

**Андреева Наталья Юрьевна**

лаборант-исследователь

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

**Кабве Эммануэль**

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

**Давидюк Юрий Николаевич**

канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник

Институт фундаментальной медицины и биологии

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)

федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

ведущий научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных

и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный

педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-106993

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ**

### **ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА ENV ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА**

#### **ЧЕЛОВЕКА НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН**

*Аннотация: генетическая гетерогенность ВИЧ влияет на патогенность вируса, прогрессирование заболевания и ответ на комбинированную антиретровирусную терапию у инфицированных пациентов, а также препятствует разработке вакцины против данного заболевания. Молекулярно-генетический анализ ВИЧ позволит отслеживать миграцию и мутации вируса,*

*а также прогнозировать развитие эпидемии. Проведен сравнительный анализ нуклеотидной последовательности участка гена *Erv* вариантов ВИЧ Республики Татарстан (г. Казань). Было обнаружено, что исследованные образцы ВИЧ из Республики Татарстан относятся к подтипу A.1 группы M штамма ВИЧ-1.*

**Ключевые слова:** *вирус иммунодефицита человека, подтипы ВИЧ-1, ген *Erv*, генетическая гетерогенность.*

*Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (Приоритет–2030).*

По состоянию на 2023 год около 40 миллионов человек живут с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и столько же людей за все время погибло от осложнений, вызванных ВИЧ [1]. Репликация ВИЧ в клетках организма без сопутствующего лечения вызывает постепенное истощение CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и различные нарушения в работе иммунной системы, приводящие к повышенному риску осложнений от инфекционных и онкологических заболеваний [2]. Антитретовирусные препараты высокоэффективны в ингибировании репликации ВИЧ, а комбинированная антитретовирусная терапия (АРВТ) приводит к длительному подавлению репликации вируса. Подавление ВИЧ способствует восстановлению иммунитета и практически исключает риск развития синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) [3]. Тем не менее ВИЧ-положительные люди имеют более высокий риск развития сердечных, костных, печеночных, почечных и неврологических заболеваний. Несмотря на значительные достижения в профилактике заболевания, передача ВИЧ остается распространенной среди многих уязвимых групп населения [4].

По состоянию на 2022 год эпидемия ВИЧ в России затронула 1,13 млн человек [5]. Приволжский федеральный округ (ПФО) характеризуется повышенными показателями заболеваемости и высоким уровнем пораженности населения ВИЧ-инфекцией. По состоянию на 2020 год ПФО являлся лидером по абсо-

лутному числу зарегистрированных людей, живущих с ВИЧ – более 244 тысяч человек [6]. Наиболее поражённым регионом являлась Самарская область, где было зарегистрировано более 57 тысяч ВИЧ-инфицированных. Помимо прочего эпидемиологическая ситуация в ПФО осложнялась распространённостью вариантов ВИЧ, устойчивых к АРВТ [7].

ВИЧ относится к роду лентивирусов, принадлежащему к семейству *Retroviridae*. Зрелый вирион представляет собой сферическую структуру диаметром 100–120 нм, состоящую из липидной двухслойной мембраны, окружающей нуклеокапсид с вирусным геномом [8]. Геном ВИЧ содержит вспомогательные и регуляторные гены, фланкированные длинными концевыми повторами (LTR). Геном ВИЧ можно разделить на три функциональные группы: структурные гены (*Gag*, *Pol* и *Env*); регуляторные гены (*Tat* и *Rev*); вспомогательные гены (*Vpr*, *Vpr*, *Vif* и *Nef*) [9]. Нуклеокапсид ВИЧ содержит две одноцепочечные молекулы (+) РНК, которые при попадании в клетку-мишень обратно транскрибируются в двуцепочечные ДНК (через стадию кДНК) с помощью обратной транскриптазы [10].

ВИЧ обладает широким спектром генетической гетерогенности. Такое разнообразие является результатом высокой скорости репликации вируса, большой частоты мутаций, а также способности обратной транскриптазы стимулировать гомологичную рекомбинацию [11]. Были выделены и охарактеризованы два основных типа ВИЧ: ВИЧ-1 и ВИЧ-2, среди которых ВИЧ-1 является более вирулентным и патогенным [9]. На основании разницы в нуклеотидной последовательности (НП) гена оболочки (*Env*) у типа ВИЧ-1 выделяют три группы: М, N и О [12]. Группа М является наиболее распространённой, на долю вариантов из этой группы приходится около 90% ВИЧ-инфекций во всем мире [13]. Группа М ВИЧ-1 дополнительно подразделяется на подтипы А1, А2, А3, А4, В, С, D, F1, F2, G, H, J и К, с генетической вариабельностью от 25% до 35%. Помимо данных вариантов существуют циркулирующие рекомбинантные формы и уникальные рекомбинантные формы, которые являются результатом заражения одной клетки двумя или несколькими подтипами [14]. Наиболее распространен-

ными являются следующие подтипы: В, встречающийся в основном в Северной Америке и Европе; А и D, которые распространены в основном в Африке; С, встречающийся в основном в Африке и Азии. Самым распространённым на территории России является вариант ВИЧ-1 группы М подтипа А1 [15].

Генетическое разнообразие ВИЧ препятствует разработке вакцины против СПИД. Кроме того, генетическая гетерогенность ВИЧ может влиять на патогенность вируса, прогрессирование заболевания и ответ на АРВТ у инфицированных пациентов [16]. Учитывая данные особенности ВИЧ, представляется необходимым проведение его молекулярно-генетического анализа для лучшего понимания характеристик вируса и их влияния на эффективность АРВТ, а также для снижения количества случаев заболевания и уровня смертности от ВИЧ-инфекции [17]. Результаты молекулярно-генетического анализа ВИЧ позволят отслеживать пути распространения и эволюцию вируса, а также прогнозировать развитие эпидемии, что является важным для разработки антиретровирусных препаратов и вакцин, а также проведения грамотной противовирусной профилактики [15].

Таким образом, целью данной работы явилось проведение молекулярно-генетической идентификации и сравнительного анализа нуклеотидной последовательности участка гена *Env* образцов ВИЧ, выявленных на территории Республики Татарстан.

Этический комитет Казанского федерального университета одобрил данное исследование (статья 20, Федеральный закон «Об охране здоровья граждан Российской Федерации» №323-ФЗ от 21 ноября 2011 года). Подписанное информированное согласие было получено от каждого пациента в соответствии с руководящими принципами, принятыми в рамках настоящего протокола. Общую РНК из венозной крови ВИЧ-инфицированных пациентов выделяли с использованием реагента TriZol (Invitrogen, США). Синтез кДНК проводили с использованием обратной транскриптазы RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США). Для проведения ПЦР-амплификации участка гена *Env* ВИЧ использовали праймеры со следующими последовательностями (в направлении

5'→3'): TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGA для прямого праймера и TTTAGCATCTGATGCACAAAATAG. ПЦР проводили с использованием реакционной смеси 5×Screen Mix (Евроген, Россия). Полученные ПЦР-продукты секвенировали в Междисциплинарном центре коллективного пользования КФУ. Для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей (НП) использовали алгоритм Clustal W из программы MEGA6.0. Филогенетический анализ НП вариантов ВИЧ проводили методом Maximum Likelihood с использованием Tamura-Nei model в программе MEGA6.0 [18]. Для сравнительного и филогенетического анализа использовали НП вариантов ВИЧ, размещённых в электронной базе данных GenBank. НП гена *Env* ВИЧ-2 из Франции и Гвинеи-Бисау использовали в качестве внешней группы.

Для секвенирования методом Сэнгера был выбран участок гена *Env* длиной 650 нуклеотидов. Всего было получено НП участка последовательности гена *Env* пяти образцов ВИЧ из города Казани (образцы №1–5). В результате сравнительного анализа было выявлено, что НП образцов №1 и №2 идентичны между собой, а идентичность НП образцов №3 и №4 равнялась 96,8%. При сравнении исследуемых образцов между собой значения идентичности НП были равны: 97,3% – для образцов №1 и №2, 96,8% – для образцов №3 и №4, 88,2–93,5% между образцами №5 и №1–4.

При сравнении НП исследуемых образцов с НП подтипов А ВИЧ-1 из России и стран СНГ (Казахстан и Узбекистан) а также из Кипра было выявлено, что значения идентичности находились в диапазоне 84,5 – 95,4% (Таблица 1). При сравнении исследуемых образцов с подтипами С, переходным подтипом С/Д, а также переходным подтипом D/G из стран Африки (Замбия, Кения) было показано, что значения идентичности находились в интервале 73,2–77,6%. При сравнении образцов с подтипами В из западных стран и Азии (Испания, Германия, Южная Корея, США и Великобритания) было выявлено, что значения идентичности находились в пределах 73,6–82,5%. Значения идентичности НП при сравнении с типами ВИЧ-2 из Гвинеи-Бисау и Франции составили 52,3–

55,6% (табл. 1). Таким образом, можно сделать вывод о том, что анализируемые образцы №1–5 относятся к типу ВИЧ-1.

Таблица 1

Значения идентичности нуклеотидных последовательностей гена *Env* вариантов ВИЧ Республики Татарстан (г. Казань), подтипов штамма ВИЧ-1 из России и стран СНГ, Африки, западных стран и Азии, и штаммов ВИЧ-2

Локация	№	ВИЧ-1											ВИЧ-2	
		Россия + страны СНГ подтип А				Африка подтип С/D		Западные страны + Азия подтип В					Гвинея-Бисау	Франция
		Россия	Казахстан	Узбекистан	Кипр	Замбия	Кения	Испания	Германия	Южная Корея	США	Великобритания		
Казань	Образец №1	84,5 - 88,5	84,7 - 88,2	88,7	88,5	75,9 - 77,3	75,0 - 75,4	80,2	78,7	73,6	74,4 - 76,5	76,5	52,3	52,9
	Образец №2	84,8 - 88,7	84,9 - 88,5	89,0	88,7	76,2 - 77,6	75,3 - 75,4	80,5	78,4	73,8	74,7 - 76,7	76,7	52,6	53,2
	Образец №3	88,2 - 93,0	90,6 - 93,0	93,0 - 93,3	91,7	76,4 - 77,5	73,2 - 74,7	80,1	78,4	75,3	75,5 - 76,6	76,6	54,3	55,3
	Образец №4	89,8 - 94,6	92,0 - 95,2	95,2 - 95,4	93,8	76,4 - 77,5	74,3 - 76,4	82,5	79,0	76,4	77,1 - 78,0	78,0	54,0	55,6
	Образец №5	86,0 - 88,3	87,3 - 88,5	88,2	86,8	73,4	74,0 - 75,5	80,5	78,2	76,1	75,3 - 77,0	76,5	52,6	53,5
Общее значение идентичности		84,5 - 95,4				73,2 - 77,6		73,6 - 82,5					52,3 - 55,6	

На филогенетическом дереве, построенном для НП участка гена *Env* длиной 650 нуклеотидов, образцы из Казани (обозначены розовым цветом) и образцы из России и стран СНГ образуют отдельную субкладу подтипа А.1 обособленную от остальных субклад, включающих подтипы В, В/Ф, С, D/С, D/Г штамма ВИЧ-1, а также типы ВИЧ-2 (рис. 1). При этом наиболее близкородственными для образцов №3 и №4 выглядят штамм Россия.3 ВИЧ-1 А, а также штаммы из Казахстана и Узбекистана, в то время как образцы №1 и №2 находятся на отдельной ветке, образуют отдельную субкладу, и ни один из референсных штаммов не является к ним близкородственным. На отдельной ветке расположен и образец №5, что в совокупности с результатами сравнительного анализа НП, свидетельствует о значительной генетической дистанции между

ним и референсными штаммами из стран СНГ, относящимися к подтипу А1. Не исключено, что этот образец является представителем какого-то переходного подтипа, например А/В или А/Р. Отображенные на филогенетическом дереве субклады различных подтипов штамма ВИЧ-1 соответствуют литературным данным о распространенности вариантов ВИЧ в разных странах [15; 19], в частности, о преобладании подтипа А.1 штамма ВИЧ-1 в России.

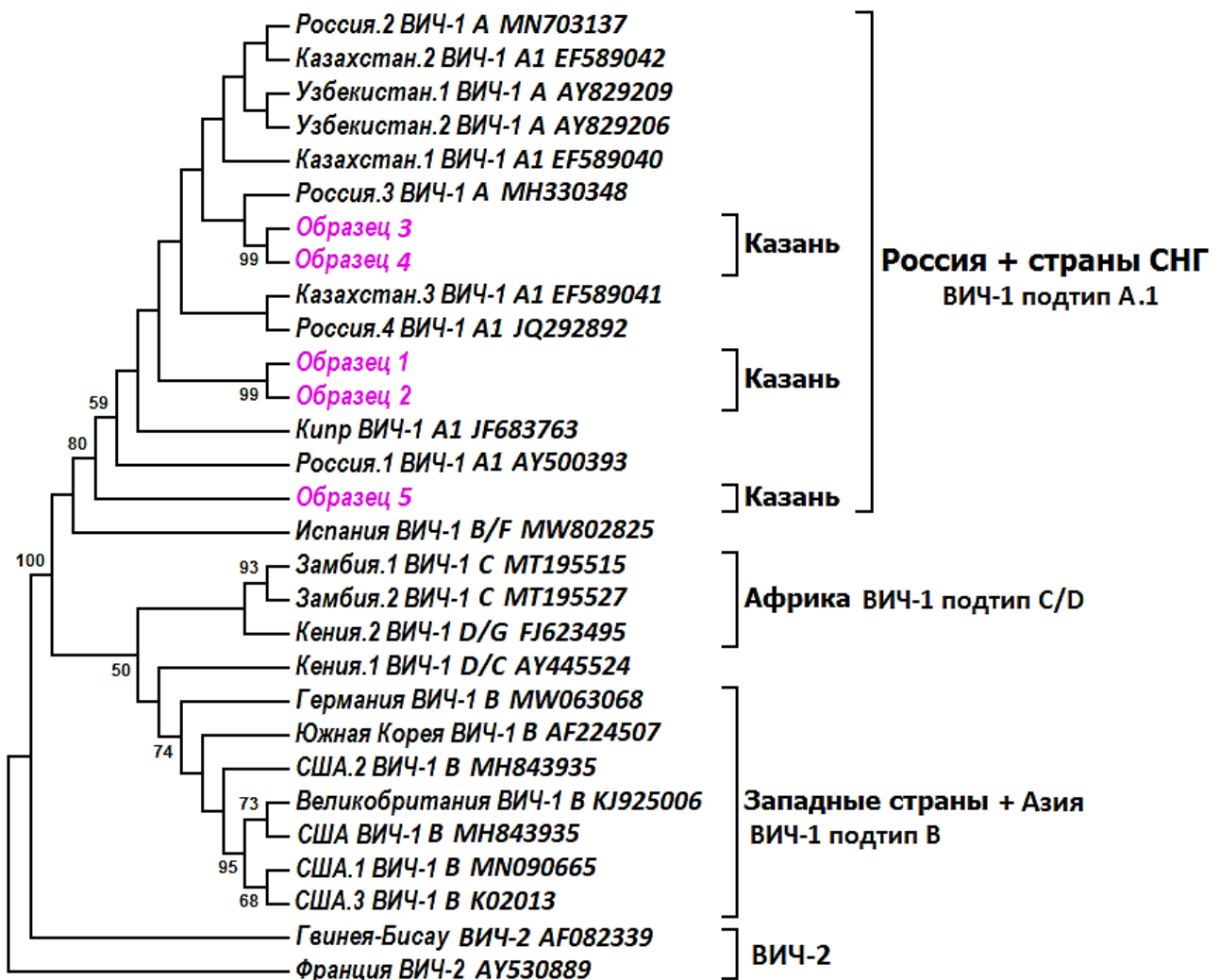


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное для НП частичного гена *Env* ВИЧ длиной 650 п.н.; Генетические линии ВИЧ: подтипы А.1, В, В/Р, С, D/С, D/Р группы М штамма ВИЧ-1 и штаммы ВИЧ-2

Таким образом, на основании результатов сравнительного анализа НП и филогенетического анализа можно сделать вывод, что выявленные на территории Республики Татарстан, в частности в городе Казани, варианты ВИЧ относятся к подтипу А.1 группы М штамма ВИЧ-1 и вместе с подтипами из России

и стран СНГ входят в отдельную группу, генетически отличающуюся от групп вариантов, распространённых в Африке, западных странах и Азии.

### *Список литературы*

1. World Health Organization [Electronic resource]. – Access mode: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids> – Accessed: 25.05.2023.

2. Moir S., Chun T.-W., Fauci A.S. Pathogenic Mechanisms of HIV Disease // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* – 2011. – Т. 6. №1. – С. 223–248.

3. Deeks S.G., Overbaugh J., Phillips A., Buchbinder S. HIV infection // *Nat Rev Dis Primers.* – 2015. – Т. 1. №1. – С. 15035.

4. Bbosa N., Kaleebu P., Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide // *Current Opinion in HIV and AIDS.* – 2019. – Т. 14. №3. – С. 153–160.

5. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2021 г. // Специализированный научно-исследовательский отдел по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2022/03/Spravka-VICH-v-Rossii-na-31.12.2021-g..pdf> (дата обращения: 25.05.2023).

6. Таишева Л.А. Оценка поведенческого риска ВИЧ-инфицирования среди молодежи / Л.А. Таишева // *Казанский мед. ж.* – 2009. – №3 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/otsenka-povedencheskogo-riska-vich-infitsirovaniya-sredi-molodezhi> (дата обращения: 25.05.2023).

7. Зайцева Н.Н., Парфенова О.В., Ефимов Е.И. Анализ распространенности резистентных штаммов ВИЧ к антиретровирусным препаратам в Приволжском федеральном округе // *Вопросы вирусологии.* – 2013. – №6 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/analiz-rasprostranennosti-rezistentnyh-shtamov-vich-k-antiretrovirusnym-preparatam-v-privolzhskom-federalnom-okruge> (дата обращения: 25.05.2023).

8. Sundquist W.I., Krausslich H.-G. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* – 2012. – Т. 2. №7. – С. a006924–a006924.



9. Zulfiqar H.F., Javed A., Sumbal, Afroze B., Ali Q., Akbar K., Nadeem T., Rana M., Nazar Z.A., Nasir I.A., Husnain T. HIV Diagnosis and Treatment through Advanced Technologies // *Front. Public Health.* – 2017. – T. 5. – C. 32.

10. Singh P., Kaur G., Sharma G., Mehra N. K. Immunogenetic basis of HIV-1 infection, transmission and disease progression // *Vaccine.* – 2008. – T. 26. №24. – C. 2966–2980.

11. Taylor B.S., Sobieszczyk M., McCutchan F., Hammer S. M. The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity // *N Engl J Med.* – 2008. – T. 358. №15. – C. 1590–1602.

12. Thomson M.M., Pérez-Álvarez L., Nájera R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy // *The Lancet Infectious Diseases.* – 2002. – T. 2. №8. – C. 461–471.

13. Hemelaar J., Elangovan R., Yun J., Dickson-Tetteh L., Fleminger I., Kirtley S., Williams B., Gouws-Williams E., Ghys P. D., Abimiku A. G., Agwale S., Archibald C., Avidor B., Barbás M. G., Barre-Sinoussi F. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis // *The Lancet Infectious Diseases.* – 2019. – T. 19. №2. – C. 143–155.

14. Sarkhouh H., Chehadeh W. CODEHOP-Mediated PCR Improves HIV-1 Genotyping and Detection of Variants by MinION Sequencing // *Microbiol Spectr.* – 2021. – T. 9. №2. – C. e01432–21.

15. Казеннова Е.В. Молекулярно-эпидемиологический анализ эпидемии ВИЧ-инфекции в Благовещенске и Хабаровске (Дальний Восток России) / Е.В. Казеннова, Д.А. Нешумаев, Д.В., Рукавицин // *Вопросы вирусологии.* – 2014. – №4 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/molekulyarno-epidemiologicheskiiy-analiz-epidemii-vich-infektsii-v-blagoveschenske-i-habarovske-dalniy-vostok-rossii> (дата обращения: 25.05.2023).

16. Cao Z., Li J., Chen H., Song C., Shen Z., Zhou X., Lan G., Zhu Q., Liang S., Xing H., Liao L., Feng Y., Shao Y., Ruan Y. Effects of HIV-1 genotype on baseline

CD4+ cell count and mortality before and after antiretroviral therapy // *Sci Rep.* – 2020. – Т. 10. №1. – С. 15875.

17. Gregson J., Tang M., Ndembu N., Hamers R. L., Rhee S., Marconi V. C., Di-ero L., Brooks K. A., Theys K., Rinke De Wit T., Arruda M., Garcia F., Monge S. Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study // *The Lancet Infectious Diseases.* – 2016. – Т. 16. №5. – С. 565–575.

18. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – 30. – P. 2725–2729.

19. Osmanov S., Pattou C., Walker N., Schwarzländer B., Esparza J. Estimated Global Distribution and Regional Spread of HIV-1 Genetic Subtypes in the Year 2000 // *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes.* – 2002. – Т. 29. №2. – С. 184–190.