораторных показателей пациентов в группах наблюдения с учетом получения АРТ представлен в таблице 5.10.

Таблица 5.10. – Лабораторные показатели пациентов в зависимости от тропизма ВИЧ с учетом получения АРТ

Показатель	1-я группа R5Tr, n=63		2-я группа Не R5Tr, n=35	
	на АРТ, n=41	без АРТ, n=22	на АРТ, n=21	без АРТ, n=14
CD4+ТЛ%	25 (17,39-42)	27,9 (21-39)	21,47 (9-44)	38,8 (32,7-53)**
CD4+ ТЛ абс (кл/мкл)	302 (196-482)	570 (511-783)*	268 (114-368)	523 (329-563)**
CD4+ ТЛ менее 200 (случаи)	22 (53,6%)	4 (18,%)*	12 (57,%)	5 (35,7%)
ВН ВИЧ (коп/мл)	120000 (<500-1500000)	7586 (<500-54200)*	52 928 (<500-340000)	8 906 (<500-46000)**

Примечания –

- 1) * – $p < 0,05$, тест Манна-Уитни при сравнении показателей у пациентов 1-й группы, получающих и не получающих АРТ;
- 2) ** – $p < 0,05$, тест Манна-Уитни при сравнении показателей у пациентов 2-й группы, получающих и не получающих АРТ

Отмечены более высокие уровни содержания CD4+Т-лимфоцитов у пациентов без терапии в группах, что связано, вероятно, с наличием в этих группах пациентов на начальных стадиях заболевания и не имевших, по действующим ранее нормативным документам, клинико-лабораторных показаний к проведению АРТ (табл. 5.10).

В 1-й группе количество пациентов, достигших снижения уровня CD4+Т-лимфоцитов менее 200 кл/мкл, было выше у пациентов, находящихся на лечении.

Эффективность АРТ, частота замены схем терапии, ВО и ИО в группах пациентов представлены в таблице 5.11.

Как следует из таблицы, не установлено достоверных различий в частоте замен схем терапии, а также в частоте ВО и ИО в зависимости от тропизма ВИЧ.

При проведении корреляционного анализа Spearman во 2-й группе у пациентов была установлена прямая корреляция между относительным содержанием CD4+Т-лимфоцитов (%) и наличием ИО: $R=0,51$, $p < 0,05$ и ВО: $R=0,63$, $p < 0,05$. Установлена обратная корреляция ИО с уровнем CD8+Т-лимфоцитов: $R=-0,56$, $p < 0,05$.

Таблица 5.11. – Эффективность АРТ в зависимости от тропизма ВИЧ-1

Показатель	1-я группа R5Тр, n=41	2-я группа Не R5Тр, n=21	p*
Замены схем терапии (всего)	14 (34,1%)	11 (52,3%)	>0,05
1-кратная замена	10 (24,3%)	7 (33,3%)	>0,05
2-кратная замена	3 (7,3%)	4 (19%)	>0,05
3-кратная замена	1 (2,4%)	0	>0,05
ИО	27 (65,8%)	14 (66,6%)	>0,05
ВО	31(75,6%)	14 (66,6%)	>0,05

Примечания –

- 1) ИО – иммунологический ответ;
- 2) ВО – вирусологический ответ;
- 3) * – test χ^2

В группе пациентов, инфицированных не R5тр вирусом, среди тех, которым проводилась смена АРТ, у 1 (7,1%) пациента пришлось провести замену в первый год применения АРТ в связи с развитием непереносимости, у 8 (57,2%) пациентов проведена замена при стаже АРТ от 1 года до 5 лет и у 5 пациентов – при стаже свыше 5 (35,7%) лет в связи с неэффективностью первой схемы, развитием побочных эффектов препаратов. Во 2-й группе пациентов у 1 (9%) пациентки также пришлось заменить АРТ в связи с непереносимостью в первый год приема АРТ, у 7 (63,7%) пациентов замена проводилась при стаже лечения от года до 5 лет, и у 3 (27,3%) человек – при стаже свыше 5 лет.

Частота летальных исходов у пациентов в группах с учетом получения АРТ в динамике ведущие причины смерти пациентов представлены в таблице 5.12.

Как отмечено в таблице 5.12, частота летальных исходов у пациентов в 1-й и 2-й группах наблюдения в целом не различалась, достоверно – 12,6 и 17,1% ($p>0,05$). Однако среди пациентов обеих групп, не получавших АРТ, частота летальных исходов была выше у инфицированных не R5-тропным ВИЧ ($p<0,05$, тест χ^2). Таким образом, отсутствие АРТ среди пациентов с не R5 тропным ВИЧ ассоциировалось с более высокой частотой летальных исходов при сравнении с R5 тропным ВИЧ

Таблица 5.12. – Частота летальных исходов и продолжительность жизни у пациентов в группах с учетом получения АРТ

Показатель	1-я группа R5Tp, n=63		2-я группа He R5Tp, n=35	
	на АРТ, n=41	без АРТ, n=22	на АРТ, n=21	Без АРТ, n=14
Смерть	5 (12,1%)	3 (13,6%)	0	6 (42,8%) ^{*,**}
Продолжительность жизни умерших	4,5 (3-6)	3 (1-5)		7 (1-9)

Примечания –

1) * – $p < 0,05$, тест χ^2 при сравнении частоты летальных исходов у пациентов 2-й группы, получавших и не получающих АРТ;

2) ** – $p < 0,05$, тест χ^2 при сравнении частоты летальных исходов у пациентов 1-й и 2-й групп, не получавших АРТ.

При сравнении частоты летальных исходов у пациентов 2-й группы в зависимости от получения АРТ установлено отсутствие летальных исходов у получавших АРТ и 42,8% летальных исходов среди пациентов, которые не получали терапию ($p < 0,05$). Все умершие пациенты были на стадии СПИДа.

Ведущими причинами смерти у 2 пациентов 1-й группы была декомпенсации цирроза печени смешанной этиологии (ВГС-инфекция, токсические факторы). В 1 случае у пациента развилась Ходжкинская лимфома на фоне ВААРТ как проявление воспалительного синдрома восстановления иммунитета [17, 113, 118]. В двух случаях причиной смерти стало развитие тяжелых форм туберкулеза, в 2-х других – развитие терминальной стадии ВИЧ-инфекции. Все умершие пациенты из 2-й группы находились на 4 клинической стадии заболевания. В двух случаях причинами смерти были тяжелые формы туберкулеза легких на фоне выраженной иммуносупрессии, в 1 случае – поражение ЦНС с формированием стволово-мозжечкового синдрома, в одном случае – рак слепой кишки, в одном случае – ВИЧ-кардиомиопатия, миоперикардит с ВИЧ-нефропатией. В одном случае непосредственной причиной смерти стала термическая травма и ожоговая болезнь, однако данный пациент на момент получения травмы также находился на 4-й клинической стадии и переносил тяжелую формы туберкулеза (диссеминированный туберкулез легких и туберкулез почек).

Продолжительность жизни умерших пациентов после постановки на учет по ВИЧ-инфекции была короче в 1-й группе по сравнению со 2-й группой – 4 (3-6) года и 7 (1-9) лет ($p=0,72$, тест Манна-Уитни), соответственно. Это говорит о поздней диагностике ВИЧ-инфекции в 1-й группе, так как все пациенты были выявлены по клиническим проявлениям СПИД-ассоциированной патологии, возникшей на фоне тяжелой иммуносупрессии. Необходимо отметить, что большинство умерших имели низкую приверженность к терапии или не получали ее вовсе, злоупотребляли алкоголем, вели асоциальный образ жизни.

В связи с высокой частотой летальных исходов у пациентов, инфицированных не R5 ВИЧ без АРТ, выполнен анализ клинико-лабораторных данных пациентов в зависимости от исхода ВИЧ-инфекции (табл. 5.13).

Таблица 5.13. – Характеристика пациентов, инфицированных не R5-тропным ВИЧ в зависимости от исхода ВИЧ-инфекции

Показатель	Умершие пациенты, <i>n</i> =6	Живущие с ВИЧ, <i>n</i> =29
Возраст, лет	36 (35-39)	33,5 (30-39)
Стаж ВИЧ-инфекции, годы	5 (6-10)	7 (3-9)
Уровень CD 4+Т-лимфоцитов (кл/мкл)	271(90-373)	344 (178-473)
Уровень ВН, коп/мл	92500 (24627-247000)	6950 (400-43000)
Наличие АРТ	0	21 (72,4%)*

Примечание – * – тест χ^2 с поправкой Yates

Как отмечено в представленной таблице 5.13, в группе умерших пациентов отсутствовала АРТ. Причинами отсутствия АРТ у умерших пациентов была поздняя диагностика ВИЧ-инфекции на терминальной стадии заболевания при манифестации тяжелых оппортунистических инфекций и заболеваний у 4 пациентов, отказ от терапии – у 2 пациентов.

Повторное определение тропизма вируса в динамике наблюдения было выполнено у 9 пациентов в группе (табл. 5.14). Среди них на момент первого определения FPR 6 были инфицированы R5тр вариантом вируса и 3 – не R5тр. Интервал между двумя исследованиями (Ме (мин-макс)) составил 27 (13-36) месяцев.

Как указано в таблице 5.14, у всех пациентов отмечены колебания показателя FPR при повторном определении.

Показатель FPR (Me (мин-макс)) при первом определении составил 31,14 (5,7-56,9), при повторном – 36,5 (0,1-64), $p > 0,05$, Wilcoxon test. На момент проведения первого исследования на терапии находились 5 пациентов.

Таблица 5.14. – Динамика показателя FPR у ВИЧ-инфицированных пациентов

<i>FPR 1</i>	<i>FPR 2</i>	<i>Получение АРТ</i>
8,2 (не-R5-тропный)	17 (не-R5-тропный)	получал АРТ
17 (не-R5-тропный)	0,1 (не-R5-тропный)	не получал АРТ
5,7 (не-R5-тропный)	49,7 (R5-тропный)	получал АРТ
41,6 (R5-тропный)	31,6 (R5-тропный)	получал АРТ
49,6 (R5-тропный)	58,3 (R5-тропный)	получал АРТ
22 (R5-тропный)	23 (R5-тропный)	не получал АРТ
56,9 (R5-тропный)	64 (R5-тропный)	не получал АРТ
50,5 (R5-тропный)	42,2 (R5-тропный)	получал АРТ
28,8 (R5-тропный)	43,2 (R5-тропный)	получал АРТ

Наиболее значимые изменения FPR отмечены у пациентов, инфицированных не R5тр ВИЧ. У пациента 1, получавшего АРТ, отмечено увеличение показателя с 8,2 до 17, что указывает на формирование вируса с двойным тропизмом X4/R5-тропного при разделительном уровне FPR, равном 20%. При уровне FPR, равном 10, данный вирус мог быть классифицирован как R5-тропный, однако с учетом того, что в представленной работе уровень FPR для R5-тропных вирусов взят как равный 20%, пациентка инфицирована не R5-тропным вирусом. У пациента 2, не получавшего АРТ, отмечено снижение показателя с 17 до 0,1, что свидетельствует о формировании у него «чистого» X4-тропного ВИЧ. Переключение тропизма в динамике наблюдения с не R5тр на R5тр произошло у пациента 3, находящегося на АРТ, так как показатель FPR изменился с 5,7 до 49,7. Среди 6 пациентов, инфицированных R5-тропным ВИЧ, несмотря на колебания показателя, уровень FPR остался выше 20, что свидетельствует об отсутствии переключения тропизма ВИЧ.

Для иллюстрации представленных результатов приводим клинические случаи.

Клинический пример 3. Пациент У., 36 лет, диагноз: ВИЧ-инфекция, 3-я клиническая стадия (CD4 – 365 кл/мкл), очаговый туберкулез верхней доли правого легкого (04.2015). Хронический гепатит С умеренной активности. Состоит на учете с 2007 г., ПИН, инфицирован R4-тропным типом вируса. Индекс FPR при первом исследовании в 2011 г. был 17, уровень ВН – 1800 коп/мл, CD4+Т-лимфоциты – 222 кл/мкл. В дальнейшем отказывался от назначенной АРТ, находился в МЛС, и ко времени проведения второго исследования в мае 2013 г. отмечено значительное прогрессирование заболевания: уровень ВН – 850000 коп/мл, CD4+Т-лимфоциты – 55 кл/мкл. Показатель FPR снизился до 0,1, что говорит о формировании «чистого» X4-тропного варианта ВИЧ. В ноябре 2013 г. начата АРТ по схеме абакавир/ламивудин/зидовудин, однако приверженность к терапии была невысокой. В начале 2014 г. на фоне дальнейшего прогрессирования заболевания отмечено снижение уровня CD4+Т-лимфоцитов до 7 кл/мкл, схема была заменена на зидовудин/ламивудин, лопинавир/ритонавир. В настоящее время пациент находится на заместительной терапии метадоном. После проведенной смены терапии отмечено улучшение лабораторных показателей – снижение ВН до <116, повышение CD4 Т-лимфоцитов до 365 кл/мкл.

Клинический пример 4. Пациентка В., 43 лет, диагноз: ВИЧ-инфекция, 3-я клиническая стадия (CD4 – 574 кл/мкл). Хронический гепатит С в стадии ремиссии, состоит на диспансерном учете в течение 13 лет, путь инфицирования – половой. В 2008 г. проводилось лечение препаратами интерферона-альфа по поводу хронического гепатита С. После лечения до настоящего времени РНК ВГС не выявлялась. В 2011 г. отмечено снижение уровня CD4 клеток до 218 и начата АРТ. Первоначально назначена схема зидовудин/ламивудин+эфаКвир, в связи с плохой переносимостью эфавира в 2011 г. схема была заменена на тенофовир, ламивудин, лопинавир/ритонавир, которую пациентка принимает до настоящего времени. Получен ИО на терапию (подъем уровня CD4 до 574 кл/мкл),

ВО – снижение уровня вирусной нагрузки до неопределяемого (<500 коп/мл), отмечается высокая приверженность к лечению. При первичном определении тропизма в 2010 г. FPR составлял 8,2, что свидетельствовало об инфицировании R4-тропным типом вируса. При повторном определении на фоне проводимой АРТ в 2012 г. отмечено повышение уровня FPR до 17, что указывает на формирование вируса с двойным тропизмом X4/R5 [8, 9].

Таким образом, представленные примеры демонстрируют изменение FPR в динамике ВИЧ-инфекции, при этом снижение показателя ассоциировалось с прогрессированием заболевания, в то время как рост FPR – с положительной динамикой в течение заболевания и ответа на АРТ.

5.3 Частота и причины замен схем АРТ у пациентов, состоящих на диспансерном учете в КДК Гродненской инфекционной больницы

Количество ВИЧ-инфицированных в Республике Беларусь (РБ) продолжает расти. По состоянию на 1 января 2018 г. в стране зарегистрировано 24 686 случаев ВИЧ-инфекции, количество людей, живущих с ВИЧ, составило 19 231, показатель распространенности – 202,3 на 100 тысяч населения. В Гродненской области к этому времени зарегистрировано 1095 случаев, количество людей, живущих с ВИЧ, – 843 (показатель распространенности – 80,5 на 100 тысяч населения) [34].

В течение пожизненной АРТ возникает необходимость замены препаратов в схемах терапии. Основной причиной замены является неэффективность текущей схемы терапии, что проявляется отсутствием вирусологической супрессии (ВС) – наличием определяемого уровня вирусной нагрузки ВИЧ на фоне АРТ, формированием вирусологической неудачи (ВН) лечения [5]. Причины формирования ВН многообразны, к ним относят недостаточную приверженность пациента к терапии, которая связана с психологическими, социальными факторами пациента, наличием тяжелой коморбидной патологии (поражение ЦНС, когнитивные расстройства и т.д.), формированием резистентности вируса к АРП [130, 189].

Важно учитывать значительную долю замен АРП при наличии вирусологической эффективности текущей схемы терапии. К таковым относятся причины, связанные с неблагоприятным взаимодействием препаратов, например при лечении туберкулеза у ВИЧ-инфицированных, необходимости включения препаратов, активных против вируса гепатита В при коинфекции НВВ, модификации схемы при беременности и другие. Увеличение продолжительности жизни пациентов на АРТ, старение ВИЧ-инфицированных пациентов приводит к необходимости терапии возрастной сопутствующей патологии: артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца и атеросклероза сосудов, сахарного диабета и других, что требует модификации схем препаратов в связи с учетом их взаимодействия. Пожизненная терапия приводит к постепенному формированию побочных эффектов терапии: поражению функции почек, остеопорозу, коронарной патологии сердца и других, что также требует замен АРП.

В настоящее время в РБ широко и достаточно длительно используются препараты трех групп: НИОТ, ННИОТ, ИП. Значительно реже используется группа ИИ. Ингибиторы фузии и антагонисты ССR5 в РБ не используются.

Был выполнен ретроспективный анализ медицинских документов ВИЧ-инфицированных пациентов (n=434), состоящих на учете в консультативно-диспансерном кабинете (КДК) УЗ «Гродненская областная клиническая больница», которые получали разные схемы антиретровирусной терапии (АРТ) на 30.12.2017 г. Оценивались причины замен АРП в схемах: вирусологическая неэффективность (ВН) схемы – наличие определяемого уровня вирусной нагрузки ВИЧ (> детектируемого уровня) при проведении АРТ более 6 месяцев, иммунологическая неэффективность (ИН) – отсутствие прироста или снижение содержания CD4+Т-лимфоцитов в течение 6 и более месяцев получения АРТ, нежелательные явления на АРП, коррекция схемы АРТ в силу разных причин. Расчетное количество пациентов, инфицированных R5-тропным вирусом, представлено, исходя из выполненных исследований по определению тропизма ВИЧ у 98 пациентов, проживающих на

территории Гродненской области Республики Беларусь.

Начиная с 2001 г. на 30 декабря 2017 г. разные схемы АРТ были назначены 434 пациентам.

В таблице 5.15 представлена демографическая и клинико-эпидемиологическая характеристика пациентов, включенных в исследование. Пациенты, получающие АРТ, были достаточно молодого возраста, количество мужчин и женщин – приблизительно одинаковое (табл. 5.15). Около 49% пациентов находились на 1-й клинической стадии ВИЧ-инфекции. Среди них СПИД установлен в 24,2% случаев.

Таблица 5.15. – Клиническая характеристика ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих АРТ

<i>Показатель</i>	<i>Пациенты, находящиеся на АРТ, n=434</i>
Возраст, годы, Ме (ИКР)	39,1 (32-45)
Стаж ВИЧ-инфекции, годы, Ме (ИКР)	5,5 (2-8)
Мужчины, n (%)	213 (49%)
Женщины, n (%)	221 (51%)
Длительность АРТ (месяцы), Ме (ИКР)	11 (3-40)
1-я клиническая стадия, n (%)	212 (48,9%)
2-я клиническая стадия, n (%)	36 (8,3%)
3-я клиническая стадия, n (%)	139 (32%)
4-я клиническая стадия, n (%)	47 (10,8%)
СПИД, n (%)	105 (24,2%)
CD 4+Т-лимфоциты (%)	23 (16-32)
CD 4+ Т-лимфоциты (кл/мкл)	397 (230-620)

В таблице 5.16 представлены схемы АРТ, которые получали пациенты на момент проведения анализа в группе. Наиболее распространенными схемами в настоящее время являются схемы, содержащие комбинацию тенофовир/эмтрицитабин/эфавир (TDF/FTC/EFV), которые назначены 44,2% пациентов. Наиболее широко используемый препарат в схемах – эфавир (EFV), который входит в 275 (63,4%) схем АРТ, второй АРП по частоте назначения – TDF, который включен в 242 (55,8%) схемы, третий – FTC: 240 (55,2%) случаев, четвертый – ламивудин (ЗТС), так как входит в схемы лечения 194 (44,7%) пациентов. Препарат азидотимидин (AZT), который продолжительное время был основным компонентом стартовых схем, в настоящее время занимает пятую позицию,

так как его получают 170 (40,3%) пациентов. Схемы с ингибиторами протеазы получают 113 (26,0%) пациентов.

Таблица 5.16. – Схемы АРТ у ВИЧ-инфицированных пациентов

<i>Схема АРТ</i>	<i>Все пациенты, находящиеся на терапии, n=434</i>
AZT+3TC+EFV	77 (17,7%)
AZT+3TC+NVP	18 (4,1%)
ABC+3TC+EFV	5 (1,15%)
ABC+3TC+NVP	6 (1,38%)
ABC+3TC+LPV/r	6 (1,38%)
AZT/3TC+LPV/r	70 (16,1%)
TDF/FTC/EFV	192 (44,2%)
TDF/FTC+LPV/r	35 (8,1%)
TDF/FTC+NVP	13 (2,9%)
TDF+3TC+LPV/r	1 (0,23%)
TDF+3TC+ EFV	1 (0,23%)
AZT/3TC+ ABC	9 (2,07%)
AZT/3TC+ATV/r	1 (0,23%)

Примечания –

- 1) AZT – азидотимидин;
- 2) 3TC – ламивудин;
- 3) TDF – тенофовир;
- 4) FTC – эмтрицитабин;
- 5) LPV/r – лопиновир/ритоновир;
- 6) EFV – эфавир;
- 7) ATV/r – атазановир/ритонавир;
- 8) NVP – невирапин;
- 9) ABC – абакавир

Изменения схем АРТ выполнены у 115 (26,5%) пациентов. В таблице 5.17 представлены данные о частоте изменения препаратов в схемах АРТ в зависимости от «стажа» терапии.

Таблица 5.17. – Распределение ВИЧ-инфицированных пациентов со сменой АРТ в зависимости от продолжения терапии

<i>Пациенты со сменой АРТ</i>	<i>Продолжительность терапии пациентов на АРТ (n=434)</i>				
	<i><1 года, n=105</i>	<i>от 1 до 3 лет, n=133</i>	<i>от 3 до 5 лет, n=80</i>	<i>от 5 до 10 лет, n=113</i>	<i>>10 лет, n=3</i>
Общее количество пациентов, сменивших АРТ, n=115	1 (0,95%)	17 (12,8%)	28 (35%)	66 (58,4%)	3 (100%)
Смена 1 раз, n=71	1 (0,95%)	14 (10,5%)	19 (23,8%)	35 (31%)	2 (66,7%)
Смена 2 раза, n=37	–	3 (2,3%)	9 (11,2%)	25 (22,1%)	–
Смена 3 и более раз, n=7	–	–	–	6 (5,3%)	1 (33,3%)

Как видно из таблицы 5.17, однократные изменения схем относительно общего числа пациентов (n=434), получающих АРТ, были у 16,4% (n=71) [95% ДИ:12,41-21,27] пациентов, двукратные – у 8,5% (n=37) [95% ДИ: 5,74-12,49], у 1,6% (n=7) [95% ДИ: 0,65-3,95] пациентов схемы менялись 3 раза и более. Закономерен рост количества пациентов со сменой препаратов в схемах АРТ с увеличением продолжительности получения АРТ. Так, у пациентов, получающих АРТ более 3 лет (n=196), частота замены препаратов в схемах достигала 49,5% [95%ДИ: 40,72; 58,29]. При этом однократная замена АРП среди них составила 28,6% [95% ДИ: 21,27-37,19], двукратные замены – 17,3% [95% ДИ:11,63-25,08], три и более раз сменили АРП – 3,6% [95% ДИ:1,44-8,56]. Всего у 115 пациентов было 166 замен препаратов в схемах терапии.

Причины, связанные с ВН и ИН текущей схемы терапии, включая случаи замены препаратов в связи с выявлением у пациента резистентности к определенным препаратам по результатам проведенного теста, составили 11,7% [95% ДИ: 8,42-16,16] (у 51 пациента) среди получающих АРТ. В остальных случаях причины изменения схемы АРТ – это нежелательные явления на АРП – 10,1% [95% ДИ: 7,07-14,34] (44 пациента), коррекция схемы в связи с беременностью и наличием сопутствующей патологии – 2,1% [95% ДИ: 0,93-4,58] (9 пациентов), отсутствие препаратов – 5,2% [95% ДИ: 3,19-8,67] (23 пациента). В 3% [95% ДИ: 1,53-5,8] (13) случаях замена проводилась по причине отказа пациентами принимать определенные препараты или коррекция для упрощения режима приема препаратов.

В таблице 5.18 представлены данные о количестве пациентов, сменивших АРП в схеме терапии, а также максимальная длительность терапии до смены, исходя из реальной клинической практики.

Как отражено в таблице 5.18, средняя максимальная длительность терапии до первой смены АРП составила приблизительно 2 года, второй раз – около 3 лет, третий раз – 5 лет.

Таблица 5.18. – Количество ВИЧ-инфицированных пациентов, сменивших АРП в схемах, и максимальная длительность терапии до смены

<i>Количество смен</i>	<i>Число сменивших АРП*</i>	<i>95% ДИ для среднего максимального времени до смены терапии (месяцы)</i>
1	71 (61,74%)	23,2±4,9
2	37 (32,17%)	37,6±7,6
3	7 (6,09%)	60,4±23,3
Всего	115 (100%)	30,1±4,5

Примечание – АРП – антиретровирусный препарат

Вероятность неизменной терапии (отсутствие смен АРП) в зависимости от продолжительности лечения представлена в виде кривых Каплана-Майера для пациентов, однократно и двукратно сменивших АРП в схемах, представлена на рисунке 5.1.

Доверительные интервалы (95%) для медиан кривых Каплана-Майера составляют при однократной смене – 17,1 (11,6; 22,1) месяцев, при двукратной – 28,8 (27; 48,2) месяцев (рис. 5.1). Последнее означает, что для 50% лиц, которым была произведена однократная смена препаратов, замена АРП наступает в промежутках от 11,6 до 22,1 мес. от начала терапии. В то время как для 50% лиц с двукратной сменой – в промежутках от 27 до 48,2 месяца. Медиана третьей смены, согласно методу Каплана-Майера, составляет 56,3 месяца.

Для предсказания времени наступления третьей и четвёртой смены АРП у каждого пациента, у которого была произведена смена АРП, определено время наступления последней смены. Таким образом, была определена максимальная длительность терапии до последней смены препарата для каждого пациента. Построив обобщённую линейную модель с гамма-откликом и логарифмической функцией связи и получив теоретическую зависимость среднего максимального времени до смены АРП как функцию количества смен, аппроксимировали её на количество смен, равное 3 и 4. Таким способом оценили среднее максимальное время до 3-й и 4-й смены препаратов.

На основании имеющихся данных нами была построена модель, в рамках которой средняя максимальная длительность терапии до смены препаратов является функцией количества смен следующего вида: $t(x) = \exp(6.1+0.5 \cdot x) \cdot 12/365$, где x – порядковый номер смены АРП.

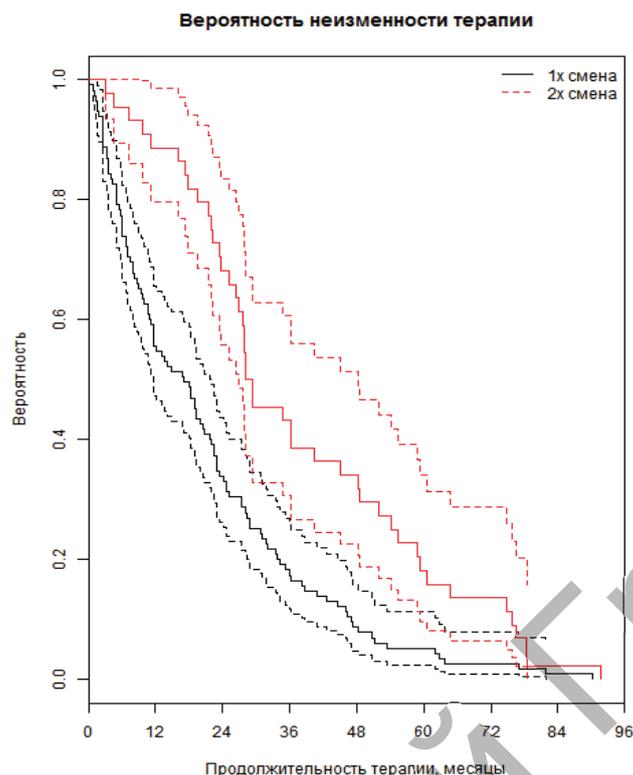


Рисунок 5.1. – Кривые Каплана-Майера – вероятность отсутствия замены АРП для пациентов, однократно и двукратно сменивших терапию (штриховые линии – 95% доверительные интервалы для кривых)

На рисунке 5.2 изображены 95% доверительные интервалы для средних максимальных длительностей до смены терапии и модельная кривая.

Как отображено на рисунке 5.2, модельная кривая удовлетворительно согласуется с теоретическими данными, следовательно, её можно использовать для оценки максимального времени до 3-й и 4-й смен. Для этого в описанную выше формулу подставляем $x=3$ и получаем $t(3) = 60,6$ месяца. Аналогично находим время до 4-й смены: $t(4) = 98,1$ месяца. Таким образом, исходя из анализа реальной практики смен АРП среди 434 ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих терапию, на основании предложенной модели можно прогнозировать, что 1-я смена АРП наступает через 17,1 (11,6; 22,1) мес. от начала АРТ, вторая смена – через 28,8 (27; 48,2) мес., 3-я – через 60,6 мес., 4-я – через 98,1 месяца.

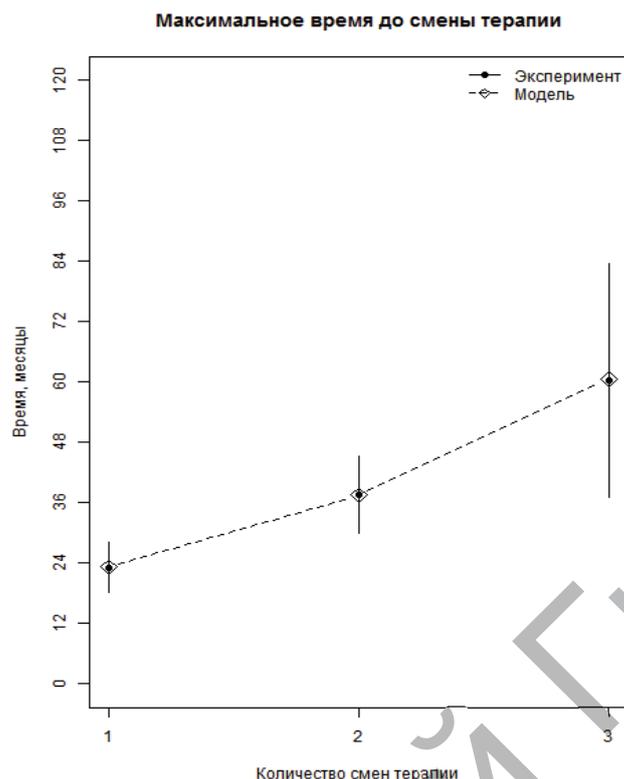


Рисунок 5.2. – 95% доверительные интервалы для средних максимальных длительностей до смены препаратов и модельная кривая

С учетом необходимости введения в клиническую практику новых групп АРТ, не имеющих перекрестной резистентности с длительно используемыми группами НИОТ, ННИОТ и ИП, а также необходимости в замене препаратов в связи с формированием побочных эффектов, рассчитано количество потенциальных кандидатов для назначения антагониста ССR5 – пациентов, инфицированных R5-тропным вирусом. Расчет выполнен исходя из общего количества ВИЧ-инфицированных пациентов (843), состоящих на учете в КДК на 01.01.2018 г.

Расчетное количество пациентов, инфицированных не R5-тропным ВИЧ, на 01.01.2018 г. в Республике Беларусь – 6 865 [95% ДИ: 5173-8769], в Гродненской области составило 301 [95% ДИ: 227-384]. Расчетное количество пациентов, инфицированных R5-тропным ВИЧ, потенциальных кандидатов для назначения антагонистов ССR5 на 01.01.2018 в Республике Беларусь составило 12 366 [95% ДИ: 10 462-14 058], в Гродненской

области – 542 [95% ДИ: 459-616]. В соответствии с клиническим протоколом «Диагностика и лечение пациентов с ВИЧ-инфекцией» от 2017 г. в Беларуси начиная с 01.01.2018 г. вводится универсальный охват антиретровирусной терапией (АРТ) всех людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ). Данный подход соответствует общемировым тенденциям [10]. Так, в 2014 г. UNAIDS поставлена амбициозная глобальная цель, обозначаемая как 90-90-90, в отношении повсеместного охвата и достижения эффективности АРТ у ЛЖВ. Цель преследует достижение верификации ВИЧ-инфекции у 90% ЛЖВ, назначение АРТ 90% ЛЖВ с установленным диагнозом, достижение недетектируемого уровня вирусной нагрузки ВИЧ у 90% ЛЖВ, взятых на АРТ. Такой подход позволит создать возможности для контроля над ВИЧ-инфекцией практически у всех ВИЧ-инфицированных людей, снизить их роль как источников инфекции для неинфицированных лиц, остановить глобальное распространение ВИЧ-инфекции [76, 90].

Большинство широко используемых в настоящее время АРП, таких как ненуклеозидные и нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ и НИОТ), небустированные ритонавиром ингибиторы протеазы (ИП), обладают достаточно низким генетическим барьером к формированию резистентности вируса, условно равным 1. В связи с этим в настоящее время для терапии АРТ назначается трех- и более компонентная схема АРТ, что позволяет снизить риск и скорость формирования резистентности вируса к АРП [116]. При назначении пожизненной АРТ возникает необходимость замены препаратов в схемах терапии. Основная причина замен – неэффективность текущей схемы терапии, что проявляется отсутствием вирусологической супрессии (ВС) – наличием определяемого уровня вирусной нагрузки ВИЧ на фоне АРТ, формированием вирусологической неудачи (ВН) лечения.

В настоящее время в РБ широко и достаточно длительно используются препараты трех групп: НИОТ, ННИОТ, ИП. Значительно реже применяется группа ИИ. Ингибиторы фузии и антагонисты CCR5 в РБ не используются. Антагонист CCR5 в настоящее время является препаратом резерва и, как правило, назначается пациентам, получавшим АРТ и потребовавшим замены схемы в связи с вирусологической неудачей терапии

или формированием побочных эффектов в результате приема других АРП [14].

На основании представленных результатов сделаны выводы:

1. Сравнительный анализ клинико-лабораторных проявлений ВИЧ-инфекции, включая частоту стадии СПИДа, оппортунистических инфекций, показатели CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, вирусной нагрузки ВИЧ, не выявил различий в группах пациентов, инфицированных ВИЧ с разным тропизмом. Так, у пациентов с R5-тропным и не R5-тропным ВИЧ частота 1-й стадии составила 49,2 и 51,4%, 2-й стадии – 12,7 и 11,4%, 3-й стадии – 30,2 и 22,8%, 4-й стадии – 7,9 и 14,2% ($p>0,05$).

2. Эффективность АРТ по вирусологическим и иммунологическим критериям не различалась в зависимости от тропизма ВИЧ в группе наблюдений. У пациентов, инфицированных не R5тр ВИЧ, на фоне АРТ отмечено увеличение показателя FPR, что ассоциировалась с улучшением иммунологических и вирусологических показателей.

3. Наличие у пациента не R5тр ВИЧ позволяет прогнозировать неблагоприятный исход ВИЧ-инфекции при отсутствии АРТ, так как отсутствие терапии у таких пациентов ассоциируется с прогрессированием заболевания, снижением показателя FPR, высокой частотой летальных исходов [19].

4. Введение универсального доступа к АРТ ВИЧ-инфицированным пациентам в РБ, увеличение продолжительности их жизни на АРТ позволяет прогнозировать рост частоты смен АРП с увеличением продолжительности сроков получения терапии, так как у пациентов, находящихся на терапии более трех лет, частота замены препаратов в схемах достигала 49,5% [95% ДИ: 40,72; 58,29]. Прогнозируется, что 1-я смена АРП наступает через 17,1(11,6; 22,1) мес. от начала АРТ у 16,4% [95% ДИ: 12,41-21,27], вторая смена – через 28,8 (27; 48,2) мес. у 8,5% [95% ДИ: 5,74-12,49], 3-я – через 60,6 мес. у 1,6% [95%ДИ: 0,65-3,95] пациентов, получающих терапию. Замены препаратов в схемах терапии были связаны с ВН и ИН АРТ, составившие 11,7 % [95% ДИ: 8,42-16,16] случаев, нежелательными явлениями на АРП – 10,1% [95% ДИ: 7,07-14,34] случаев, коррекция схемы в связи с беременностью и наличием сопутствующей патологии – в 2,1%

[95% ДИ: 0,93-4,58], отсутствие препаратов – 5,2% [95% ДИ: 3,19-8,67]. Это обосновывает необходимость постепенного внедрения в клиническую практику новых групп АРП, которые характеризуются высокой эффективностью и не имеют перекрестной резистентности с длительно используемыми АРП.

5. Расчетное количество пациентов, инфицированных R5-тропным ВИЧ, потенциальных кандидатов для назначения антагонистов CCR5 на 01.01.2018 г. в Республике Беларусь составило 12 366 [95%ДИ: 10 462-14 058], в Гродненской области – 542 [95% ДИ: 459-616].

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Список использованных источников

1. Аллельные варианты генов IL-4, IL-10 и TNF α при ВИЧ-инфекции / М. В. Смольникова [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 29-32.
2. Анализ делеции 32 пн в гене рецептора хемокинов CCR5 у лиц, инфицированных ВИЧ-1 из г. Москвы / М. И. Шадрина [и др.] // Генетика. – 2000. – Т. 36, № 5. – С. 718-720.
3. Анализ полиморфных вариантов генов цитокинов у пациентов с ВИЧ-инфекцией / Н. А. Сухаленцева [и др.] // Мед. иммунология. – 2011. – № 1. – С. 79-82.
4. Барлетт, Д. Клинические аспекты ВИЧ-инфекции. 2009-2010 : [пер. с англ.] / Д. Барлетт, Д. Галлант, П. Фам. – Москва : 3. Валент, 2010. – 495 с.
5. Бобкова, М. Р. Лабораторные методы дифференциальной диагностики острой, ранней и текущей ВИЧ-инфекции / М. Р. Бобкова, И. А. Лаповок // Клин. лаборатор. диагностика. – 2007. – № 12. – С. 25-32.
6. Бобкова, М. Р. Патофизиология ВИЧ-инфекции / М. Р. Бобкова // Вирус иммунодефицита человека – медицина / Н. А. Беляков ; под ред. Н. А. Белякова, А. Г. Рахмановой. – 2-е изд. – Санкт-Петербург : Балт. мед. образоват. центр, 2011. – Гл. 2. – С. 39-62.
7. Бондарь, С. Н. Социальный статус ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих ВААРТ, и удержание на терапии в течение 12 месяцев после начала лечения / С. Н. Бондарь, М. С. Долбик, А. А. Ключарева // ARS medica = Искусство медицины : инфекц. болезни. – 2010. – № 14. – С. 41-42.
8. ВИЧ-инфекция и СПИД / [Т. Н. Ермак [и др.] ; гл. ред. В. В. Покровский ; Федер. науч.-метод. центр по профилактике и борьбе со СПИДом. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 192 с.
9. Вторичные заболевания у больных туберкулезом на поздних стадиях ВИЧ-инфекции / И. Ю. Бабаева [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – № 3. – С. 42-46.
10. Генотипы ВГС и субтипы ВИЧ у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС в Гродненском регионе Республики Беларусь

/ Н. В. Матиевская [и др.] // Мед. панорама. – 2013. – № 1. – С. 9-15.

11. Два варианта субтипа А ВИЧ-1 в Пермской области / Ю. И. Аликина [и др.] // Эпидемиология и инфекц. болезни. – 2006. – № 1. – С. 39-43.

12. Казеннова, Е. В. Подтипы вируса иммунодефицита человека 1 типа: классификация, происхождение и распространение в Европе / Е. В. Казеннова, А. Ф. Бобков // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2003. – № 1. – С. 90-96.

13. Козорез, Е. И. Клинические особенности ВИЧ-инфекции и эффективность антиретровирусной терапии : автореф. дис. канд. мед. наук : 14.00.10 / Е. И. Козорез ; Бел. гос. мед. ун-т. – Минск, 2010. – 24 с.

14. Кравченко, А. В. Применение препарата маравирок – первого антагониста рецепторов CCR5 – в схемах терапии ВИЧ-инфекции / А. В. Кравченко // Терапевт. архив. – 2013. – Т. 85, № 11. – С. 125-129.

15. Макашева, Е. В. Клинико-лабораторные особенности течения ВИЧ-инфекции, сочетанной с туберкулезом : автореф. дисс. канд. мед. наук : 14.01.09 / Е.В. Макашева; Науч.-исслед. ин-т дет. инфекций Федер. мед.-биол. агентства. – СПб., 2010. – 22 с.

16. Матиевская, Н. В. Воспалительный синдром восстановления иммунитета у ВИЧ-инфицированных пациентов: факторы риска, клинические проявления, исходы, профилактика / Н. В. Матиевская // Вестн. Балт. федер. ун-та им. И. Канта. – 2012. – № 7. – С. 44-51.

17. Матиевская, Н. В. Ко-инфекция ВИЧ/ВГС: этиология, эпидемиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение: монография / Н. В. Матиевская ; ГрГМУ. – Гродно: ГрГМУ, 2013. – 352 с.

18. Медико-социальные аспекты сочетанного течения ВИЧ-инфекции и хронических вирусных инфекций / Е. А. Иоанниди [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2010. – № 1. – С. 70-74.

19. Метод прогнозирования неблагоприятного течения ВИЧ-инфекции: инструкция по применению № 001–0118: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 16 марта 2018 г. / Министерство здравоохранения Респ. Беларусь, Учреждение-разработчик УО «Гродн. гос. мед. ун-т»; сост.: д. м. н., доцент Н. В. Матиевская, к. м. нн. А. Е. Гончаров, И. О. Токунова. – Гродно : ГрГМУ, 2017 – 4 с.

20. Некоторые тенденции в развитии эпидемии ВИЧ/СПИД в Республике Беларусь / Н. Д. Коломиец [и др.] // Медицина. – 2014. –

№ 1 (84). – С. 30-34.

21. Носик, М. Н. Хемокиновые рецепторы ВИЧ-1 и их роль в патогенезе СПИДа / М. Н. Носик, Г. Р. Мацевич // Вопр. вирусологии. – 2002. – Т. 47, № 1. – С. 4-9.

22. Определение генетических полиморфизмов CCR5-Δ32 и CCR2-64I у доноров и ВИЧ-1-инфицированных больных / О. А. Глинщикова [и др.] // Гематология и трансфузиология – 2014. – Т. 59, S1. – С. 39.

23. Особенности клинического течения и лечение ВИЧ-ассоциированного туберкулеза легких / П. С. Кривонос [и др.] // Пульмонология и фтизиатрия. – Минск, 2003. – С. 294–305.

24. Первый опыт применения стандартизированной генотипической методики определения тропизма ВИЧ / А. Э. Лопатухин [и др.] // Клин. лаборатор. диагностика. – 2013. – № 6. – С. 46-48.

25. Петрович, И. В. Оппортунистические инфекции у ВИЧ-инфицированных пациентов: пособие для практ. врачей / И. В. Петрович, Н. В. Голобородько. – Минск, 2004. – 24 с.

26. Покровская, А. В. Факторы, влияющие на течение ВИЧ-инфекции / А. В. Покровская // Эпидемиология и инфекц. болезни. – 2010. – № 3. – С. 60-64.

27. Полиморфизм гена CCR5 и резистентность к инфицированию ВИЧ. Молекулярно-генетическое обследование общественного регистра пуповинной крови / И. А. Пирожков [и др.] // Вестн. гематологии. – 2015. – Т. 11, № 2. – С. 23-24.

28. Популяционные особенности частот мутации гена хемокинового рецептора CCR5, определяющего чувствительность к вирусу СПИДа / М. В. Асеев [и др.] // Генетика. – 1997. – Т. 33, № 3. – С. 1724-1726.

29. Пузырева, Л. В. Генетический полиморфизм цитокинов: прошлое и будущее / Л. В. Пузырева, А. Д. Сафонов // Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т. 6, № 2. – С. 103-108.

30. Развитие эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь / А.В. Русанович [и др.] // Медицина. – 2011. – № 1. – С. 60-63.

31. Распределение аллелей генов CCR5, CCR2 и SDF1, ассоциированных с устойчивостью к ВИЧ-инфекции, в Российских популяциях / И. А. Кофиади [и др.] // Докл. АН. – 2007. – Т. 415, № 6. – С. 842-845.

32. Точность определения субтипа ВИЧ-1 на основании анализа нуклеотидных последовательностей V3 петли гена gp 120 / М. Ю. Дмитриюкова [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2015. – Т. 7, № 1. – С. 40-44.

33. Характеристика вариантов вируса иммунодефицита человека, циркулирующих на территории Российской Федерации, с различной тропностью к корецепторам в помощь практикующему врачу / Е. В. Лысенко [и др.] // Инфекц. болезни: новости, мнения, обучение. – 2015. – № 2. – С. 77-81.

34. Эпидситуация по ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь на 1 января 2018 года [Электронный ресурс] // Ассоциация некоммерческих организаций по противодействию эпидемии ВИЧ/СПИДа «БелСеть антиСПИД»: сайт о деятельности ВИЧ-сервис. орг. по проблеме ВИЧ/СПИДа в Респ. Беларусь. – Режим доступа: <https://www.belaid.net/epidsituaciya-po-vichspid-v-belarusi/>. – Дата доступа: 15.02.2018.

35. Ярилин, А. А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии / А. А. Ярилин // Иммунология. – 1998. – № 5. – С. 7-13.

36. A double-blind, placebo-controlled trial of maraviroc in treatment experienced patients infected with non-CCR5- tropic HIV-1: 24-week results [Electronic resource] / M. Saag [et al.] // J. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 11. – Mode of access: doi:10.1086/598965. – Date of access: 06.09.2017.

37. A genotypic HIV-1 proviral DNA coreceptor tropism assay: characterization in viremic subjects [Electronic resource] / J. Brown [et al.] // AIDS Res. Ther. – 2014. – Mode of access: <https://aidsrestherapy.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-6405-11-14>. – Date of access: 05.10.2017.

38. A genotypic test for HIV-1 tropism combining sanger sequencing with ultradeep sequencing predicts virologic response in treatment-experienced patients [Electronic resource] / R. M. Kagan [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7 (9). – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0046334>. – Date of access: 05.11.2017.

39. A survey for 32 nucleotide deletion in the CCR-5 chemokine receptor gene (deltacer-5) conferring resistance to human immunodeficiency virus type 1 in different ethnic groups and in chimpanzees / A. A. Voevodin [et al.] // J. Med. Virol. – 1998. – Vol. 55. – P. 147-151.

40. Activation and Cell Cycle Antigens in CD4+ and CD8+ T Cells Correlate with Plasma Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) RNA Level in HIV-1 Infection / J. M. Orendi [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 1998. – Vol. 178, № 5. – P. 1279-1287.

41. Activation and coreceptor expression of T lymphocytes induced by highly active antiretroviral therapy in Chinese HIV/AIDS patients / Z. N. Zhang [et al.] // *Chin. Med. J.* – 2006. – № 119 (23). – P. 1966-1971.

42. Adamson, C. S. Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation / C. S. Adamson, E. O. Freed // *Adv. Pharmacol.* – 2007. – № 55. – P. 347-387.

43. Affinofile profiling: how efficiency of CD4/CCR5 usage impacts the biological and pathogenic phenotype of HIV / K. Chikere [et al.] // *Virology.* – 2013. – Vol. 435, № 1. – P. 81-91.

44. Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry / T. Dragic [et al.] // *J. Virol.* – 1998. – Vol. 72 (1). – P. 279-285.

45. An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function / T. Dragic [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2001. – Vol. 82. – P. 1807-1814.

46. Analysis of the mechanism by which the small-molecule CCR5 antagonists SCH-351125 and SCH-350581 inhibit Human Immunodeficiency Virus type 1 entry / F. Tsamis [et al.] // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77, № 9. – P. 5201-52018.

47. Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents [Electronic resource] / Developed by the DHHS Panel on, A Working Group of the Office of AIDS Res. Advisory Council. – 120 p. – Mode of access: <https://aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL05042006050.pdf>. – Date of access: 20.10.2017.

48. Association between presence of HLA-B*5701, HLA DE7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir / S. Mallal [et al.] // *Lancet.* – 2002. – Vol. 2, № 359 (9308). – P. 727-732.

49. Beishuizen, S. J. Immune reconstitution inflammatory syndrome: immunopathogenesis, risk factors, diagnosis, treatment and prevention / S. J. Beishuizen, S. E. Geerlings // *Neth. J. Med.* – 2009. – Vol. 67, № 10. – P. 327-331.

50. Berger, E. A. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism, and disease / E. A. Berger, P. M. Murphy,

J. M. Farber // *Annu. Rev. Immunol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 657-700.

51. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage / T. Lengauer [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 25, № 12. – P. 1407-1410.

52. Biomarkers of HIV Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome / S. Bonham [et al.] // *Biomark. Med.* – 2008. – № 2 (4). – P. 349-361.

53. Braun, P. Phenotypic assays for the determination of coreceptor tropism in HIV-1 infected individuals / P. Braun, F. Wiesman // *Eur. J. Med. Res.* – 2007. – № 12 (9). – P. 463-472.

54. Caligiuri, M. A. Human natural killer cells / M. A. Caligiuri // *Blood.* – 2008. – Vol. 112. – P. 461-469.

55. Cannon, P. Chemokine receptor 5 knockout strategies / P. Cannon, C. June // *Curr. Opin. HIV AIDS.* – 2011. – № 6 (1). – P. 74-79.

56. CC CKRS-A RANTES, MIP-1- α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1 / G. Alkhatib [et al.] // *Science.* – 1996. – Vol. 272 (5270). – P. 1955-1958.

57. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia / J. He [et al.] // *Nature.* – 1997. – Vol. 385 (6617). – P. 645-649.

58. CCR5 chemokine (C-C motif) receptor 5 (gene/pseudogene) [Homo sapiens (human)] [Electronic resource] // HGNC:HGNC:1606. – Mode of access: Gene ID: 1234, updated on 11-Feb-2018. // <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=1234>. – Date of access: 12.02.2018.

59. CCR5 interaction with HIV-1 Env contributes to Env-induced depletion of CD4 T cells in vitro and in vivo [Electronic resource] / Li-C. Tsao [et al.] // *Retrovirology.* – 2016. – Vol. 13. – P. 22. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27026376>. – Date of access: 08.12.2016.

60. CD25⁺ FoxP3⁺ Memory CD4 T Cells Are Frequent Targets of HIV Infection In Vivo [Electronic resource] / M. Chachage [et al.] // *J. Virol.* – 2016. – Vol. 90. – Mode of access: <http://jvi.asm.org/content/90/20/8954.full.pdf+html>. – Date of access: 11.09.2017.

61. CD4⁺ Count-Guided Interruption of Antiretroviral Treatment / W. M. El-Sadr [et al.] ; The Strategies for Management of Antiretroviral Ther. (SMART), Study Group // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 352, № 22. – P. 2283-2296.

62. Chakrabarti, L. A. Immune mechanisms of HIV control / L. A. Chakrabarti, V. Simon // *Curr. Opin. Immunol.* – 2010. – № 22 (4). – P. 488-496.

63. Changes in and discrepancies between cell tropisms and coreceptor uses of human immunodeficiency virus type 1 induced by single point mutations at the V3 tip of the env protein / S. Shimizu [et al.] // *Virology*. – 1999. – Vol. 259, № 2. – P. 324-333.
64. Chevalier, M. F. The split personality of regulatory T cells in HIV infection / M. F. Chevalier, L. Weiss // *Blood*. – 2013. – Vol. 121, № 1. – P. 29-37.
65. Clementi, M. Human immunodeficiency virus type 1 fitness and tropism: concept, quantification, and clinical relevance / M. Clementi, A. Lazzarin // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2010. – № 16. – P. 1532-1538.
66. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES / C. Combadiere [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 1996. – Vol. 60 (1). – P. 147-152.
67. Comparison of Human Immunodeficiency virus type 1 tropism profiles in clinical samples by the Trofile and MT-2 Assays / E. Coakley [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53, № 11. – P. 4686-4693.
68. CXCR4 sequences involved in coreceptor determination of human immunodeficiency virus type-1 tropism. Unmasking of activity with M-tropic Env glycoproteins / Z. X. Wang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273 (24). – P. 15007-15015.
69. CXCR4-CCR5: A couple modulating Tcell functions / R. L. Contento [et al.] // *PNAS*. – 2008. – Vol. 105, № 29. – P. 10101-10106.
70. Cytokine and chemokine gene polymorphisms among ethnically diverse North Americans with HIV-1 infection [Electronic resource] / C. Wang [et al.] // *J. AIDS*. – Mode of access: http://journals.lww.com/jaids/Fulltext/2004/04150/Cytokine_and_Chemokine_Gene_Polymorphisms_Among.2.aspx. – Date of access: 01.09.2017.
71. Polymorphisms_Among.2.aspx. – Date of access: 01.09.2017.
72. Cytokines – their pathogenic and therapeutic role in chronic viral hepatitis / J. R. Larrubia [et al.] // *Rev. Esp. Enferm. Dig. (Madrid)*. – 2009. – Vol. 101, № 5. – P. 343-351.
73. Dando, T. M. Abacavir plus lamivudine: a review of their combined use in the management of HIV infection / T. M. Dando, L. J. Scott // *Drugs*. – 2005. – Vol. 65 (2). – P. 285-302.
74. Deeks, S.G. Duration and predictors of CD4 T-cell gains in patients who continue combination therapy despite detectable plasma viremia / S.G.Deeks, J.D. Barbour, R.M.Grant R.M. // *AIDS*. – 2002. – Vol. 16. – P. 201-207

75. Deep Sequencing to Infer HIV-1 Co-Receptor Usage: Application to Three Clinical Trials of Maraviroc in Treatment-Experienced Patients / L. C. Swenson [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 203 (2). – P. 237-245.

76. Deep V3 Sequencing for HIV Type 1 Tropism in Treatment-Naive Patients: A Reanalysis of the MERIT Trial of Maraviroc / L. C. Swenson [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 53 (7). – P. 732-742.

77. Definition of advanced age in HIV infection: looking for an age cut-off / J.R. Blanco [et al.] // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 2012. – Vol. 28, N 9. – P. 1000-1006.

78. Dependence on the CCR5 coreceptor for viral replication explains the lack of rebound of CXCR4-predicted HIV variants in the Berlin patient / J. Symons [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 15, № 4. – P. 596.

79. Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay / V. Trouplin [et al.] // *J. Virol.* – 2001. – № 75 (1). – P. 251-259.

80. Determination of HIV-1 tropism from proviral HIV-1 DNA in patients with suppressed plasma HIV-1 RNA using population based-and deep-sequencing: impact of X4-HIV variants on virologic responses to maraviroc : Workshop on HIV and Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies, June 5-9 2012, Melia Sitges, Sitges, Spain [Electronic resource] / P. Bellecave [et al.] // *Antivir. Ther.* – 2012. – Vol. 17, suppl. 1. – P. A53. – Mode of access: <https://www.intmedpress.com/serveFile.cfm?sUID=8ed08ff3-8b0b-4cda-b481-30a670282653>. – Date of access: 23.02.2018.

81. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism / J. M. Whitcomb [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2007. – № 51 (2). – P. 566-575.

82. Discordant responses on starting highly active antiretroviral therapy: suboptimal CD4 increases despite early viral suppression in the UK Collaborativ HIV Cohort (UK CHIC) Study / Gilson R.J [et al.] // *HIV Med.* – 2010. – Vol. 11. – P. 152–160.

83. Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist in HIV-1-infected patients [Electronic resource] / G. Fätkenheuer [et al.] // *Nat. Med.* – 2005. – Vol. 11. – Mode of access: [doi:10.1038/nm1319](https://doi.org/10.1038/nm1319). – Date of access: 01.09.2017.

84. Efficient clinical scale gene modification via zinc finger nuclease-targeted disruption of the HIV co-receptor CCR5 / D. A. Maier [et al.] // *Hum. Gene Ther.* – 2013. – № 24 (3). – P. 245-258.

85. Engineering HIV-1-resistant T-cells from short-hairpin RNA-expressing hematopoietic stem/progenitor cells in humanized BLT mice [Electronic resource] / G.-E. E. Ringpis [et al.] // *PLoS ONE.* – 2012. – № 7 (12). – P. e53492. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0053492>. – Date of access: 03.11.2017.

86. Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection / G. J. Moyle [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 191, № 6. – P. 866-872.

87. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing / L. P. Vandekerckhove [et al.] ; Eur. Consensus Group on clin. management of tropism testing // *Lancet Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 11, № 5. – P. 394-407.

88. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 stem cell / K. Alters [et al.] // *Blood.* – 2011. – Vol. 117, № 10. – P. 2791-2799.

89. Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals / M. A. Ostrowski [et al.] // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161, iss. 6. – P. 3195-3201.

90. Foeglein, Á. Determination of HIV-1 coreceptor tropism in clinical practice [Electronic resource] / A. Foeglein, H. Walter // *Eur. J. Med. Res.* – 2007. – № 12. – P. 473-482. – Mode of access: www.bhiva.org/documents/.../Tropism/HIV-1Tropism.doc. – Date of access: 03.11.2017.

91. French, M. A. Immune restoration disease after antiretroviral therapy / M. A. French, P. Price, S. F. Stone // *AIDS.* – 2004. – № 18 (2). – P. 1615-1627.

92. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV / P. Tebas [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2014. – Vol. 370, № 10. – P. 901-910.

93. Genetic and phenotypic analyses of human immunodeficiency virus type 1 escape from a small-molecule CCR5 inhibitor [Electronic resource] / S. E. Kuhmann [et al.] // *J. Virol.* – 2004. – Vol. 78 (6). – P. 2790-2807. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC353740/>. – Date of access: 06.09.2017.

94. Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection

/ J.F. Salazar-Gonzalez [et al.] // J. Exp. Med. – 2009. – № 206. – P. 1273-1289.

95. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion of the CKR5 structural gene / M. Dean [et al.] // Science. – 1996. – Vol. 273 (5283). – P. 1856-1862.

96. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10 [Electronic resource] / H. D. Shin [et al.] // PNAS USA. – 2000. – Vol. 97, № 26. – P. 14467-14472. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121048>. – Date of access: 09.09.2017.

97. Genotypic determination of HIV tropism – Clinical and methodological recommendations to guide the therapeutic use of CCR5 antagonists / E. Poveda [et al.] // AIDS Rev. – 2010. – Vol. 12, № 3. – P. 135-148.

98. Genotypic HIV-coreceptor tropism testing with geno2pheno[coreceptor]: Differences in prediction depending on HIV-1 subtype / M. Obermeier [et al.] // 10th European Meeting on HIV & Hepatitis Treatment Strategies & Antiviral Drug Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance, Barcelona, March 28 to 30, 2012. – Barcelona, Spain, 2012. – P. 24.

99. Genovese, L. Cell-Mediated Immunity in Elite Controllers Naturally Controlling HIV Viral Load [Electronic resource] / L. Genovese, M. Nebuloni, M. Alfano // Front. Immunol. – 2013. – Vol. 4. – P. 86. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3620550>. – Date of access: 08.09.2017.

100. Gilliam, B. L. Clinical use of CCR5 inhibitors in HIV and beyond [Electronic resource] / B. L. Gilliam, D. J. Riedel, R. R. Redfield // J. Transl. Med. – 2011. – Vol. 9, suppl. 1. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21284908>. – Date of access: 23.10.2017.

101. Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naive individuals with hiv after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: a global collaborative study and meta-regression analysis [Electronic resource] / R. K. Gupta [et al.] // Lancet. – 2012. – Vol. 380, suppl. 9849. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22828485>. – Date of access: 3.11.2017.

102. Guidelines for Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents : Recommendations from CDC / The Nat. Inst. of Health, and the HIV Med. Assoc. of the Infect. Dis.

Soci. of Am. [Electronic resource] // *Morb. Mortal. Wkly. Rep : Recommendations and Rep.* – 2009. – Vol. 58, № RR-4. – 216 p. – Mode of access: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5804.pdf>. – Date of access: 01.10.2017.

103. Hammer, S. Management of Newly Diagnosed HIV Infection / S. Hammer // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – № 353. – P. 1702-1710.

104. High CD4(+) T-cell surface CXCR4 density as a risk factor for R5 to X4 switch in the course of HIV-1 infection / Y. L. Lin [et al.] // *J. AIDS.* – 2010. – Vol. 55 (5). – P. 529-535.

105. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor / Y. Feng [et al.] // *Science.* – 1996. – Vol. 272. – P. 872-877.

106. HIV-1 entry into CD4(+) cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5/ T. Dragic [et al.] // *Nature.* – 1996. – Vol. 381. – P. 667-673.

107. HIV-1 escape to CCR5 coreceptor antagonism through selection of CXCR4-using variants in vitro / G. Moncunill [et al.] // *AIDS.* – 2008. – № 22. – P. 23-31.

108. Homozygous defect in HIV-1 co-receptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection / R. Liu [et al.] // *Cell.* – 1996. – Vol. 86. – P. 367-377.

109. Hosmalin, A. Type I interferon production in HIV-infected patients / A. Hosmalin, P. Lebon // *J. Leukoc. Biol.* – 2006. – № 80. – P. 984-993.

110. How HIV changes its tropism: evolution and adaptation? / D. E Mosier [et al.] // *Curr. Opin. HIV AIDS.* – 2009. – Vol. 4, № 2. – P. 125-130.

111. Human Immunodeficiency Gp120 modulates the biology of human hepatic stellate cells: a link between HIV infection and liver fibrogenesis / R. Bruno [et al.] // *Gut.* – 2010. – № 59. – P. 513-520.

112. Human immunodeficiency virus type 1 biological variation and coreceptor use: from concept to clinical significance / E. M. Fenyo [et al.] // *J. Intern. Med.* – 2011. – Vol. 270, iss, 6. – P. 520-531.

113. Human Immunodeficiency Virus-Induced Apoptosis of Human Hepatocytes via CXCR4 / S. R. Vlahakis [et al.] // *J. Inf. Dis.* – 2003. – Vol. 188. – P. 1455-1460.

114. Hütter, G. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with human immunodeficiency virus: the experiences of more than 25 years / G. Hütter, A. Zaia // *Clin. Exp. Immunol.* – 2011. –

№ 163. – P. 284-295.

115. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 / H. K. Deng [et al.] // *Nature*. – 1996. – Vol. 381. – P. 661-666.

116. Identification of RANTES, MIP-1 α and MIP β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells [Electronic resource] / F. Cocchi [et al.] // *Science*. – 1995. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8525373>. – Date of access: 22.08.2017.

117. Impact of combination antiretroviral therapy on cerebrospinal fluid HIV RNA and neurocognitive performance/C. M. Marra [et al.] // *AIDS*. – 2009. – Vol. 23, № 11. – P. 1359–1366.

118. Improvement in the determination of HIV-1 tropism using the V3 gene sequence and a combination of bioinformatic tools / N. Chueca [et al.] // *J. Med. Virol.* – 2009. – Vol. 81. – P. 763-767.

119. Incidence and risk factors for immune reconstitution inflammatory syndrome during highly active antiretroviral therapy / S. A. Shelburne [et al.] // *AIDS*. – 2005. – Vol. 19, № 4. – P. 399-406.

120. Increased neutralization sensitivity of recently emerged CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 strains compared to coexisting CCR5-using variants from the same patient / E. M. Bunnik [et al.] // *J. Virol.* – 2007. – № 81. – P. 525-531.

121. Infection by a Human Immunodeficiency Virus with Atypical Coreceptor Tropism / C. Jiang [et al.] // *J. Virol.* – 2011. – Vol. 10. – P. 98-102.

122. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5—studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk / P. A. Zimmerman [et al.] // *Mol. Med.* – 1997. – Vol. 3. – P. 23-36.

123. Inhibition of HIV-1 replication with stable RNAi-mediated knockdown of autophagy factors / J. M. Eekels [et al.] // *Virol. J.* – 2012. – Vol. 9. – P. 69-80.

124. Initial increase in blood CD4+ lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues / R. P. Bucy [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1999. – № 103. – P. 1391-1398.

125. Jones, R. The role of receptors in the HIV-1 entry process / R. Jones, M. Nelson // *Eur. J. Med. Res.* – 2007. – № 12. – P. 391-396.

126. Lama, J. The physiological relevance of CD4 receptor down-modulation during HIV infection / J. Lama // *Curr. HIV Res.* – 2003. – Vol. 1 (2). – P. 167-184.

127. Lawn, S. D. Contribution of Immune Activation to the Pathogenesis and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection / S. D. Lawn, S. T. Butera, T. M. Folks // *Clinical microbiology reviews*. – 2001. – № 14 (4). – P. 753-777.

128. Levy, J. A. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges / J. A. Levy // *AIDS*. – 2009. – Vol. 23, № 2. – P. 147-160.

129. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation / G. Hütter [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol. 360. – P. 692-698.

130. Low Expression of Activation and Inhibitory Molecules on NK Cells and CD4+ T Cells Is Associated with Viral Control / N. A. Taborda [et al.] // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. – 2015. – Vol. 31, № 6. – P. 636-640.

131. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity [Electronic resource] / P. Dorr [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49. – Mode of access: doi:10.1128/AAC.49.11.4721-4732.2005. – Date of access: 22.08.2017.

132. Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection [Electronic resource] / R. M. Gulick [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2008. – Vol. 359. – Mode of access: doi:10.1056/NEJMoa0803152. – Date of access: 02.09.2017.

133. Maraviroc versus efavirenz, both in combination with zidovudine/lamivudine, for the treatment of antiretroviral-naïve subjects with CCR5-tropic HIV-1 [Electronic resource] / D. A. Cooper [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 201. – Mode of access: doi:10.1086/650697. – Date of access: 06.09.2017.

134. May, W.L. A SAS macro for constructing simultaneous confidence intervals for multinomial proportions / W.L. May, W.D. Johnson // *Comput Methods Programs Biomed.* – 1997. – Vol. 53, № 3. – P. 153-162.

135. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene / M. Samson [et al.] // *Biochemistry*. – 1996. – Vol. 35. – P. 3362-3367.

136. Mosier, D. E. Changes in HIV-1 tropism: clinical and prognostic consequences / D. E. Mosier // *Eur. J. Med. Res.* – 2007. – № 12 (9). – P. 371-374.

137. Mutations in the coreceptor binding region of the HIV-1 envelope confer resistance to the CCR5 inhibitor SCH-C (SCH 351125) / W. Huang [et al.] // *Antivir. Ther.* – 2007. – № 12. – P. 134.

138. Newcombe, R.G. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods / R.G. Newcombe // *Stat Med.* – 1998. – Vol. 17, № 8. – P. 857-872.

139. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization / G. Pollakis [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276 (16). – P. 13433-13441.

140. Oral lesions and immune reconstitution syndrome in HIV+/AIDS patients receiving highly active antiretroviral therapy. Epidemiological evidence [Electronic resource] / L. A. Gaitan Cepeda [et al.] // *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.* – 2008. – № 13 (2). – P. 85-93. – Mode of access: http://www.medicinaoral.com/pubmed/medoralv13_i2_p85.pdf. – Date of access: 06.09.2017.

141. Parameters Influencing Baseline HIV-1 Genotypic Tropism Testing Related to Clinical Outcome in Patients on Maraviroc [Electronic resource] / S. Saleta [et al.] // *PLOS ONE.* – 2015. – Vol. 10, № 5. – P. e0125502. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0125502>. – Date of access: 11.09.2017.

142. Partial inhibition of human immunodeficiency virus replication by type I interferons: impact of cell-to-cell viral transfer / D. Vendrame [et al.] // *J. Virol.* – 2009. – Vol. 83, № 20. – P. 10527-10537.

143. Performance of a population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters / M. Mendoza [et al.] // *J. AIDS.* – 2008. – № 48. – P. 241-244.

144. Performance of Genotypic Algorithms for Predicting HIV-1 Tropism Measured against the Enhanced-Sensitivity Trofile / V. Sánchez [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48, № 11. – P. 4135-4139.

145. Perspective research highlights at the Aaron Diamond AIDS Research Center the beta-chemokines, HIV type 1 second receptors, and exposed uninfected persons / W. A. Paxton [et al.] // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 1996. – Vol. 12. – P. 1203-1207.

146. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of CCR5 receptor occupancy by maraviroc in healthy subjects and HIV positive patients [Electronic resource] / M. C. Rosario [et al.] // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 65. – Mode of access: doi:10.1111/j.1365-2125.2008.03140.x. – Date of access: 01.09.2017.

147. Phase 2 Study of the Safety and Tolerability of Maraviroc Containing Regimens to Prevent HIV Infection in Men Who Have Sex With Men (HPTN 069/ACTG A5305) [Electronic resource] / R. M. Gulick [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2017. – Vol. 215. – P. 238-246. – Mode of access: <https://academic.oup.com/jid/article-pdf/215/2/.../jiw525.pdf>. – Date of access: 06.01.2018.

148. Phenotypic and genotypic comparisons of CCR5- and CXCR4-tropic human immunodeficiency virus type 1 biological clones isolated from subtype C-infected individuals / G. Pollakis [et al.] // *J. Virol.* – 2004. – Vol. 2 (6). – P. 2841-2852.

149. Polymorphisms within the Human Tumor Necrosis Factor- α Promoter Region in Human Immunodeficiency Virus Type I-Seropositive Persons [Electronic resource] / B. Brinkman [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 1997. – Vol. 175. – P. 188-190. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8985218>. – Date of access: 08.09.2017.

150. Population-based V3 genotypic tropism assay: a retrospective analysis using screening samples from the A4001029 and MOTIVATE studies / R. A. McGovern [et al.] // *AIDS.* – 2010. – Vol. 24, № 16. – P. 2517-2525.

151. Predictors of optimal virological response to potent ART / W. G. Powderly [et al.] // *AIDS.* – 1999. – Vol. 13. – P. 1873-1880.

152. Prevalence of CCR5 and CCR2 HTV-coreceptor gene polymorphisms in Belgium / F. Struyf [et al.] // *Hum. Hered.* – 2000. – Vol. 50. – P. 304-307.

153. Primary structure of human platelet factor 4 / D.A.Walz [et al.] // *Trombosis Research.* – 1977. – Vol. 11. – P. 893-898.

154. R Core Team (2017). R: A Language and Environment for Statistical Computing / R Core Team (2017) // R Foundation for Statistical Computing [Electronic resource] – Vienna, Austria, 2017. – Mode of access: <https://www.r-project.org/about.html>. – Date of access: 01.05.2018.

155. R Studio Team (2016). RStudio: Integrated Development for R / RStudio Team (2016) // RStudio, Inc. [Electronic resource] – Boston, MA, 2016. – Mode of access: <http://www.rstudio.com> – Date of access: 01.05.2018.

156. Regoes, R. R. The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective / R. R. Regoes, S. Bonhoeffer // *Trends Microbiol.* – 2005. – Vol. 13, № 6. – P. 269-277.

157. Relationship between HIV coreceptor tropism and disease progression in persons with untreated chronic HIV infection / M. B. Goetz

[et al.] // J. AIDS. – 2009. – Vol. 50, iss. 3. – P. 259-266.

158. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposures / W. A. Paxton [et al.] // Nat. Med. – 1996. – № 2 (4). – P. 412-417.

159. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene / M. Samson [et al.] // Nature. – 1996. – Vol. 382 (6593). – P. 722-725.

160. Response to treatment and disease progression linked to CD4+ T cell surface CXCR5 density in human immunodeficiency virus type 1 vertical infection / A. Gervaix [et al.] // J. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 185 (8). – P. 1055-1061.

161. Risk factor analysis of hypersensitivity reaction to abacavir / W. Symonds [et al.] // Clin. Ther. – 2002. – Vol. 24 (4). – P. 565-573.

162. Safety and efficacy of once-daily didanosine, tenofovir and nevirapine as a simplification antiretroviral approach / E. Negredo [et al.] // Antivir. Ther. – 2004. – Vol. 9. – P. 335-342.

163. Sensitivity of the HIV-1 PHENOSCRIP^T ENV assay for the detection of HIV X4 minority species, and determination of tropism of subtype non-B viruses / V. Roulet // 2nd International Workshop on Targeting HIV Entry Conference : abstr., Oct. 20-21, 2006, Boston, Massachusetts, USA. – Boston, 2006. – P. 23.

164. Singh, S. Impact of Cytokine Gene Polymorphism on the HIV-1 Disease Progression and Response to Therapy [Electronic resource] / S. Singh, S. K. Arora // J. AIDS Clin. Res. – 2015. – Vol. 6, № 10. – P. 506. – Mode of access: <https://www.omicsonline.org/open-access/impact-of-cytokine-gene-polymorphism-on-the-hiv1-disease-progressionand-response-to-therapy-2155-6113-1000506.php?aid=63089>. – Date of access: 21.09.2017.

165. Stein, J. V. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview / J. V. Stein, C. Nombela-Arrieta // Immunology. – 2005. – Vol. 116 (1). – P. 1-12.

166. Structure of a V3-Containing HIV-1 gp120 Core / C. Huang [et al.] // Science. – 2005. – Vol. 310, iss. 5750. – P. 1025-1028.

167. Subgroup analyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection [Electronic resource] / G. Fätkenheuer [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2008. – Vol. 359. – P. 1442-1455. – Mode of access: doi:10.1056/NEJMoa0803154. – Date of access: 02.09.2017.

168. Sulkowski, S. Therapeutic issues in HIV/HCV-coinfected

patients / S. Sulkowski, Y. Benhamou // *J. Viral Hepat.* – 2007. – № 14 (7). – P. 371-386.

169. Switch of predicted HIV-1 tropism in treated subjects and its association with disease progression / A. Castagna [et al.] // *Medicine.* – 2016. – Vol. 95, iss. 44. – P. e5222.

170. Switching the third drug of antiretroviral therapy to maraviroc in aviraemic subjects: a pilot, prospective, randomized clinical trial [Electronic resource] / A. M. Bonjoch [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2013. – Vol. 68 (6). – P. 1382-1387. – Mode of access: 10.1093/jac/d. – Date of access: 15.11.2017.

171. The CCR5 deletion mutation fails to protect against multiple sclerosis / B. H. Bennetts [et al.] // *Hum. Immunol.* – 1997. – Vol. 58 (1). – P. 52-59.

172. The challenge of finding a cure for HIV-infection / D. D. Richman [et al.] // *Science.* – 2009. – Vol. 323, № 5919. – P. 1304-1307.

173. The epidemiology of antiretroviral drug resistance among drug-naive HIV-1-infected persons in 10 US cities / H. S. Weinstock [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 189 (12). – P. 2174-2180.

174. The evolution of coreceptor tropism in HIV-infected patients interrupting suppressive antiretroviral therapy / L. J. Waters [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 52 (5). – P. 671-673.

175. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes / C. C. Bleul [et al.] // *PNAS USA.* – 1997. – Vol. 94 (5). – P. 1925-1930.

176. The lowest X4 Geno2Pheno false-positive rate is associated with greater CD4 depletion in HIV-1 infected patients [Electronic resource] / M. M. Santoro [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – Vol. 18, № 8. – Mode of access: [http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)63450-9/fulltext](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)63450-9/fulltext). – Date of access: 16.05.2017.

177. The PharmAccess African (PASER-M) and the TREAT Asia (TASER-M) monitoring studies to evaluate resistance-HIV drug resistance in subSaharan Africa and the Asia-Pacific / R.L. Hamers [et al.] // *Int. J. Epidemiol.* – 2012. – Vol. 41. – P. 43-54.

178. The prevalence and risk of immune restoration disease in HIV-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy / D. J. Jevtovic [et al.] // *HIV Med.* – 2005. – № 6 (2). – P. 140-143.

179. The region of the envelope gene of human immunodeficiency virus type 1 responsible for determination of cell tropism / A. J. Cann [et al.] // *J. Virol.* – 1992. – Vol. 66, № 1. – P. 305-309.

180. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression / Y. Huang [et al.] // *Nat. Med.* – 1996. – Vol. 2 (11). – P. 1240-1243.

181. The role of viral phenotype and CCR- 5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression / N. L. Michael [et al.] // *Nat. Med.* – 1997. – Vol. 3 (3). – P. 338-340.

182. The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates / H. Choe [et al.] // *Cell.* – 1996. – Vol. 85 (7). – P. 1135-1148.

183. Therneau, T. M. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model : Statistics for Biology and Health* / T. M. Therneau, P. M. Grambsch. – New York : Springer-Verlag, 2000. – 350 p.

184. Trends in mortality and causes of death among women with HIV in the US: a ten-year study / A. L. French [et al.] // *J. AIDS.* – 2009. – № 51 (4). – P. 399-406.

185. Tumor necrosis factor region polymorphisms are associated with AIDS and with cytomegalovirus retinitis [Electronic resource] / N. Deghaide [et al.] // *AIDS.* – 2009. – № 23 (13). – P. 1641-1647. – Mode of access: http://journals.lww.com/aidsonline/fulltext/2009/08240/Tumor_necrosis_factor_region_polymorphisms_are.3.aspx. – Date of access: 09.09.2017.

186. Update on clinical and methodological recommendations for genotypic determination of HIV tropism to guide the usage of CCR5 antagonists / E. Poveda [et al.] // *AIDS Rev.* – 2012. – Vol. 14 (3). – P. 208-217.

187. Use of Cellular HIV DNA to Predict Virologic Response to Maraviroc: Performance of Population-Based and Deep Sequencing / L. C. Swenson [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 56, № 11. – P. 1659-1666.

188. V3 determinants of HIV-1 escape from the CCR5 inhibitors Maraviroc and Vicriviroc [Electronic resource] / B. Reem [et al.] // *Virology.* – 2012. – Vol. 427, iss. 2. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3320651/>. – Date of access: 10.09.2017.

189. V3 loop sequence space analysis suggests different evolutionary patterns of CCR5- and CXCR4-tropic HIV [Electronic resource] / K. Bozek [et al.] // *PLoS ONE.* – 2009. – Vol. 4 (10). – P. e7387. – Mode of access: [10.1371/journal.pone.0007387](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007387). – Date of access: 22.08.2017.

190. Viral opportunistic infections in patients with HIV-infection

/ V.D. Moskaliuk [et al.] // Інфекційні хвороби. – 2012. – № 3 (69). – С. 12-15.

191. Virological follow-up of adult patient in antiretroviral treatment programmes in sub-Sahara Africa : a systematic review / R. E. Barth [et al.] // Lancet Infect Dis. – 2010. – Vol. 201. – P. 1303-1307.

192. Virus prevalence among patients infected with Human Immunodeficiency Virus : a cross-sectional analysis of the US adult AIDS Clinical Trials Group / K. E. Sherman [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2002. – № 34 (6). – P. 831-837.

193. Von Reyn, C. F. The significance of bacteremic tuberculosis among persons with HIV infection in developing countries / C. F. Von Reyn // AIDS. – 2009. – Vol. 13. – P. 2193-2195.

194. Westby, M. CCR5 antagonists: host-targeted antiviral agents for the treatment of HIV infection, 4 years on / M. Westby, E. van der Ryst // Antivir. Chem. Chemother. – 2010. – № 20. – P. 179-192.

195. World Health Organization. WHO HIV drug resistance report – 2012. Geneva: World Health Organization, 2012.

Научное издание

Матиевская Наталья Васильевна
Токунова Ирина Олеговна

**ТРОПИЗМ ВИЧ-1:
КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ,
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ, ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ**

Монография

Ответственный за выпуск С. Б. Вольф

Компьютерная верстка И. И. Прецкайло
Корректор Л. С. Засельская

Подписано в печать 26.01.2018.
Формат 60x84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Таймс. Ризография.
Усл. печ. **8,00** л. Уч.-изд. **6,10** л. Тираж **30** экз. Заказ **21**.

Издатель и полиграфическое исполнение
учреждение образования
«Гродненский государственный медицинский университет»
ЛП № 02330/445 от 18.12.2013. Ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно.