

Л.Н.Лухверчик<sup>1</sup>, Г.И.Алаторцева<sup>1</sup>, Л.Н.Нестеренко<sup>1</sup>, В.В.Доценко<sup>1</sup>, И.И.Амиантова<sup>1</sup>, М.В.Жукина<sup>1</sup>, В.Ю.Кабаргина<sup>1</sup>, М.Р.Бобкова<sup>2</sup>, Е.В.Казеннова<sup>2</sup>, В.В.Зверев<sup>1,3</sup>

## ВЛИЯНИЕ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ НА ИЗМЕНЕНИЯ СПЕКТРА СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ИНДИВИДУАЛЬНЫМ АНТИГЕНАМ ВИЧ-1 У ЛИЦ, ИНФИЦИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ СУБТИПАМИ ВИРУСА

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, <sup>2</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, <sup>3</sup>Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, Москва

*Цель.* Оценить уровень антител (АТ) к антигенам ВИЧ-1 у инфицированных различными субтипами вируса лиц, получавших и не получавших антиретровирусную терапию (АРТ). *Материалы и методы.* Исследованы образцы сывороток крови от ВИЧ-1 инфицированных лиц субтипами А1, В и С (АРТ+) — 40 чел., (АРТ-) — 29 чел. АТ определяли методом модифицированного линейного иммуноанализа. Для каждого образца рассчитывали индексы позитивности по каждому антигену. *Результаты.* Выявлены разнонаправленные изменения уровня АТ к антигенам ВИЧ-1 у лиц, инфицированных различными субтипами вируса на фоне АРТ и без ее проведения. *Заключение.* Изучение изменений спектра АТ к белкам ВИЧ-1 у лиц, инфицированных различными субтипами вируса, на фоне АРТ, является перспективным для разработки дополнительных динамических критериев оценки развития ВИЧ-инфекции.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 22—27

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, линейный иммуноанализ, антитела, субтип ВИЧ-1, антиретровирусная терапия

L.N.Lukhverchik<sup>1</sup>, G.I.Alatortseva<sup>1</sup>, L.N.Nesterenko<sup>1</sup>, V.V.Dotsenko<sup>1</sup>, I. I.Amiantova<sup>1</sup>, M.V.Zhukina<sup>1</sup>, V.Yu. Kabargina<sup>1</sup>, M.R.Bobkova<sup>2</sup>, E. V.Kazenнова<sup>2</sup>, V.V. Zverev<sup>1,3</sup>

## ANTIRETROVIRAL THERAPY EFFECT ON SPECIFIC ANTIBODIES SPECTRUM CHANGES TO HIV-1 INDIVIDUAL ANTIGENES FROM PERSONS INFECTED WITH DIFFERENT VIRUS SUBTYPES

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, <sup>2</sup>Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, <sup>3</sup>First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

*Aim.* To estimate the antibodies (Ab) level to HIV-1 antigens in persons infected with virus various subtypes, which received and didn't receive antiretroviral therapy (ART). *Materials and methods.* Blood serum samples of HIV-1-infected with subtypes А1, В and С (ART+) — 40 persons, (ART-) — 29 persons. Ab were determined by modified linear immunoassay. Positivity indices for each antigen were calculated for each sample. *Results.* Multidirectional changes in the Ab level to HIV-1 antigens were revealed in persons infected with virus various subtypes at the ART background and without it. *Conclusion.* The study of Ab spectrum changes in persons infected with virus various subtypes at the ART background is promising for the additional dynamic criteria development for HIV infection progress estimation.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 22—27

Key words: HIV-infection, linear immunoassay, antibodies, subtype of HIV-1, antiretroviral therapy

## ВВЕДЕНИЕ

Идентификация антител (АТ) к антигенам вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) является основным методом лабораторной диагностики. АТ к ВИЧ появляются у 90—95 % инфицированных в течение 1 месяца после заражения. Для их

определения последовательно используют два высокочувствительных и высокоспецифичных метода — иммуноферментный анализ и линейный иммуноанализ [1].

Однако, кроме диагностической, АТ к ВИЧ играют важную роль в иммунном ответе. АТ к поверхностным белкам ВИЧ, таким как gp120 и gp41, способствуют нейтрализации вируса. На эффективность нейтрализации вируса специфичными АТ влияют различные факторы: аминокислотная последовательность и пространственная структура эпитопов, степень гликозилирования и стабильность поверхностных белков ВИЧ [12].

Данные АТ, связавшись с зараженными ВИЧ клетками, уничтожают их путем антителозависимой клеточной цитотоксичности. Этот механизм элиминации зараженных клеток хорошо изучен у больных с бессимптомной ВИЧ-инфекцией. Доказано, что его эффективность тесно связана с благоприятным течением заболевания [3]. Однако малоизученными остаются изменения спектра специфических АТ и их вируснейтрализующей активности на поздних стадиях ВИЧ-инфекции при проведении антиретровирусной терапии (АРТ).

Поэтому целью нашей работы было изучение спектра и содержания АТ к антигенам ВИЧ-1 в образцах сывороток крови от инфицированных различными субтипами вируса лиц, получавших и не получавших АРТ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано 69 образцов сывороток крови от инфицированных различными субтипами ВИЧ-1 лиц, не получавших АРТ (АРТ–) — 29 чел. и получавших АРТ (АРТ+) — 40 чел. Исследуемые образцы были предварительно охарактеризованы сотрудниками НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи. Основные характеристики групп, сформированных для проведения исследований, представлены в табл.

**Основные характеристики исследованных групп пациентов, инфицированных различными субтипами ВИЧ-1**

Основные показатели	Инфицированные субтипом А1:		Инфицированные субтипом В:		Инфицированные субтипом С:	
	АРТ– (n=8)	АРТ+ (n=8)	АРТ– (n=11)	АРТ+ (n=26)	АРТ– (n=10)	АРТ+ (n=6)
Возраст (M±m), лет	34,4±3,0	36,0±2,5	34,4±2,8	42,7±2,2	40,3±4,0	42,8±6,7
Женщины, %	63	63	64	38	80	33
Мужчины, %	37	37	36	62	20	67
Срок заболевания (M±m), лет	3,8±0,7	7,4±1,4	4,7±1,3	5,4±0,7	2,2±0,4	2,1±0,9
Путь заражения: половой, %	50	25	36	35	60	50
в/в наркомания, %	50	75	64	65	40	50
Стадия ВИЧ-инфекции:						
3, %	50	-	36	4	60	-
4А, %	12	63	36	42	30	33
4Б, %	38	13	14	35	10	50
4В, %	-	24	14	19	-	17
Количество CD4-клеток (M±m), клеток в мл	411±106,4	385,5±91,8	522,8±105,5	369,3±46,7	439,7±62,1	588,5±243,5
Вирусная нагрузка (M±m), кол-во копий в мл	788257±65470	39469±2527	54723±2140	129383±6071	312389±19506	1732558±184234

Специфические АТ определяли методом линейного иммуноанализа с использованием экспериментально модифицированного набора реагентов «Блот-ВИЧ 1/2+0» (ЗАО БТК «Биосервис»), в котором на стрипы нитроцеллюлозных мембран дополнительно были нанесены линии с иммобилизованными рекомбинантными антигенами Vif и Nef. По окончании стандартной процедуры линейного иммуноанализа стрипы иммуносорбента сканировали, полученное изображение анализировали с помощью компьютерной программы «TotalLab-TL120». На основании оценки интенсивности окрашивания линий стрипа, включая контрольную, рассчитывали индекс позитивности (ИП) для каждого образца как соотношение интенсивности окрашивания линий с антигенами ВИЧ-1, включая Vif и Nef, к интенсивности окрашивания линии с отрицательным контрольным антигеном. Для каждой группы рассчитывалось среднее значение ИП. Все статистические расчеты проводили с помощью программы «Excel 2013»: пакет «Анализ данных».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных результатов показал неоднозначные изменения в содержании АТ к индивидуальным антигенам ВИЧ-1 у лиц, инфицированных различными субтипами вируса.

ИП АТ к белку gp160 (Env1) у лиц с субтипами А1 и В мало изменялись на фоне АРТ ( $12,0 \pm 1,1$  против  $10,7 \pm 1,9$  и  $14,7 \pm 1,1$  против  $14,3 \pm 1,2$ , соответственно). У пациентов, инфицированных субтипом С ВИЧ-1, при получении АРТ уровень АТ к gp160 увеличивался почти в 2 раза по сравнению с нелечеными пациентами ( $17,5 \pm 2,2$  против  $9,0 \pm 1,2$ ).

Не оказывало существенного влияния проведение АРТ и на содержание АТ к gp41 в сыворотке крови лиц, инфицированных субтипами А1 ( $8,8 \pm 0,7$  против  $8,9 \pm 0,9$ ) и В ( $12,5 \pm 0,9$  против  $13,4 \pm 1,8$ ). Однако у лиц с ВИЧ-1 субтипа С при АРТ уровень АТ к gp41 повышался в 2 раза ( $14,6 \pm 2,5$  против  $7,3 \pm 1,1$ ).

Количество АТ к белку Gag-1 при проведении АРТ увеличивалось у инфицированных субтипом А1 в 1,3 раза ( $13,4 \pm 1,9$  против  $10,6 \pm 1,6$ ) и субтипом С в 1,2 раза ( $12,1 \pm 1,7$  против  $10,5 \pm 2,5$ ). В то же время, у пациентов, инфицированных субтипом В, наблюдалось значительное снижение в 1,4 раза содержания АТ к белку Gag-1 в сыворотке крови ( $8,8 \pm 0,6$  против  $12,3 \pm 1,5$ ).

Среднее значение ИП АТ к антигену p51 в сыворотке крови при проведении АРТ снижалось почти в 2 раза ( $4,3 \pm 0,6$  против  $8,4 \pm 0,8$ ) у лиц с ВИЧ-инфекцией, вызванной субтипом В. У инфицированных субтипом А1 на фоне АРТ содержание АТ данной специфичности практически не менялось ( $8,3 \pm 0,9$  против  $9,0 \pm 0,9$ ). А у пациентов с субтипом С, получавших АРТ, наоборот, даже наблюдалось небольшое увеличение количества АТ к антигену p51 ( $6,6 \pm 1,5$  против  $5,0 \pm 1,4$ ).

При оценке уровня АТ к белку p31 была иная картина: при проведении АРТ отмечено повышение их количества во всех анализируемых группах. У инфицированных субтипом А1 — в 2 раза ( $6,0 \pm 0,8$  против  $3,0 \pm 0,9$ ), у инфицированных субтипом В — в 1,9 раза ( $6,2 \pm 0,8$  против  $3,2 \pm 0,9$ ), у инфицированных субтипом С — в 1,4 раза ( $3,7 \pm 0,9$  против  $2,7 \pm 0,8$ ).

Уровень АТ к Vif повышался в 2,6 раза у лиц, инфицированных субтипом С ВИЧ-1, при проведении АРТ — от  $0,7 \pm 0,08$  до  $1,8 \pm 0,3$ . У лиц с субтипами А1 и В количество АТ к Vif не изменялось на фоне АРТ, в сравнении с нелечеными пациентами, инфицированными этими же субтипами ( $0,9 \pm 0,04$  против  $1,0 \pm 0,02$  и  $0,9 \pm 0,07$  против  $0,9 \pm 0,09$ , соответственно).

Аналогичная картина наблюдалась при оценке содержания АТ к Nef, которые снижались в 3 раза в группе лиц с субтипом А1 на фоне АРТ ( $1,0 \pm 0,05$  против  $3,0 \pm 0,9$ ). У пациентов, инфицированных субтипами В и С, проведение АРТ не оказывало влияния на уровень АТ к Nef ( $2,5 \pm 0,6$  против  $2,5 \pm 0,9$  и  $1,0 \pm 0,06$  против  $1,0 \pm 0,02$ , соответственно).

Анализ изменения уровня АТ у ВИЧ-инфицированных, получавших и не получавших АРТ, выявил его зависимость от субтипа вируса и функционального назначения исследуемых белков ВИЧ-1 (структурных, регуляторных).

У пациентов, инфицированных субтипами А1 и В, не наблюдалось изменений количества АТ к белкам gp160 (Env1) и gp41 на фоне АРТ. А у лиц, инфицированных субтипом С ВИЧ-1, при получении АРТ их уровень вырос практически в 2 раза по сравнению с нелечеными пациентами. АТ к поверхностным гликопротеинам, в том числе к gp160, и трансмембранному белку gp41 появляются в крови практически сразу после инфицирования [4]. Они способны к нейтрализации вируса и подавлению его репликации. АТ к gp160 и gp41 препятствуют взаимодействию ВИЧ с CD4 рецептором клетки мишени [10]. Пока нет убедительных данных о корреляции между титром нейтрализующих АТ и клиническим течением заболевания. Однако, подтверждено, что их высокий уровень ассоциируется с более благоприятным течением ВИЧ-инфекции [9]. Таким образом, оценка содержания АТ к gp160 и gp41 может служить косвенным показателем благоприятного течения инфекции у ВИЧ-инфицированных.

Показана разнонаправленная динамика изменений содержания АТ к белку Gag-1 при проведении АРТ: у лиц, инфицированных субтипами А1 и субтипом С, уровень данных антител повышался, а у пациентов, инфицированных субтипом В, наоборот, понижался. Белок Gag-1 (p24) является одним из сердцевинных белков вируса и кодируется геном gag. Первичным продуктом его трансляции является p53, из которого, в конечном итоге, образуются белки p17 и p24. У ВИЧ-инфицированных в большинстве случаев АТ образуются именно к этим антигенам. При этом p24 является более иммуногенным, чем p17 [2].

Количество АТ к антигену p51 в сыворотке крови при проведении АРТ снижалось у лиц с ВИЧ-инфекцией, вызванной субтипом В. У инфицированных субтипом А1 на фоне АРТ их содержание практически не менялось. А у инфицированных субтипом С наблюдалось небольшое повышение АТ к p51. Уровень АТ к p31 после проведения АРТ повышался во всех анализируемых группах. Ген pol кодирует белки p51 и p31 — ферменты, обратную транскриптазу (ОТ) и интегразу ВИЧ. ОТ обеспечивает превращение вирусной РНК в провирусную ДНК в цитоплазме CD4-клеток, что является критическим этапом жизненного цикла вируса. Активация CD4-клетки приводит к интеграции провирусной ДНК. Латентно инфицированные, покоящиеся CD4-клетки, содержащие неинтегрированную ДНК ВИЧ, образуют длительно существующие резервуары инфекции [6]. Интеграция провирусной ДНК в ядро клетки является предпосылкой для синтеза новых вирионов, для этого обязательно наличие фермента интегразы. Это высококонсервативный фермент, который определяется у ряда различных клинических штаммов ВИЧ-1 и инактивируется под действием ингибиторов интегразы (ралтегравир, элвитегравир и долутегравир) [13]. Изучение изменения уровня АТ к p31 на фоне АРТ может стать дополнительным критерием оценки эффективности применения ингибиторов интегразы.

Уровень АТ к Vif повышался только у лиц, инфицированных субтипом С, при проведении АРТ. У лиц с субтипами А1 и В количество АТ к Vif не изменялось на фоне АРТ, в сравнении с нелечеными пациентами, инфицированными этими же

субтипами. Vif — вирусный белок, инактивирующий фермент АРОВЕС3G путем образования с ним комплекса. Это приводит к деградации вирусной ДНК в клетках организма-хозяина. Блокада АРОВЕС3G под действием Vif наблюдается только у человека. Ведется поиск специфических ингибиторов, обеспечивающих инактивацию АРОВЕС3G с помощью Vif или его внутриклеточную деградацию. На основании вышеизложенного можно предположить, что АТ к Vif могут быть потенциальными маркерами эффективности ингибирования инактивации АРОВЕС3G [8].

Уровень АТ к Nef существенно снижался на фоне АРТ только в группе пациентов с субтипом А1. В группах с субтипами В и С он практически не изменялся. Nef является регуляторным белком, продукция которого осуществляется на ранних этапах цикла репликации вируса. Он индуцирует снижение синтеза молекул CD4 и антигенов HLA I класса на поверхности инфицированных клеток. Это способствует их ускользанию от действия цитотоксических Т-клеток. Nef характеризуется высокой иммуногенностью. Выраженный иммунный ответ на этот белок наблюдается уже на стадии острой ВИЧ-инфекции [7].

Различия между исследованными группами в продукции АТ к различным белкам ВИЧ могут быть обусловлены индивидуальными особенностями HLA-фенотипа, определяющего способность данного человека реагировать на конкретный антиген. Также выявленные различия могут быть связаны с высокой генетической изменчивостью и неоднородностью субтипов ВИЧ-1. Понимание направлений адаптации вируса к воздействию иммунного ответа организма, их влияния на иммуногенность и патогенез ВИЧ-1 является важным фактором для совершенствования диагностики, лечения пациентов и профилактики ВИЧ-инфекции/СПИДа [5].

Для прогнозирования течения ВИЧ-инфекции применяют два индикатора — уровень CD4+ лимфоцитов и вирусную нагрузку. Однако, доказано существование ряда других прогностических показателей развития ВИЧ-инфекции, отражающих или присутствие вирусного антигена, или выраженность иммунного ответа на него. Их называют суррогатными маркерами. К ним относят антиген р24, β2-микроглобулин сыворотки, неоптерин, α-интерферон, растворимый рецептор CD8 и др. [11]. Дальнейшее изучение спектра АТ к белкам ВИЧ-1, возможно, позволит найти новые суррогатные маркеры.

Полученные результаты позволяют заключить, что изучение изменений спектра АТ к белкам ВИЧ-1 у лиц, инфицированных различными субтипами вируса на фоне АРТ, является перспективным для разработки дополнительных динамических критериев оценки развития ВИЧ-инфекции.

*Сбор и аттестация исследуемых образцов выполнены в рамках выполнения гранта Российского научного фонда (проект №15-15-00050-П).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бобкова М.Р., Лаповок И.А. Лабораторные методы дифференциальной диагностики острой, ранней и текущей ВИЧ-инфекции. Кл. лаб. диагностика. 2007, 12:25-32.
2. Евстигнеев И.В. Лабораторные методы диагностики острой, ранней и текущей ВИЧ-инфекции. Кл. иммунология, аллергология, инфектология. 2012, 4:34-40.
3. Ahmad R., Sindhu S.T., Toma E. et al. Evidence for a correlation between antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating anti-HIV-1 antibodies and prognostic predictors of HIV infection. J. Clin. Immunol. 2001, 21:227-233.
4. Cohen O. J., Fauci A. S. Current strategies in the treatment of HIV infection. Adv. Intern. Med. 2001, 46:207-246.
5. Hemelaar J., Gouws E., Ghys P.D. et al. Global Trends in Molecular Epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. AIDS. 2011, 25(5):679-689.

6. Huang J., Wang F., Argyris E. et al. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat. Med.* 2007, 13:1241-1247.
7. Lichterfeld M. et al. Immunodominance of HIV-1-specific CD8+ T-cell responses in acute HIV-1 infection: at the crossroads of viral and host genetics. *Trends in Immunol.* 2005, 26:166-171.
8. Mariani R., Chen D., Schröfelbauer B. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by vif. *Cell.* 2003, 114:21-31.
9. Montefiori D.C., Pantaleo G., Fink L.M. et al. Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long-term nonprogressors. *J. Infect. Dis.* 1996, 173:60-67.
10. Niwa Y., Yano M., Futaki S. et al. T-cell membrane-associated serine protease, tryptase TL2, binds human immunodeficiency virus type 1 gp120 and cleaves the third-variable-domain loop of gp120. Neutralizing antibodies of human immunodeficiency virus type 1 inhibit cleavage of gp120. *Eur. J. Biochem.* 1996, 237:64-70.
11. Pedersen C., Katzenstein T., Nielsen C. et al. Prognostic value of serum HIV-RNA levels at virologic steady state after seroconversion: Relation to CD4 cell count and clinical course of primary infection. *J. Acquir. Immun. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 1997, 16:93-99.
12. Wang S.K., Liang P.H., Astronomo R.D. et al. Targeting the carbohydrates on HIV-1: Interaction of oligomannose dendrons with human monoclonal antibody 2G12 and DC-SIGN. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2008, 105:3690-3695.
13. Zack J.A., Arrigo S.J., Weitsman S.R. et al. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: Molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell.* 1990, 61:213-222.

*Поступила 18.12.18*

Контактная информация: Лухверчик Людмила Николаевна, к.м.н.,  
115088, Москва, 1 Дубровская ул., 15, р.т. (495)674-77-95

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*М.Н.Носик<sup>1</sup>, К.А.Рыжов<sup>1</sup>, А.В.Кравченко<sup>2</sup>, С.Е.Севостьянихин<sup>3</sup>, У.А.Куимова<sup>2</sup>, А.Б.Потапова<sup>4</sup>,  
А.Л.Собкин<sup>3</sup>*

## **АНАЛИЗ УРОВНЯ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПЕРВИЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1 К АНТИРЕТРОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ НА ТЕРРИТОРИИ МОСКВЫ И МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, <sup>2</sup>ЦНИИ эпидемиологии, Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИД, <sup>3</sup>Туберкулезная клиническая больница №3, Москва, <sup>4</sup>Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

*Цель.* Проанализировать уровень лекарственной устойчивости ВИЧ среди первичных пациентов (не получавших АРВ-терапию), проживающих в Московском регионе, где доступ к антиретровирусной терапии достаточно высок. *Материалы и методы.* Были исследованы образцы крови от 527 больных за период 2008-2015 гг., не получавших АРВ-терапию и проживающих в Московском регионе: в Москве (n=279) и в Московской области (n=248). Для анализа возможных мутаций устойчивости были изучены нуклеотидные последовательности области генома вируса с использованием тест-систем ViroseqTMHIV-1 Genotyping System и программного обеспечения CPR (<http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi>). *Результаты.* Установлено, что уровень передачи резистентных штаммов ВИЧ-1 среди «наивных» ВИЧ-позитивных пациентов по-прежнему остается довольно низким и составляет 2%. Однако процент мутаций полиморфизма и второстепенных замен, которые в сочетании с другими мутациями устойчивости в гене обратной транскриптазы могут приводить к снижению чувствительности вируса к антиретровирусным препаратам (АРВ-препараты), довольно высок и составляет 34,5%. *Заключение.* Уровень первичной резистентности среди ВИЧ-инфицированных лиц, не получающих лечение, не превышает 5%. Однако, учитывая