

Лекарственная устойчивость ВИЧ-1 к ингибиторам интегразы в Республике Беларусь

Бунас А. С., Гасич Е. Л., Конончик Е. С., Булда К. Ю.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Для лечения ВИЧ-инфекции в стране широко используются разные комбинации ингибиторов протеазы, нуклеозидных и нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ, обладающие низким или средним генетическим барьером. В результате развивается лекарственная устойчивость ВИЧ к антиретровирусным препаратам, что в свою очередь приводит к снижению эффективности лечения и сокращению продолжительности жизни пациентов. В настоящее время наиболее эффективным является применение новых лекарственных средств с высоким генетическим барьером — ингибиторов интегразы (ИИ) ВИЧ. Впервые в стране был разработан метод выявления мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ к ИИ и получены первые данные о спектре и частоте их встречаемости.

Ключевые слова: ВИЧ, антиретровирусная терапия, лекарственная устойчивость, ингибиторы интегразы.

Введение. Объединенная программа ООН по ВИЧ/СПИД (ЮНЭЙДС) в 2014 г. определила цели лечения ВИЧ, результатом чего стала стратегия 90–90–90. С 2016 г. этой стратегии следует и Республика Беларусь, вследствие чего доступ к антиретровирусной терапии (АРТ) предоставляется всем пациентам с ВИЧ-инфекцией и обеспечивается широкий охват АРТ [1]. В схемах первой линии терапии используются лекарственные средства групп нуклеозидных (НИОТ) и нуклеозидных (ННИОТ) ингибиторов обратной транскриптазы, имеющих средний и низкий генетический барьер соответственно. Лекарственная устойчивость к лекарственным средствам (ЛС) данных групп по-

является в результате нуклеотидных замен в последовательности, кодирующей обратную транскриптазу ВИЧ-1.

Решением данной проблемы является применение ЛСАРТ с более высоким генетическим барьером, в связи с чем Всемирная организация здравоохранения рекомендовала назначение ИИ в схемах первого и второго рядов терапии [2]. Ингибиторы интегразы влияют на стадию переноса цепи, поэтому их также называют ингибиторами переноса цепи (INSTI). Одобренные FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) представители данной группы ЛС делятся на два поколения: первое (ралтегравир, элвитегравир) и второе (долутегравир, биктегравир, на рассмотрении находится каботегравир). Как и все прочие АРВ-ЛС, ингибиторы интегразы должны применяться совместно с другими лекарственными средствами, несмотря на то, что по сравнению с Н(Н)ИОТ, ингибиторы интегразы первого поколения обладают высоким генетическим барьером, а второго — очень высоким. Кроме того, долутегравир потенциально эффективен как против диких вариантов ВИЧ, так и против тех, что уже устойчивы к ИИ первого поколения [3].

Все первичные мутации резистентности к ингибиторам интегразы были обнаружены у пациентов, потерпевших неудачу лечения ралтегравиром (Y143R, Q148H/K/R, N155H) или элвитегравиром (T66I, 92Q, S147G, Q148H/K/R, N155H) и, что примечательно, полностью отсутствовали либо встречались с крайне низкой вероятностью среди пациентов без опыта лечения ИИ (инфицированных как ВИЧ-1 субтипа В, так и прочих субтипов, а также групп N и O). Компенсаторные мутации, которые сами по себе не приводят к развитию лекарственной устойчивости, также обнаруживались у пациентов с неудачей терапии ралтегравиром и элвитегравиром, однако частота выявления некоторых из них зависела от субтипа ВИЧ-1 [4]. В Республике Беларусь в настоящее время применяются такие препараты из группы ингибиторов интегразы, как долутегравир и ралтегравир.

Цель работы — определение спектра и частоты встречаемости мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ к ингибиторам интегразы у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Следует отметить, что до настоящего времени в Беларуси такие исследования не проводились.

Материалы и методы. Было исследовано 50 образцов РНК ВИЧ-1, выделенной из сыворотки/плазмы крови, собранной в 2018–2020 гг. от ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих на территории Республики Беларусь.

Генотипирование образцов выполнено по участку гена *gag-pol* с использованием тест-системы для субтипирования и выявления мутаций резистентности вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) к антиретровирусным препаратам в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации «Бел ВИЧ-1-резистентность-субтип», производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Минск, Республика Беларусь).

Секвенирование по Сэнгеру полученного ПЦР-продукта проводили на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Applied Biosystems, США). Биоинформационный анализ выполняли при помощи программного обеспечения SeqA 6 и SeqScape 3. Определение генотипов/подтипов ВИЧ-1 и поиск замен лекарственной устойчивости к ингибиторам интегразы осуществлялось с использованием алгоритма HIVdbProgram на сайте базы данных лекарственной устойчивости ВИЧ Стенфордского университета (Режим доступа: <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences/>).

Результаты и их обсуждение. В исследование было включено 50 образцов из разных регионов Республики Беларусь: наибольшее количество образцов поступило из Минска — 25 (50,0 ± 7,1 %), 10 образцов (10,0 ± 5,7 %) поступило из Минской области, 9 (18,0 ± 5,4 %) — из Гомельской, 3 (6,0 ± 3,4 %) — из Могилевской, 2 (4,0 ± 2,8 %) — из Гродненской и один (2,0 ± 2,09 %) — из Брестской. Среди проанализированных образцов 19 (38,0 ± 6,9 %) были получены от пациентов женского пола, 31 (62,0 ± 6,9 %) — от пациентов мужского пола. Средний возраст пациентов составил 34,6 ± 10,9 лет (таблица).

Таблица — Эпидемиологические данные (пол, возраст, регион)

Возраст и пол исследуемого	Всего	Брестская	Гомельская	Гродненская	Минск	Минская	Могилевская
Менее 18 лет:	5	—	2	—	2	—	1
женщин	1	—	1	—	—	—	—
мужчин	4	—	1	—	2	—	1

Окончание таблицы

Возраст и пол исследуемого	Всего	Брестская	Гомельская	Гродненская	Минск	Минская	Могилевская
18—25 лет	2	—	—	—	—	1	1
женщин	1	—	—	—	—	1	—
мужчин	1	—	—	—	—	—	1
26—35 лет:	17	—	1	—	14	2	—
женщин	4	—	—	—	3	1	—
мужчин	13	—	1	—	11	1	—
36—45 лет:	20	1	6	—	8	4	1
женщин	9	—	3	—	3	3	—
мужчин	11	1	3	—	5	1	1
Более 45 лет:	6	—	—	2	1	3	—
женщин	4	—	—	2	—	2	—
мужчин	2	—	—	—	1	1	—
Итого	50	1	9	2	25	10	3

Образцы были условно разделены на две подгруппы согласно информации о проведенной АРТ. Так, в первую группу включены пациенты без опыта лечения ингибиторами интегразы, но получающих схемы АРТ 1-го ряда ($n = 31, 62,0 \pm 6,9 \%$) образец, во вторую — пациенты без опыта лечения препаратами антиретровирусной терапии ($n = 19, 38,0 \pm 6,9 \%$) образцов. Генотипический пейзаж первой группы выглядел следующим образом: 30 ($96,8 \pm 3,2 \%$) последовательностей относились к субтипу А, представленного А6 под-подтипом, и в одном случае был выявлен С подтип. Во второй группе все исследуемые образцы относились в А6 под-подтипу вируса. Распределение образцов по регионам и генотипическому пейзажу представлено на рисунке 1.

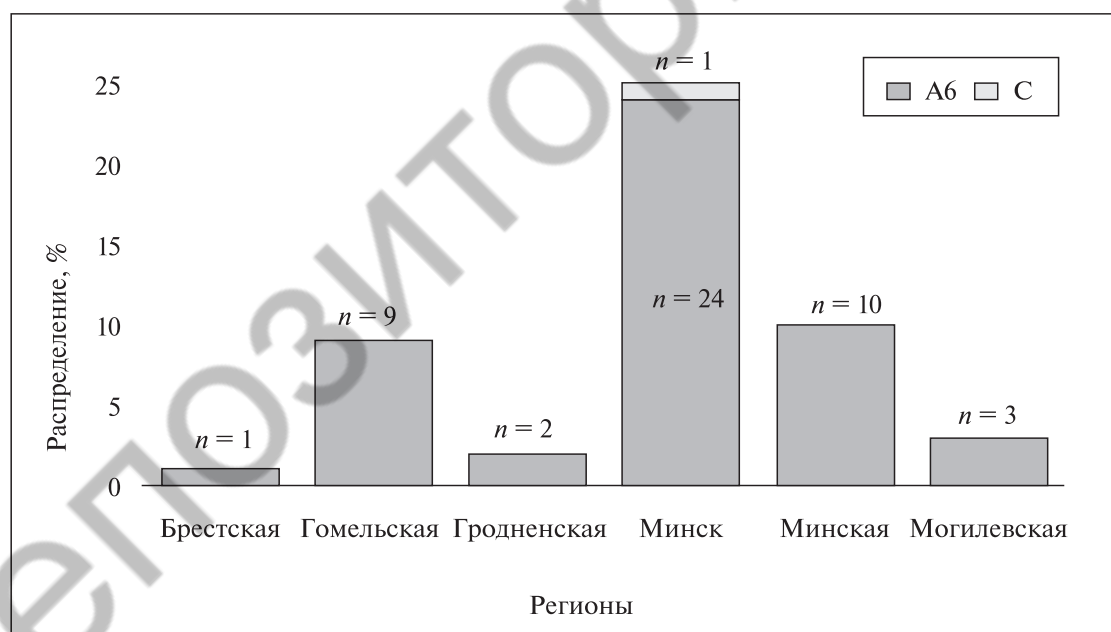


Рисунок 1 — Распределение по регионам и генотипический пейзаж образцов, включенных в исследование

Для достижения поставленной цели был разработан *in-house* метод выявления лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к ингибиторам интегразы: были загружены последовательности наиболее распространенных субтипов и CRF ВИЧ-1 из международной базы данных GenBank. После их множественного выравнивания при помощи программы BioEdit, была получена консенсусная последовательность гена *pol*, на основании чего был осуществлен дизайн и синтез пар праймеров к участку гена *pol*, кодирующему интегразу (рисунки 2, 3).

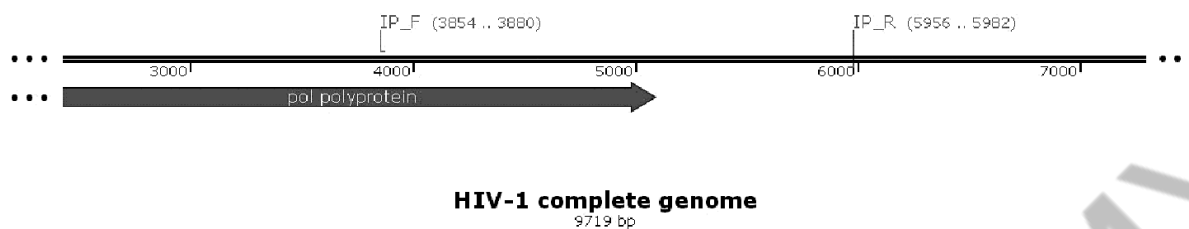


Рисунок 2 — Дизайн внешней пары праймеров для амплификации участка гена *pol*, кодирующего интегразу

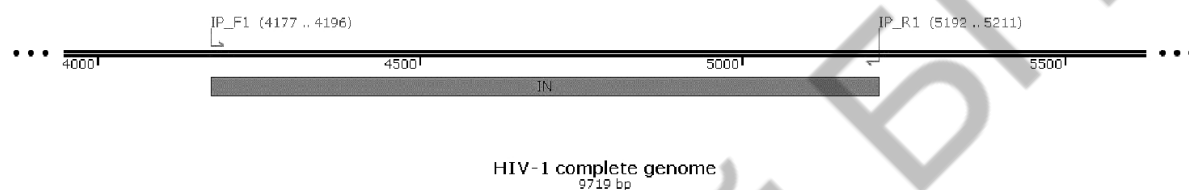


Рисунок 3 — Дизайн внутренней пары праймеров для амплификации участка гена *pol*, кодирующего интегразу

Длина полученного в результате «гнездовой» ПЦР фрагмента составляет 1035 п. н. (4177–5211 п. н.). Секвенирование и последующий анализ полученных нуклеотидных последовательностей позволяет установить мутации и полиморфизмы, известные в настоящее время для группы ингибиторов интегразы ВИЧ.

Так, биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей, секвенированных по участку генома, кодирующему интегразу ВИЧ и относящихся к А6 под-подтипу ВИЧ, показал, что во всех исследуемых пробах пациентов без опыта лечения была выявлена единичная полиморфная замена изолейцина на лейцин в 74 аминокислотной позиции L74I.

В группе пациентов без опыта лечения ингибиторами интегразы ВИЧ, но получающих схемы лечения, в которые включены комбинации ингибиторов протеазы, нуклеозидных и нуклеотидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ, только в 3 случаях ($9,7 \pm 5,3\%$) анализируемые варианты соответствовали вирусам дикого типа. Два их них относились к субтипу А, один — к С. В 28 образцах ($90,3 \pm 5,3\%$) были выявлены единичных или двойные аминокислотные замены. Так, в 25 образцах ($89,3 \pm 5,8\%$) выявлена замена изолейцина на лейцин (L74I), в трех случаях ($6,0 \pm 3,4\%$) установлена двойная замена — метионина на изолейцин в 50 аминокислотной позиции и изолейцина на лейцин в 74 аминокислотной позиции (L74I + M50I). В трех случаях ($6,0 \pm 3,4\%$) установлена двойная замена — метионина на изолейцин в 50 аминокислотной позиции и изолейцина на лейцин в 74 аминокислотной позиции (L74I + M50I).

Как показано рядом исследований, полиморфная мутация L74I широко распространена не только в Беларуси, но и в ряде других странах. Так, в Российской Федерации данная замена была обнаружена у 193 (99,0 %) пациентов под-подтипа А6 [5]. Анализ 115 нуклеотидных последовательностей из стран Западной Африки показал, что почти в 30 % случаях выявлялась замена L74I, при этом она была более характерна для субтипа G, а не для циркулирующей рекомбинантной формы CRF2_AG [6]. Учитывая, что большинство данных при анализе мутаций резистентности к ИИ было получено при изучении В и С субтипов ВИЧ, широко циркулирующий в странах Африки, Америки, Европы, в дальнейшем предстоит оценить роль мутации L74I при формировании лекарственно устойчивых вариантов для генетического варианта, представленного А6 под-подтипом вируса, доминирующим в странах Восточной Европы и Центральной Азии, к которым относится и Республика Беларусь. Хотя данная мутация не является клинически значимой и не вызывает резистентность к ИИ, в тоже время в присутствии хотя бы одной основной мутации лекарственной устойчивости ВИЧ она способствует снижению восприимчивости ко всем препаратам класса ИИ [7]. Важно отметить, что замена L74I, возникает у 3–20 % пациентов без опыта лечения и частота ее появления напрямую связана с генетическими вариантами вируса [8].

Заключение. Проведенные молекулярно-генетические исследования показали отсутствие клинически значимых мутаций к ИИ интегразы как в группе пациентов без опыта лечения ингибиторами интегразы, но получающих других препараты из схем АРТ, так и среди пациентов, начинающих лечение. Высокая частота встречаемости компенсаторной замены L74I в последовательностях под-подтипа А6 может свидетельствовать о естественном характере данного полиморфизма, однако в отличие от субтипов В и Синтегразы ВИЧ-1 под-подтипа А6 недостаточно охарактеризована. Этот вопрос требует дальнейших исследований, так как полиморфизм L74I может влиять на эффективность применения ингибиторов интегразы для лечения ВИЧ-1 данного под-подтипа при появлении других клинически значимых замен в данном участке генома вируса.

Литература

1. ЮНЭЙДС — Постоянное представительство Республики Беларусь при Отделении ООН и других международных организациях в Женеве [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://geneva.mfa.gov.by/ru/interorg/UNAIDS/>. — Дата доступа: 25.09.2020.
2. ВОЗ рекомендует долутегравир в качестве предпочтительного средства лечения ВИЧ для всех групп [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/detail/22-07-2019-who-recommends-dolutegravir-as-preferred-hiv-treatment-option-in-all-populations>. — Дата доступа: 13.09.2020.
3. Dolutegravir (DTG)-containing regimens after receiving raltegravir (RAL) or elvitegravir (EVG): Durability and virological response in a large Italian HIV drug resistance network (ARCA) / S. Rusconi [et al.] // J. Clin. Virol. — 2018. — Vol. 105. — P. 112–117.
4. Characterization and structural analysis of HIV-1 integrase conservation / F. Ceccherini-Silberstein [et al.] // AIDS Rev. — 2009. — Vol. 11, № 1. — P. 17–29.
5. Genetic Features of HIV-1 Integrase Sub-Subtype A6 Predominant in Russia and Predicted Susceptibility to INSTIs / A. Kirichenko [et al.] // Viruses. — 2020. — Vol. 12, № 8.
6. High prevalence of integrase mutation L74I in West African HIV-1 subtypes prior to integrase inhibitor treatment / K. El Bouzidi [et al.] // J Antimicrob Chemother. — 2020. — Vol. 75, № 6. — P. 1575–1579.
7. Impact of HIV-1 Integrase L74F and V75I Mutations in a Clinical Isolate on Resistance to Second-Generation Integrase Strand Transfer Inhibitors / A. Hachiya [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. — 2017. — Vol. 61, № 8.
8. Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1 / A.M. Wensing [et al.] // Top Antivir Med. — 2019. — Vol. 27, № 3. — P. 111–121.

Drug resistance to HIV-1 integrase strand transfer inhibitors in the Republic of Belarus

Bunas A. S., Gasich E. L., Kononchyk E. S., Bulda K. Yu.

¹ *State Institution «The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology», Minsk, Republic of Belarus*

Various combinations of protease inhibitors, nucleoside and non-nucleoside inhibitors of HIV reverse transcriptase, which have a low or medium genetic barrier, are widely used in the country for the treatment of HIV infection. As a result, HIV drug resistance to antiretroviral drugs develops, which, in turn, leads to a decrease in the effectiveness of treatment and a reduction in the life expectancy of patients. Currently, the most effective is the use of new drugs with a high genetic barrier — HIV-1 integrase strand transfer inhibitors (INSTI). For the first time in the country, a method for HIV drug resistance to INSTI detection was developed, and the first data about the spectrum and frequency of their occurrence were obtained.

Keywords: HIV-1, antiretroviral therapy, drug resistance, integrase inhibitors.

Поступила 29.10.2020