

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Максименко Лада Владимировна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОВРЕМЕННОЙ
ПОПУЛЯЦИИ ВИЧ-1 В КРАСНОЯРСКОМ КРАЕ**

1.5.10. Вирусология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Гашникова Наталья Матвеевна

Кольцово
2025

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
1.1 Биологические особенности ВИЧ-1	14
1.1.1 Классификация ВИЧ-1	14
1.1.2 Структура вирусной частицы	16
1.1.3 Жизненный цикл вируса	20
1.2 Механизмы генетической изменчивости ВИЧ-1	26
1.2.1 Генетическая изменчивость ВИЧ-1, связанная с обратной транскриптазой	27
1.2.2 Генетическая изменчивость ВИЧ-1, связанная с белками семейства АРОВЕС	28
1.2.3 Генетическая изменчивость ВИЧ-1, возникающая в результате рекомбинационного процесса	29
1.3 Резистентность ВИЧ-1 к лекарственным препаратам и механизмы ее возникновения	33
1.3.1 Ингибиторы обратной транскриптазы: механизм действия и некоторые их представители	36
1.3.2 Ингибиторы протеазы: механизм действия и некоторые их представители	37
1.3.3 Ингибиторы интегразы: механизм действия и некоторые их представители	38
1.3.4 Ингибиторы проникновения: механизм действия и некоторые их представители	39
1.3.5 Ингибитор капсида, механизм действия	41
1.4 Характеристика современной эпидемии ВИЧ-инфекции в мире	42
1.5 Характеристика эпидемии ВИЧ-инфекции в Российской Федерации	47

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	53
2.1 Исследуемые образцы.....	53
2.2 Забор крови, хранение сывороток и клеток.....	53
2.3 Выделение нуклеиновых кислот ВИЧ-1 из клинического материала.....	54
2.3.1 Выделение РНК ВИЧ-1 из плазмы крови.....	54
2.3.2 Выделение ДНК ВИЧ-1 из клеток	56
2.4 Получение нуклеотидных последовательностей участка гена <i>pol</i> ВИЧ-1: <i>pro- rev</i> и <i>int</i>	57
2.5 Определение нуклеотидной последовательности фрагментов гена <i>pol</i> ВИЧ-1	59
2.6 Определение генетического варианта ВИЧ-1 и анализ лекарственной устойчивости.....	61
2.7 Получение полноразмерных нуклеотидных последовательностей последовательностей генома ВИЧ-1	62
2.8 Очистка полноразмерного генома ВИЧ-1	64
2.9 Проведение рекомбинационного и филогенетического анализа полноразмерных последовательностей геномов ВИЧ-1	65
2.10 Статистический анализ данных и их визуализация.....	66
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	67
3.1 Клинико-эпидемиологическая характеристика ВИЧ-инфицированных лиц, включенных в исследование	67
3.2 Анализ генетической гетерогенности ВИЧ-1, выделенных от жителей Красноярского края.....	71
3.2.1 Генетическое разнообразие ВИЧ-1, выделенных на территории Красноярского края, на основе генотипирования фрагмента гена <i>pol</i>	71
3.2.2 Рекомбинантные формы ВИЧ-1, выявленные на территории Красноярского края	87

3.2.2.1 Новые впервые описанные CRF133_А6В и CRF147_А6В ВИЧ-1, выявленные на территории Красноярского края	89
3.2.2.2 Уникальные рекомбинантные формы ВИЧ-1, выявленные на территории Красноярского края	113
3.3 Анализ мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1.....	136
3.3.1 Распространенность мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1, выделенных от лиц, не имеющих опыта приема антиретровирусной терапии	136
3.3.2 Распространенность мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1, выделенных от лиц с опытом приема антиретровирусной терапии.....	140
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	151
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	163
ВЫВОДЫ	165
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	167
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	173

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

На сегодняшний день ВИЧ-инфекция остается одной из наиболее серьезных проблем в области здравоохранения и социальной сферы как в России, так и во всем мире. Согласно последним эпидемиологическим отчетам Всемирной организации здравоохранения, на конец 2023 года число лиц, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), достигло 39,9 млн [250]. В Российской Федерации на 31.12.2023 г. этот показатель составил 1 197 410 человек [26].

ВИЧ-1 характеризуется высоким уровнем генетического разнообразия, существенный рост которого регистрируется в последнее десятилетие. Возникновение новых геновариантов ВИЧ-1 в разных странах мира происходит благодаря рекомбинационной изменчивости вируса [123]. С 1983 г. и по настоящее время было выявлено и описано 10 основных субтипов, более 170 CRFs (циркулирующих рекомбинантных форм) и еще большее количество URFs (уникальных рекомбинантных форм) ВИЧ-1 [38; 49; 156]. В Африке, особенно в ее Западной и Центральной частях наблюдается наибольшее генетическое разнообразие ВИЧ-1 [159], в то время как на других территориях циркулирует один или более генетических вариантов вируса. В России преобладает ВИЧ-1 под-субтипа А6 [220], известного также как A_{FSU}, так как он также широко распространен в странах бывшего Советского Союза [46; 134; 216]. В зависимости от региона РФ выявляемость циркулирующих ВИЧ-1 может варьировать в широких пределах. В европейской части государства доминирует ВИЧ-1 под-субтипа А6 [5; 11; 17; 219], в то время как в Сибири – CRF63_02A6 [4; 5; 7; 19], а в отдаленных регионах РФ, таких как Калининградская область и Приморский край, широко распространены URFs и ВИЧ-1 субтипа В соответственно [30; 31]. Несмотря на территориальную специфику эпидемии ВИЧ-инфекции на различных территориях страны субтип В и CRF63_02A6 ВИЧ-1 также выявляются, но их доля существенно ниже основного эпидемиологически значимого циркулирующего генетического варианта вируса на той или иной территории. На территории Российской Федерации также фиксируются случаи выявления редких генетических

вариантов. В частности, в Сахалинской области был обнаружен CRF_06срх ВИЧ-1 [21], а субтипы С в г. Санкт-Петербург и Республике Саха [10]. Так как изменение молекулярно-генетического разнообразия ВИЧ-1 непрерывный и динамичный процесс, то для правильной оценки текущего состояния эпидемии ВИЧ-инфекции на определенной территории необходимо регулярно проводить мониторинг циркулирующих ВИЧ-1.

В настоящее время ВИЧ-инфекция не является смертельным заболеванием благодаря созданию химиотерапевтических средств, подавляющих репликацию вируса. Снижение вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированного пациента во время приема антиретровирусных препаратов (АРВП) до уровня, который не могут определить современные тест-системы, позволяет продлить жизнь пациента и улучшить её качество, кроме того, снижается риск передачи вируса другим людям как при половом контакте, так и от матери к ребёнку во время беременности и родов. Однако рост числа ВИЧ-инфицированных, получающих антиретровирусную терапию (АРТ), может снизить её эффективность из-за появления и распространения мутаций лекарственной устойчивости.

Оценка текущей молекулярно-эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции и своевременный контроль за распространением устойчивых к АРТ вариантов ВИЧ-1 на отдельных территориях страны важны для понимания общей эпидемиологической ситуации и разработки эффективных мероприятий, направленных на снижение темпов развития эпидемии, поэтому актуальность проведения данного исследования не вызывает сомнений.

Цель исследования – изучение молекулярно-генетических особенностей ВИЧ-1, циркулирующих на территории Красноярского края.

Задачи исследования:

Задачи исследования:

1. Определить и проанализировать нуклеотидные последовательности фрагментов гена *pol*, кодирующих протеазу, часть обратной транскриптазы и интегразу ВИЧ-1, выявленных у ВИЧ-инфицированных жителей Красноярского края.

2. Описать генетическое разнообразие вариантов ВИЧ-1, выявленных на территории Красноярского края. Охарактеризовать специфику территориальной эпидемии.

3. Определить и проанализировать полногеномные нуклеотидные последовательности как основных, так и вновь возникающих генетических вариантов ВИЧ-1, выявленных у ВИЧ-инфицированных жителей Красноярского края.

4. Оценить распространенность мутаций, обуславливающих лекарственную устойчивость к АРТ среди пациентов, не имеющих опыта приема АРТ, в разные периоды времени.

5. Оценить распространенность мутаций, обуславливающих лекарственную устойчивость к АРТ среди пациентов с опытом приема АРТ, также провести анализ частоты встречаемости данных мутаций в зависимости от генетического варианта ВИЧ-1.

Научная новизна

Масштабное исследование, проведенное в период с 2017 по 2024 гг., позволило получить новые данные о распространении ВИЧ-1 в Красноярском крае. Исследование позволило выявить изменения в характере эпидемии и определить значительный вклад рекомбинантных форм ВИЧ-1 в распространение инфекции.

Впервые на основе анализа полных геномов различных URFs ВИЧ-1, выделенных от ВИЧ-инфицированных лиц Красноярского края, выявлены и описаны новые возникшие CRF133_A6B и CRF147_A6B ВИЧ-1, распространяющиеся среди лиц с рискованным поведением (лица, употребляющие инъекционные наркотики (ЛУИН) и их сексуальные партнеры).

Впервые для популяции ВИЧ-1, циркулирующих в Красноярском крае, были описаны мутации, связанные с развитием лекарственной устойчивости к антиретровирусным препаратам. Выявлены мутации лекарственной устойчивости, характерные для ВИЧ-1 под-субтипа А6 и CRF63_02А6.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты, полученные в ходе выполнения настоящего исследования, дополняют имеющуюся информацию о молекулярно-генетических особенностях эпидемии ВИЧ-инфекции как на территории Сибирского Федерального округа (СФО), так и на территории Российской Федерации и подтверждают мировую тенденцию увеличения вклада рекомбинантных форм ВИЧ-1 в распространении ВИЧ-инфекции.

В клинической практике информация о выявленных мутациях лекарственной устойчивости ВИЧ-1 учитывалась инфекционистами при выборе наиболее эффективной схемы лечения как у пациентов, никогда не получавших АРТ, так и пациентов, кто уже имел опыт ее приема, была учтена врачами-инфекционистами при выборе наиболее эффективного режима лечения. На основе полученных данных о частоте встречаемости лекарственной устойчивости ВИЧ-1 были даны рекомендации о необходимости тестирования на мутации лекарственной устойчивости перед началом лечения. Также были даны рекомендации о смене первой линии терапии со схем лечения, основанных на ненуклеозидных ингибиторах обратной транскриптазы, на схемы, включающие ингибиторы интегразы.

В ходе исследования были расшифрованы 800 фрагментов гена *pol* ВИЧ-1, кодирующего протеазу и часть обратной транскриптазы вируса (PR-RT), 343 фрагмента гена *pol* ВИЧ-1, кодирующего интегразу вируса (IN), 79 полногеномных нуклеотидных последовательностей (н.п.) ВИЧ-1 (NFLG), из них депонировано в международной базе данных GenBank: PR-RT – 443 н.п. (MK002482-MK002621; MW229129-MW229241; OP805383-OP805572), IN – 75 н.п. (MK002622-MK002696), NFLG – 13 н.п. (OP056069-OP056079, PQ308251-PQ308252).

Методология и методы исследования

Для выполнения диссертационной работы методологическая основа была спланирована в соответствии с поставленной целью исследования и задачами для ее достижения. В работе применялись современные молекулярно-биологические методы: выделение РНК и провирусной ДНК ВИЧ-1 из плазмы крови и лимфоцитов соответственно, ПЦР-амплификация (гнездовая/вложенная ПЦР)

фрагментов вирусного генома; очистка продуктов ПЦР колоночным методом, секвенирование фрагментов вирусного генома по Сэнгеру, секвенирование всего генома ВИЧ-1 с использованием технологий NGS. Полученные данные были проанализированы с использованием современных биоинформатических методов: множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей, филогенетический, рекомбинационный, мутационный и статистический анализы. Визуализация данных была выполнена с использованием языка программирования R.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Современная эпидемия ВИЧ-инфекции на территории Красноярского края характеризуется увеличением генетического разнообразия циркулирующих ВИЧ-1 с течением времени.
2. Циркуляция разных генетических вариантов ВИЧ-1 в Красноярском крае среди ВИЧ-инфицированных лиц, практикующих рискованное поведение, привела к образованию новых уникальных, а также циркулирующих (CRF133_A6B, CRF147_A6B) рекомбинантных форм вируса.
3. Зарегистрировано распространение ВИЧ-1 с прогнозируемой передаваемой лекарственной устойчивостью к двум препаратам класса ННИОТ (EFV, NVP) за счет широкого распространения мутации K103N.
4. Высокий уровень прогнозируемой приобретенной лекарственной устойчивости к НИОТ и ННИОТ обусловлен высокой частотой встречаемости мутаций M184V/I, K65R и G190S/A, K103N/S, Y181C/I/V соответственно. Мутации лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к ННИОТ обладают субтип-специфичностью: K101E, Y181C, G190S – чаще выявляются у под-субтипа А6, а K103N и P225H – у CRF63_02A6.

Соответствие паспорту научной специальности

Диссертация отвечает требованиям, предъявляемым к научной специальности 1.5.10 «Вирусология» (биологические науки). Её содержание соответствует пунктам 4, 8 и 10 паспорта специальности.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов проведенного автором исследования обусловлена репрезентативным объемом выборки (800 человек), а также использованием современных молекулярно-биологических, биоинформатических и статистических методов исследования. Надежность и валидность полученных результатов была обеспечена величиной уровня значимости не более 0,05 (5,0%).

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 4 конференциях и конгрессах различного уровня: V Конгресс Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням с международным участием (Новосибирск, 2018); V Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (Кольцово, 2018); IX Конгресс Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням с международным участием 2023 (Санкт-Петербург, 2023); X Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 2023).

Декларация личного участия автора

Забор образцов крови у ВИЧ-инфицированных лиц, а также сбор эпидемиологических и клинических характеристик проводились сотрудниками Красноярского краевого центра профилактики и борьбы со СПИД. Обработка и анализ эпидемиологических и клинических данных были выполнены лично автором.

Выделение вирусной РНК и провирусной ДНК проводилось автором и совместно с сотрудниками отдела ретровирусов Л.Г. Готфрид и И.П. Осиповой. Проведение реакции обратной транскрипции, полимеразной цепной реакции (ПЦР), очистки продуктов амплификации, электрофоретической детекции, секвенирования, очистки продуктов секвенирования проводились лично автором. Структуры специфических олигонуклеотидов для проведения ПЦР были разработаны сотрудником отдела ретровирусов А.В. Тотмениным.

Секвенирование методами Сэнгера и NGS проводилось сотрудниками отдела геномных исследований Б.С. Малышевым и Т.В. Трегубчак.

Депонирование нуклеотидных последовательностей в базу данных GenBank осуществлялось сотрудником отдела ретровирусов А.В. Тотмениным. Филогенетический и рекомбинационный анализы были проведены автором лично, а также совместно с сотрудниками отдела ретровирусов и теоретического отдела А.В. Тотмениным и М.В. Сивай. Анализ лекарственной устойчивости ВИЧ-1 был выполнен автором.

Основные разделы диссертационной работы (написание обзора литературы, результатов и обсуждения, а также статистическая обработка полученных данных) были выполнены лично автором. Научные работы по результатам исследования были подготовлены самостоятельно или при непосредственном участии автора. Суммарное личное участие автора в работе составило не менее восьмидесяти процентов.

Общее руководство работой осуществлялось заведующей отделом ретровирусов, к.б.н. Н.М. Гашникова. Работа была выполнена в 2017-2024 гг.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликованы 18 научных работ, из них – 4 статьи, опубликованных в высокорейтинговых журналах, индексируемых в базах РИНЦ, Web of Science и Scopus, а также 14 тезисов в сборниках материалов всероссийских и международных конференций и конгрессов.

Объем и структура диссертации

Объем диссертации составляет 202 страницы машинописного текста. Она включает в себя следующие разделы:

- введение;
- обзор литературы;
- материалы и методы исследования;
- результаты собственных исследований;
- обсуждение результатов;
- заключение;
- выводы;
- список сокращений и условных обозначений;

- список литературы, включающий 279 источника, из которых 32 — на русском языке, а 247 — на иностранных.

В работе также представлены 32 иллюстрации и 19 таблиц.

Благодарности

Автор приносит благодарность своим коллегам из отдела ретровирусов, сотрудникам отдела геномных исследований и теоретического отдела ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, а именно: Н.М. Гашниковой, М.В. Сивай, А.В. Тотменину, Л.Г. Готфрид, И.П. Осиповой, Т.В. Трегубчак, Б.С. Малышеву. Автор выражает признательность медицинским работникам: Яценко С.В., Остаповой Т.С., Скударнову С.Е. и др. Красноярского краевого центра профилактики и борьбы со СПИД за предоставленные образцы крови ВИЧ-инфицированных пациентов и их эпидемиологические и клинические данные. Особую благодарность автор выражает своему научному руководителю Н.М. Гашниковой за поддержку и помощь в подготовке диссертационной работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Семейство ретровирусов было выделено в 1974 г. вскоре после того, как в 1970 г. Г.Темин и Д.Балтимор независимо обнаружили фермент РНК-зависимую ДНК-полимеразу, которая катализирует реакцию переноса генетической информации с РНК на ДНК [24]. Наличие этого фермента в составе вирусов и послужило основой для названия семейства. Первый представитель семейства ретровирусов был открыт в 1908 г., когда была доказана вирусная природа лейкоза кур (ALV), после чего были обнаружены и другие возбудители различных опухолевых заболеваний птиц и млекопитающих. Но только в 1980 г. был описан первый человеческий ретровирус HTLV-1 (Human T-lymphotropic virus 1), который вызывает Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых. HTLV-1 был успешно выделен благодаря прорыву в культивировании человеческих Т-лимфоцитов. Примерно в это же время в развитых странах стали регистрироваться случаи пневмоцистной пневмонии у молодых мужчин с выраженным иммунодефицитом, который позже назвали СПИДом (синдром приобретенного иммунодефицита). Быстрое распространение СПИДа среди населения подтолкнуло ученых к поиску инфекционной природы данного заболевания. Так в 1983 г. Р.Галло и Л.Монтанье независимо выделили вирус HTLV-3, которому позже присвоили название – ВИЧ-1, а в 1986 г. Ф.Клавель обнаружил еще один возбудитель, вызывающий заболевание людей с похожей клинической картиной, который получил наименование HTLV-4 или ВИЧ [71]. ВИЧ-инфекция за короткий срок распространилась на все континенты, нанося существенный социальный и экономический ущерб.

1.1 Биологические особенности ВИЧ-1

1.1.1 Классификация ВИЧ-1

Научная классификация ретровирусов, которые инфицируют разнообразных млекопитающих, разработанная международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV), выглядит следующим образом (вирусы иммунодефицита человека выделены полужирным начертанием):

Домен: Вирусы

Реалм: Riboviria

Царство: Pararnavirae

Тип: Artverviricota

Класс: Revtraviricetes

Отряд: Ortervirales

Семейство: Retroviridae

Подсемейство: Orthoretrovirinae

Род: Lentivirus

Вид: Lentivirus bovimdef

Вид: Lentivirus bovjem

Вид: Lentivirus capartenc

Вид: Lentivirus equinfane

Вид: Lentivirus felimdef

Вид: Lentivirus humimdef1

Вид: Lentivirus humimdef2

Вид: Lentivirus ovivismae

Вид: Lentivirus pum

Вид: Lentivirus simimdef

Существует два основных типа вируса, вызывающих ВИЧ-инфекцию: ВИЧ-1 и ВИЧ-2, которые генетически схожи примерно на 40%. ВИЧ-1 является причиной примерно за 95% всех случаев заражения ВИЧ-инфекций. ВИЧ-2

встречается в основном в Западной Африке, он менее заразен, чем ВИЧ-1, а для достижения стадии СПИДа ему требуется больше времени.

ВИЧ-1 характеризуется высоким уровнем генетической изменчивости. В настоящее время описаны 4 группы ВИЧ-1: М (major, основной), О (outlier, побочный), N (non-M, non-O) и Р (putative, предполагаемый), генетическая дистанция между которыми составляет менее 50%. Предполагается, что каждая группа ВИЧ-1 возникла в результате независимой передачи вирусов обезьян людям [175]. Основной вклад в развитие эпидемии вносит ВИЧ-1 группы М, вирусы данной группы являются причиной более 90% случаев заражения ВИЧ-инфекцией в мире.

В группе М выделяют субтипы, под-субтипы, а также CRFs и URFs ВИЧ-1. Генетически близкие штаммы ВИЧ-1, филогенетически равноудаленные друг от друга, называются субтипами; в настоящее время известно 10 субтипов ВИЧ-1: А (А1-А8), В, С, D, E, F (F1-F2), J, К и L, субтипы от А до D достаточно широко распространены в мире, другие имеют низкую распространенность и ограниченное географическое распределение. Стоит отметить, что ВИЧ-1 субтипа L был впервые описан в 2019 году, хотя образцы были получены от пациентов в 1980-1990 г. [267]. Под-субтипы являются различными линиями внутри субтипа, и генетическая вариабельность между ними может составлять 15-20%, в то время как генетическая вариабельность между субтипами достигает 25-35%; под-субтипы были дополнительно выделены для ВИЧ-1 субтипов А (А1-А8) и F (F1 и F2) [115]. В связи с постоянным ростом генетической гетерогенности циркулирующих в мире вирусов исследователями регулярно проводится филогенетический анализ с использованием общедоступных полных последовательностей генома ВИЧ-1 для возможной реклассификации вируса [171].

В группе М ВИЧ-1 кроме субтипов дополнительно выделяют CRFs, которые встречаются у двух и более лиц в популяции, и URFs, которые встречаются единожды. CRFs и URFs – это формы вируса, возникшие в результате рекомбинации между разными вариантами вируса (субтипов, под-субтипов и уже известными CRFs ВИЧ-1 группы М). Номер новым описанным CRFs ВИЧ-1

присваивает Национальная Лаборатория Лос Аламос на основании определенных критериев. Присвоенное название вируса отражает очередность обнаружения возникшей формы ВИЧ-1 и информацию о прародительских вирусах, например, CRF03_AG показывает, что данный вирус был третьей описанной CRF, который возник в результате рекомбинационных событий между ВИЧ-1 под-субтипа AG и субтипа B. В настоящее время уже описано более 170 различных CRFs [212].

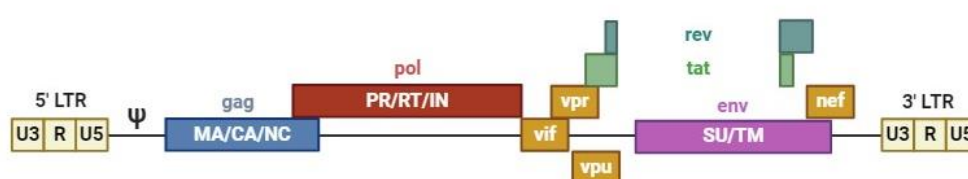
1.1.2 Структура вирусной частицы

Вирусные частицы ВИЧ-1 имеют размер 120-150 нм и окружены липопротеиновой мембраной. Каждая вирусная частица содержит до 72 гликопротеиновых комплексов, встроенных в эту липидную мембрану, каждый из которых состоит из тримеров внешнего гликопротеина (SU, gp120) и трансмембранного связующего белка (TM, gp41). Связь между поверхностными белками и мембранной частью очень слабая, поэтому gp120 может самопроизвольно отщепляться, что приводит к обнаружению гликопротеина gp120 в сыворотке крови людей, инфицированных ВИЧ. Матриксный белок (p17, MA) представляет собой полипептидную цепь, состоящую из 132 аминокислот. Матриксный белок локализуется на внутренней стороне мембраны вириона и удерживает вирусное ядро, содержащее РНК. Благодаря связи с внутренней поверхностью вирусной оболочки, p17 образует защитный слой, который не только обеспечивает структурную целостность вириона, но и играет ключевую роль в процессе его сборки [98]. Капсид ВИЧ-1 состоит из примерно 250 гексамеров и 12 пентамеров (CA, p24), расположенных в виде фуллеренового конуса [58], и включает в себя компоненты, критически важные для процесса репликации, а именно: две копии геномной вирусной РНК, выполняющей функцию носителя генетической информации, фермент обратную транскриптазу (ОТ или RT, p66, ~150 копий), обеспечивающей синтез ДНК на матрице РНК, и интегразу (IN, p31,

~150 копий). Геномная РНК образует стабильный нуклеопротеиновый комплекс с белком р7 и ОТ (Рисунок 1Б) [99]. Данный комплекс обеспечивает не только сохранность генетического материала, но и его готовность к реализации репликационного цикла.

Каждая молекула РНК ВИЧ-1 состоит примерно из 9 т.п.н., которые кодируют 9 генов: 3 структурных (*gag*, *pol* и *env*) и 6 регуляторных (*vif*, *vpr*, *vpr*, *tat*, *rev* и *nef*) [264]. Для синтеза нуклеокапсида и гликопротеинов оболочки вируса нужны гены *gag* (групповой антиген) и *env* (оболочка), а для синтеза важных в процессе репликации вирусов ферментов, таких как протеаза (PR), RT и IN – ген *pol* (полимераза) (Рисунок 1А).

А) Геном ВИЧ-1



Б) Вирион ВИЧ-1

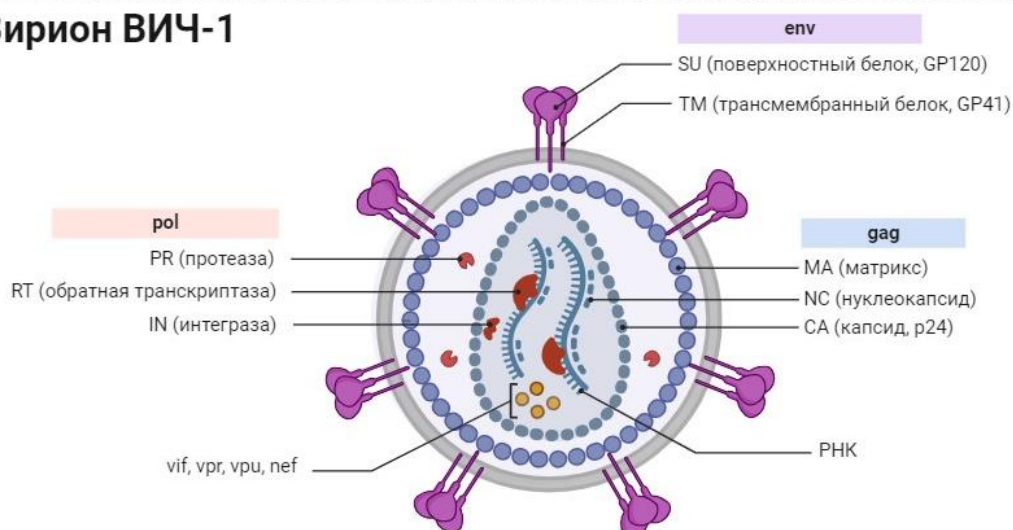


Рисунок 1 – Структура А) генома ВИЧ-1; Б) вириона ВИЧ-1 (Адаптировано “Genome and Structure” в BioRender.com (2024); <https://app.biorender.com/biorender-templates>)

Регуляторные гены, которые считаются дополнительными, не являются абсолютно необходимыми для репликации *in vitro* [15]. Однако за последние годы были проведены исследования, которые позволили более детально изучить и

описать функции этих генов и их белков. Гены *nef*, *tat* и *rev* активируются на ранних стадиях репликативного цикла вируса. Белки *tat* и *rev* накапливаются в ядре, а их функциональная активность связана со взаимодействием со специфическими участками вирусной РНК: *tat* связывается с TAR (элементами ответа на трансактивацию), расположенных в длинных концевых повторах (LTR), а *rev* – с RRE (элементами ответа на *rev*), обнаруженными в гене *env*. Белок *tat* действует как мощный транскрипционный активатор, критически важный для репликации вируса почти во всех системах культивирования *in vitro*. Данный белок активен только в присутствии клеточного кофактора циклина T1 [260]. *Tat* и *rev* стимулируют транскрипцию превращения провирусной ДНК ВИЧ-1 в РНК, способствуют удлинению, а также усиливают транспортировку РНК ВИЧ-1 из ядра в цитоплазму и необходимы для трансляции. Белок *rev* также выступает фактором ядерного экспорта, обеспечивает переход от синтеза регуляторных белков (на ранней стадии) к продукции структурных компонентов вириона (на поздней стадии). Белок *nef* также обладает рядом важных функций. Он способствует снижению экспрессии CD4 и HLA класса I [72] на поверхности зараженных клеток, маскируя их от цитотоксическими CD8-Т-клеток и предотвращая распознавание CD4-Т-клетками. Кроме того, *nef* может подавлять активацию Т-клеток через взаимодействие с белками, участвующими в передаче сигналов внутри клеток [198]. У обезьян, инфицированных вирусом иммунодефицита, интактный ген *nef* был связан с высокой вирусемией и прогрессированием заболевания. При исследовании геномов ВИЧ-1 у австралийских пациентов с длительной непрогрессирующей формой ВИЧ-инфекции, были обнаружены делеции в гене *nef* [132]. Также *nef* участвует в усилении иммунного ответа, который часто наблюдается на острой стадии ВИЧ-инфекции [158].

Белок *vpr* играет важную роль в процессе репликации вируса в неделящихся клетках, таких как макрофаги. Он активирует вирусные и клеточные промоторы, включая LTR. Исследования последних лет продемонстрировали, что *vpr* участвует в транспортировке прединтеграционного комплекса в ядро [172]. Кроме того, этот

белок способен останавливать клеточный цикл в фазе G2, создавая условия для эффективной вирусной репликации.

Белок vpr обеспечивает высвобождение вирионов, участвуя в процессе “почкования” вируса. Научные исследования показали, что мутации в гене белка vpr могут приводить к накоплению вирионов на поверхности клетки-хозяина, так, мембранный белок тетерин (CD317) препятствует выходу вирионов с поверхности клетки-хозяина, однако vpr противодействует тетерину и помогает вирионам покинуть инфицированную клетку [184].

Vif – вирусный белок, который образует комплексы с каталитическим полипептидоподобным 3G ферментом редактирования мРНК аполипопротеина В (APOBEC3G), приводя к инактивации данного фермента [167]. APOBEC3G – это клеточный фермент из семейства цитидиндезаминаз, который входит в систему рестрикции человека, способствуя модификации вирусной ДНК, и представляет собой систему защиты от вирусов. Его механизм основан на дезаминировании цитозина в РНК и ДНК-вирусах, что приводит к преобразованию этого нуклеотида в урацил. В ходе обратной транскрипции урацил распознается как тимин, что вызывает накопление гипермутаций G→A в вирусном геноме. Последствия такой модификации катастрофичны для вируса, так как происходит массовое появление стоп-кодона, в результате чего прерывается синтез полноценных вирусных белков, что в свою очередь приводит к образованию дефектных вирионов. Помимо этого, гипермутации усиливают генетическую нестабильность ВИЧ-1, ограничивая его способность к адаптации. APOBEC3G экспрессируется в лимфоцитах и макрофагах, которые являются первичными клетками-мишенями для ВИЧ-1. В дендритных клетках количество APOBEC3G регулируется их статусом активации, и при созревании дендритных клеток экспрессия APOBEC3G усиливается [202].

Противовирусная активность APOBEC3G высоко консервативна среди различных видов. Белок vif обладает строгой видоспецифичностью в подавлении активности APOBEC3G. Было показано, что белок vif ВИЧ-1 не способен формировать комплексы с APOBEC3G мыши или макаки-резуса. В отсутствие vif APOBEC3G включается в новые вирусные частицы, что приводит к остановке

синтеза провирусной ДНК. Напротив, в присутствии *vif* APOBEC3G связывается с ним и не включается в новые вирионы.

В отличие от вирусной РНК провирусная ДНК ВИЧ-1 имеет в своем составе LTR, расположенные на 5' и 3'-концах молекулы. LTR соединяются с ДНК клетки-хозяина после интеграции. LTR состоят из 3 регионов: U3, R и U5. Область U5 представляет собой последовательности ДНК необходимые для связывания с несколькими факторами транскрипции. Область R содержит элемент ответа на трансактиватор (TAR) – структуру РНК, которая присутствует на 5'-конце всех вирусных транскриптов, одной из ее функций является рекрутирование и связывание вирусного активатора *tat*, в результате чего элонгация транскрипции происходит более эффективно [56]. Трансактивация LTR с помощью *Tat* приводит к повышению уровня транскрипции в несколько сотен раз. Область U3 содержит большинство *cis*-элементов, регулирующих транскрипцию ВИЧ-1, и имеет три функциональных домена: (1) основной домен, который содержит элементы основного промотора, состоящего из ТАТА-бокса, трех сайтов *Sp1* и элемента-инициатора [211]; (2) домен энхансера, который лежит выше от основного домена и содержит два сайта *NF-κB*, важных для более высоких уровней транскрипции активации клетки и (3) модулирующая область, которая содержит сайты связывания для широкого спектра факторов регулирующих транскрипцию [196].

1.1.3 Жизненный цикл вируса

Время от момента проникновения вируса в клетку-мишень до образования новых вирусных частиц называется жизненным циклом вируса. В активированных *CD4+* Т-клетках, основных клеточных мишенях ВИЧ-1, жизненный цикл вируса составляет всего один-два дня и связан с гибелью инфицированных вирусом клеток. Жизненный цикл вируса объясняет некоторые проблемы, связанные с ВИЧ-инфекцией. ОТ вируса имеет высокую частоту ошибок (1 ошибка на 10 000

нуклеотидов), что приводит к формированию высокой гетерогенной популяции (набор квазивидов) внутри одного ВИЧ-инфицированного человека. Сочетание короткого времени генерации и массовой продукции вируса (до 2×10^9 вирионов в день) позволяет ВИЧ-1 эффективно адаптироваться в организме хозяина, вырабатывая устойчивость к АРВП или иммунным реакциям [57]. Кроме этого, интеграция провируса в геном клетки хозяина позволяет вирусу скрываться в долгоживущих клетках иммунной системы. Основной мишенью ВИЧ-1 являются CD4+ Т-клетки, но также могут быть инфицированы и другие типы клеток, в которых время репликации вируса и исход вирусинфицированных клеток различаются. Например, макрофаги могут продуцировать ВИЧ-1 в течение нескольких недель и накапливать инфекционные вирионы внутриклеточно [60; 125].

Продолжительность жизни вирионов ВИЧ-1 вне клетки составляет не более 30 минут, в связи с этим вирусу необходимо быстро найти и инфицировать новую клетку. Основным рецептором для ВИЧ-1 является CD4, а основными корецепторами – хемокиновые рецепторы CCR5 и CXCR4, необходимые для успешного проникновения вируса в клетку-мишень. Несмотря на достаточный уровень экспрессии корецепторов на поверхности клеток, обеспечивающих проникновение вируса, плотность тримеров env на вирионах и CD4 на клетках-мишенях низкая. Таким образом, прикрепление вируса бывает неэффективным и является ограничивающим этапом для ВИЧ-инфекции. Некоторые рецепторы, такие как полигликаны, лектины и другие, способны связывать вирионы ВИЧ-1 неспецифичным образом и тем самым значительно повышают вероятность внедрения ВИЧ-1 в клетку. С одной стороны, они концентрируют вирионы на поверхности клетки и облегчают их взаимодействие с CD4 и корецептором, обеспечивая слияние вирионов. С другой стороны, они могут задерживать вирусные частицы на поверхности клеток, чтобы стабилизировать их и опосредовать трансинфекцию восприимчивых Т-клеток [252].

Проникновение ВИЧ-1 в клетку представляет собой многостадийный процесс, каждый этап которого является потенциальной мишенью для

терапевтического вмешательства [78]. Этот процесс начинается со специфического связывания ВИЧ с клеткой-мишенью и взаимодействия gp120 с клеточным рецептором CD4. Связывание с CD4 вызывает изменения в структуре V3-петли гена *env*, которые позволяют gp120 связываться с CXCR4 (X4) или с CCR5 (R5) корецептором клетки-мишени. В зависимости от того с каким корецептором связывается ВИЧ-1, выделяют вирусы: 1) R5-тропные – взаимодействуют только с CCR5-корецептором; 2) X4-тропные – только с CXCR4-корецептором и 3) R5X4-тропные – как с CCR5, так и с CXCR4-корецепторами. Как правило, при хронической инфекции обнаруживаются вирусы R5-тропности. Вирусы, обладающие X4-тропностью, образуются на поздних стадиях инфекции и связаны с быстрым прогрессированием заболевания при отсутствии АРТ [199]. Взаимодействие gp120 с рецептором CD4 и корецепторами CCR5/CXCR4 запускает каскад структурных перестроек в gp41, в результате которого тримерный комплекс gp41 формирует шестиспиральный пучок, который обеспечивает контакт вирусной и клеточной мембран, а также их слияние и высвобождение нуклеокапсида вируса в цитоплазму инфицированной клетки [178].

После проникновения вируса в клетку начинаются процессы декапсидации (разрушение капсида) и обратной транскрипции. Синтез кДНК происходит в комплексе обратной транскрипции, который включает в себя: вирусную РНК (2 копии) и белки ранней стадии жизненного цикла (RT, IN, vpr и MA) [90]. Обратная транскриптаза – ключевой фермент жизненного цикла ВИЧ-1, который обладает активностью РНК-зависимой ДНК-полимеразы, РНКазы-Н и ДНК-зависимой ДНК-полимеразы, необходимые для преобразования одноцепочечной вирусной РНК ВИЧ-1 в двухцепочечную ДНК [117]. Обратная транскрипция осуществляется в процессе переноса вирусного капсида от клеточной мембраны к ядерной области инфицированной клетки, где происходит высвобождение вирусного генома с последующей интеграцией [278]. Таким образом, закрытый вирусный капсид предотвращает деградацию нуклеиновой кислоты ВИЧ-1 клеточными нуклеазами и защищает от врожденного иммунитета хозяина [208]. Обеспечение процесса обратной транскрипции необходимыми компонентами,

такими как дНТФ, происходит через ядерные поры R18, которые проницаемы даже в интактном капсиде [121]. Закрытая среда внутри капсида способствует эффективной обратной транскрипции, за счет предотвращения потери факторов репликации и дНТФ, которое также способствует эффективному переносу цепей и рекомбинации [176].

В настоящее время существует две модели импорта генетической информации ВИЧ-1 в ядро инфицированной клетки. В одной из них говорится, что вирусное ядро подвергается разборке по пути к ядру клетки-хозяина, что позволяет импортировать ядерный материал. Во второй модели импорт интактного ядра ВИЧ-1 происходит через комплекс ядерных пор посредством их ремоделирования, при котором из него вытесняются Nups, увеличивая диаметр центрального порового канала, что позволяет проникнуть интактному ядру ВИЧ-1 [76]. В данном обзоре будет рассмотрена первая модель, так как исследования, подтверждающие вторую модель еще не закончены.

Вновь синтезированная вирусная ДНК остается связанной с вирусными и клеточными белками в большой нуклеопротеиновый комплекс, называемый комплексом предварительной интеграции (PIC). Помимо вирусной ДНК PIC состоит из вирусных белков (включая *vpr*, MA и IN), белков-хозяев, включая фактор, препятствующий аутоинтеграции (BAF), белки группы высокой подвижности (HMGs), Ku, полипептид 2 α (LAP2 α), и фактор роста LEDGF/p75 [266].

После завершения обратной транскрипции начинается процесс интеграции кДНК ВИЧ-1 в геном инфицированной клетки. IN прочно соединяется LTR в PIC [69]. В процессе интеграции IN удаляет динуклеотиды G-T с каждого 3'-конца вирусной ДНК, образуя свободную 3'-ОН-группу, в результате чего вирусная ДНК готова к интеграции в ДНК клетки-хозяина [141]. В это же время нуклеопротеиновый комплекс использует сеть микротрубочек и активных филаментов для направленного движения к ядерной мембране. После чего с помощью белка импортина, направляющего многие клеточные белки в ядро, происходит энергозависимый активный процесс проникновения PIC в ядро

инфицированной клетки [238]. Следует отметить, что ВИЧ-1 может инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, обладая способностью проникать через неповрежденную ядерную мембрану.

На следующем этапе интеграции в процессе переноса цепи IN использует полученные 3'-ОН-группы вирусной ДНК для разрезания геномной ДНК, после чего два конца вирусной ДНК встраиваются в комплементарные цепи геномной ДНК на расстоянии 5 п.н. друг от друга. Таким образом, ретровирусная интеграция приводит к значительному повреждению клеточной ДНК, которая должна быть немедленно восстановлена для успешной репликации вируса [68]. Репарация геномной ДНК осуществляется с помощью белков Ku70, Ku80, DNA-PKcs и LigIV [36]. Интеграция ВИЧ-1 происходит не случайно, а в предпочтительные для интеграции области генома инфицированной клетки, кодирующие высоко экспрессируемые гены, а также гены, расположенные на открытых участках хромосом [169], а также в нуклеосомы, содержащие модификацию триметилированного гистона 3-лизина 36 [218].

После интеграции провирусная ДНК может оставаться в латентном состоянии или реплицироваться вместе с клеточной ДНК. Латентно инфицированные клетки являются вирусными резервуарами, которые препятствуют эрадикации вируса тем или иным способом. Латентность индуцируется инфицированием покоящихся клеток, не поддерживающих эффективную вирусную транскрипцию, неактивными сайтами провирусной интеграции, эпигенетическим сайленсингом и дифференцировкой инфицированных эффекторных иммунных клеток в покоящиеся клетки памяти, соответственно [82].

Провирус ВИЧ-1, интегрированный в геном клетки-хозяина, зависит от транскрипционного аппарата клетки-хозяина. Полноразмерная РНК содержит девять перекрывающихся ORF и подвержена альтернативному сплайсингу для синтеза вирусных мРНК. Все мРНК подразделяются на три класса: (I) полноразмерные, не сплайсированные ~9 т.п.н. мРНК, (II) содержащие интрон, частично сплайсированные ~4 т.п.н. мРНК и (III) неинтронные, полностью

сплайсированные ~2 т.п.н. мРНК. Несплайсированная полноразмерная РНК служит матрицей для синтеза структурных белков (gag, gag-pol), частично/полностью сплайсированные мРНК кодируют вирусные белки nef, rev, tat, белок-предшественник env, vpr, vif и vpr [85; 188].

Только полностью сплайсированные мРНК могут покинуть ядро через ядерные поры, поэтому на ранней стадии репликативного цикла вируса синтезируются белки tat, rev и nef, которые в дальнейшем способствуют более эффективной репликации ВИЧ-1. Белок tat активирует и стимулирует транскрипцию провируса путем взаимодействия с клеточными кофакторами в структуре TAR-РНК, что приводит к образованию полноразмерной РНК, готовой к инкапсуляции или служащей в качестве матрицы для альтернативного сплайсинга. Rev способствует экспорту RRE-содержащих частично сплайсированных РНК, переключая экспрессию вирусных белков на белки, необходимые для производства новых вирионов, таких как p55-gag, p160-gag-pol, а также vif и vpr [91; 154; 183].

Gag состоит из четырех структурных элементов: N-концевого домена MA, домена CA, домена NC, окруженного двумя пептидами (SP1 и SP2), и C-концевого домена р6. Каждый домен выполняет определенные функции во время сборки и почкования вирусной частицы посредством взаимодействий с вирусными и клеточными белками и РНК. Внутримолекулярные и межмолекулярные взаимодействия РНК и Gag опосредуют избирательную упаковку вирусного генома в собирающиеся частицы. Комплекс gag-РНК перемещается к плазматической мембране и интегрируется посредством N-концевого миристоилирования, присутствующего в домене MA. Сборка Gag на плазматической мембране также индуцирует удержание тримеров env в местах сборки, опосредованное взаимодействием между MA и C-хвостом белка Env [179]. В дополнение к env, домен р6 gag захватывает vpr [251]. Растущий мультимер gag изгибает мембрану и образует сферическую зарождающуюся частицу, все еще прикрепленную к клеточной мембране. Однако для высвобождения частицы ВИЧ-1 пользуется клеточными эндосомальными сортировочными комплексами, необходимые для

транспортного механизма (ESCRT). Комплекс ESCRT сжимает мембрану и катализирует высвобождение незрелой частицы [119].

Вирусная частица созревает и реорганизует свои структурные белки, РНК и ферменты, что приводит к образованию инфекционного вириона. Процесс созревания начинается с аутоактивации PR, которая последовательно расщепляет белки-предшественники gag и gag-pol, в результате чего высвобождаются вирусные ферменты (PR, RT и IN) и структурные белки (p17-MA, p24-CA и p7-NC) [203]. Структурные изменения обязательны для вирусной инфекционности. Белок NC плотно связывается с РНК ВИЧ-1 и стабилизирует связь между двумя молекулами РНК [174]. Белки CA собираются вокруг комплекса NC-РНК, инкапсулирующего вирусный геном, а также RT и IN. Вирион ВИЧ-1 завершает заражение клетки и теперь готов к новому циклу репликации [177].

1.2 Механизмы генетической изменчивости ВИЧ-1

Популяции ВИЧ-1 характеризуются большим генетическим и антигенным разнообразием, необходимым для уклонения от факторов иммунной системы и терапии, которое является одним из основных препятствий на пути к удалению вируса из организма человека. Генетическое разнообразие ВИЧ-1 внутри подтипа обычно составляет около 8–17% и может достигать 30%, тогда как разнообразие между подтипами вируса обычно составляет около 17–35% и может достигать 42%. Генетическое разнообразие квазивидов ВИЧ-1 у инфицированного индивидуума на поздних стадиях заболевания сопоставимо с глобальной ежегодной генетической изменчивостью вируса гриппа [139].

В случае ВИЧ большинство мутаций возникает либо из-за склонной к ошибкам обратной транскриптазы [124], либо из-за действия белков клетки-хозяина, вовлеченных в противовирусный иммунный ответ, таких как APOBEC3G [272]. Также существует дополнительный механизм генетического разнообразия,

называемый рекомбинацией, когда происходит обмен фрагментами генома между разными генетическими вариантами ВИЧ. Данный процесс эффективно перетасовывает мутации внутри квазивидов. Рекомбинация может быстро собирать полезные для вируса генетические комбинации, которые было бы трудно создать с помощью одних мутаций, но, помимо этого, она также может эффективно удалять вредные мутации, которые в противном случае привели бы к снижению вирусного фитнеса.

1.2.1 Генетическая изменчивость ВИЧ-1, связанная с обратной транскриптазой

Как было сказано ранее фермент вируса обратная транскриптаза совместно с высокой скоростью репликации вируса являются причиной образования частых мутаций в геноме вируса. Проведенные *in vitro* и *in vivo* исследования показали, что частота мутаций ВИЧ-1 в среднем составляет $1.4-3 \times 10^{-5}$ ошибок на пару оснований за цикл репликации [33]. Кроме того, на скорость возникновения мутаций может влиять клеточная среда, например, обработка клеток-мишеней гидроксимочевинной и рибонуклеотидредуктазой приводила к дисбалансу уровней дНТФ и примерно к двукратному увеличению частоты мутаций ВИЧ-1 [128]. Внутриклеточная среда в разных клетках-мишенях ВИЧ-1 также различается. Так, в терминально дифференцированных клетках, например, в макрофагах, уровни дНТФ гораздо ниже и несбалансированы по сравнению с активно делящимися клетками, такими как Т-клетки. Кроме того, терминально дифференцированные типы клеток имеют несбалансированный внутриклеточный пул дНТФ с избытком дУТФ (урацила) [244]. Урацил является естественным основанием в РНК, но обычно не содержится в ДНК. Тем не менее, он может быть встроен в ДНК из-за неспособности ОТ различать дТТФ и дУТФ.

1.2.2 Генетическая изменчивость ВИЧ-1, связанная с белками семейства АРОВЕС

Вторым механизмом, приводящим к мутациям ВИЧ-1 являются антивирусные белки семейства АРОВЕС. В ранних исследованиях мутационного спектра ВИЧ были обнаружены геномные последовательности ретровирусов с аномально высокой частотой замен, в которых до 40% оснований гуанинов были замещены аденинами [253]. Изначально предполагали, что это происходит из-за дисбаланса дНТФ в клеточной среде [254]. Однако последующие работы продемонстрировали, что ключевым механизмом гипермутации является модификация цитозина ферментами АРОВЕС, которые в ходе обратной транскрипции дезаминируют цитозин [73]. Дезаминирование цитозина приводит к его превращению в тимин в дезаминированной цепи и переходе гуанина в аденин в комплементарной цепи [237]. Стоит отметить, что дезаминирование цитозина ферментами семейства АРОВЕС не является случайным (Рисунок 2). АРОВЕС3G отдает предпочтение остатку цитозина в динуклеотиде СС минус-цепи, что приводит к мутации GG в AG в плюс-цепи [111]. АРОВЕС3В, АРОВЕС3С и АРОВЕС3F нацелены на динуклеотид СТ, что приводит к переходу GA в AA в плюсовой цепи [52]. АРОВЕС3DE ориентирован на динуклеотид СG, что приводит к преобразованию GC в AC в плюсовой цепи [73].

Неструктурный белок *vif* ВИЧ-1 играет важную роль в противодействии защитным механизмам хозяина. Его анти- АРОВЕС активность реализуется через два взаимодополняющих механизма: 1) через убиквитин-зависимый каскад направляет белки семейства АРОВЕС в протеасомный комплекс для их последующей деградации [93; 269]; 2) снижает образование растворимых форм АРОВЕС-белков, препятствуя их свободному перемещению в цитоплазме и взаимодействию с формирующимися вирионами [255]. Ограниченное влияние белков семейства АРОВЕС может способствовать генетическому разнообразию

ВИЧ-1 и, таким образом, приносить пользу, облегчая уход от клеточного иммунитета или АРТ [122].

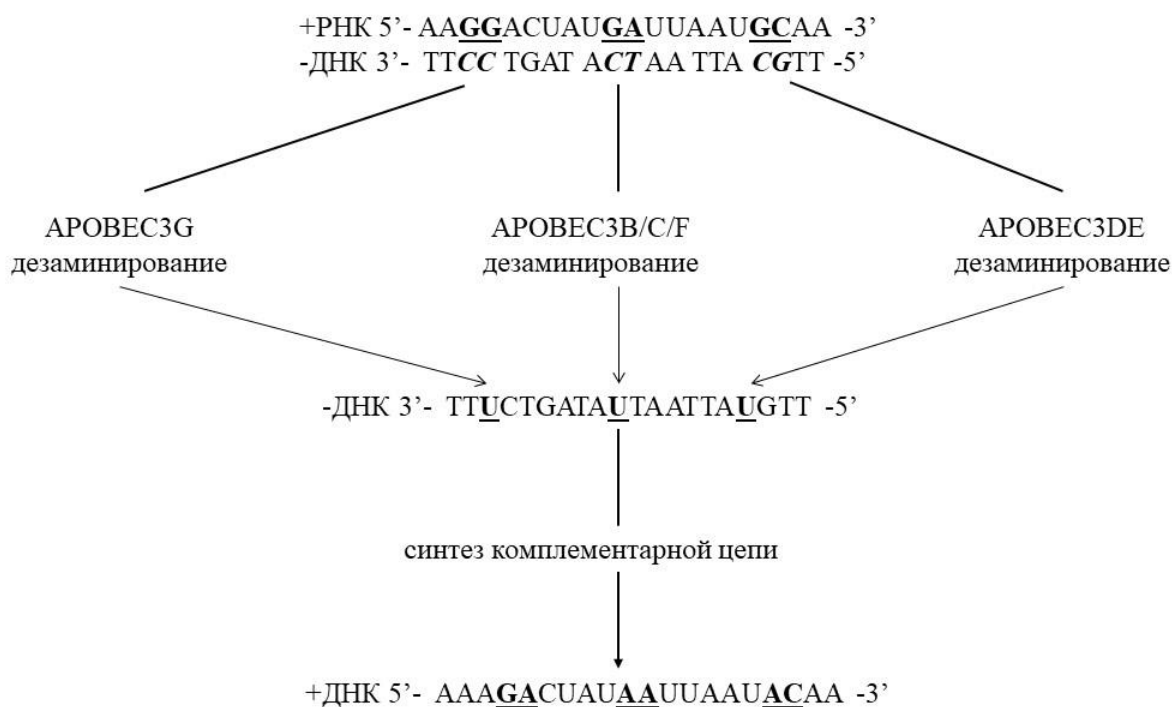


Рисунок 2 – АРОВЕС-опосредованные мутации в геноме ВИЧ-1

(Адаптировано из [231])

1.2.3 Генетическая изменчивость ВИЧ-1, возникающая в результате рекомбинационного процесса

Последним механизмом, обуславливающим высокое генетическое разнообразие ВИЧ-1, является рекомбинация. Данный процесс может происходить благодаря способности обратной транскриптазы переключаться между матрицами РНК в процессе синтеза провирусной ДНК [189]. Эффективная рекомбинация возникает из-за совместной упаковки двух копий РНК в каждый вирион. При коинфицировании клетки-мишени двумя или более генетически различными вариантами ВИЧ-1, генетический материал от разных вариантов вируса может быть совместно упакован, формируя гетерозиготный вирион. Во время

последующей обратной транскрипции вирусный фермент ОТ может легко переключаться между двумя копиями РНК, образуя при этом мозаичную молекулу ДНК, объединяющую фрагменты нескольких генетических вариантов ВИЧ-1 [118].

В отличие от медленных и устойчивых изменений, вызванных мутационной изменчивостью, рекомбинационная изменчивость является механизмом быстрых и масштабных генетических изменений. Во-первых, рекомбинация может восстанавливать повреждения вирусных геномов [273]. Это может быть физическое восстановление при разрывах генома с помощью механизма принудительного выбора копии или генетической репарации геномов, в которых накопились вредные мутации. Во-вторых, рекомбинация может как создавать, так и поддерживать генетическое разнообразие в популяции. Рекомбинация создает новое разнообразие путем перетасовки ранее существовавших мутаций внутри популяции, генерируя сложные комбинации мутаций. Рекомбинация также поддерживает генетическое разнообразие, разрушая физические связи между полезными и вредными мутациями, с сохранением полезных. В-третьих, рекомбинация может ускорить адаптацию, устраняя конкуренцию между полезными мутациями [230]. Рекомбинация между различными субтипами ВИЧ-1 может способствовать появлению новых эпидемиологически важных штаммов, которые, в свою очередь, могут становиться прародителями рекомбинантов второго поколения. Так, ВИЧ-1 CRF07_BC впервые был выделен в Китае от ПИН, в среде которых вирус широко распространился и вскоре вышел за пределы данной группы. Распространенность данного геноварианта ВИЧ-1 после 2020 года в некоторых регионах Китая, таких как Сычуань, Аньхой и Фуцзянь, достигла 28,8%, 41,4% и 52,1% соответственно [63; 170; 234; 276; 277]. Кроме этого, по последним данным ВИЧ-1 CRF07_BC является основателем для 20 и более рекомбинантов второго поколения, одним из которых является CRF172_0155, который был недавно выявлен среди MSM (мужчины, практикующие секс с мужичнами) в Китае [156]. Таким образом, ретровирусная рекомбинация – основная движущая сила эволюции и генетического разнообразия ВИЧ-1, которая происходит со скоростью 2,8 и более кроссинговеров на геном за цикл [273].

Существует несколько моделей рекомбинации, в результате которых происходит синтез минус-цепи ДНК: "принудительный выбор копии", "выбор копии" и "динамический выбор копии". Эти модели не являются взаимоисключающими и могут рассматриваться как варианты одного и того же механизма (Рисунок 3), так как в их основе лежит способность РНК-зависимой ДНК-полимеразы переключаться между двумя копиями геномной РНК ВИЧ-1. В основе модели «принудительного выбора копии» лежит идея о том, что ОТ при обнаружении повреждения (например, делеции, стоп-кодона) на одной цепи РНК переключается на неповрежденную матрицу, в результате чего синтезируется полноразмерная минус-цепь ДНК без повреждений.

Особенности нуклеотидной последовательности геномной РНК (присутствие гомополимерных участков), а также их структура (наличие шпилек) [44], которые усложняют дальнейший синтез минус-цепи ДНК способствуют переходу ОТ с одной матрицы РНК на другую [206]. Позиции, в которых ОТ сталкивается с «препятствиями», называются сайтами паузы [265]. Особенности работы ОТ в подобных условиях служат основанием для существования модели «выбора копии».

Модель "выбора копии" была расширена и получила название "динамический выбор копии", которая основана на двойной функции работы ОТ – синтезе ДНК и разрушения РНК в комплексе РНК-ДНК. Было обнаружено, что когда РНК разрушается быстрее, чем создаётся ДНК, то процесс переключения матрицы ускоряется. И наоборот, если РНК синтезируется быстрее, чем распадается, то переключение матрицы замедляется. Таким образом, частота рекомбинационных событий напрямую связана со скоростями синтеза минус-цепи ДНК и дегградации РНК в комплексе РНК-ДНК [239].

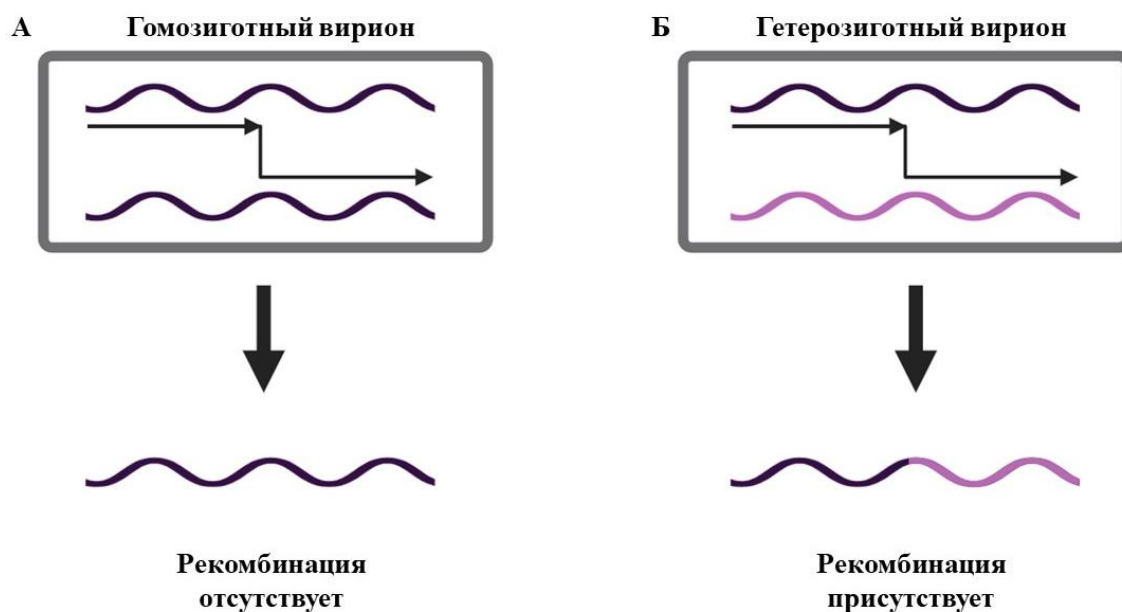


Рисунок 3 – Механизм рекомбинации: смена матрицы считывания во время процесса обратной транскрипции (Адаптировано из [70])

На сегодняшний день частая рекомбинация между различными генетическими вариантами ВИЧ-1 привела к образованию множества рекомбинантов, включая более 170 CRFs и еще большее количество уникальных URFs. Для того, чтобы ВИЧ-1 был классифицирован как CRF, они должны соответствовать следующим требованиям: 1) наличие двух и более полноразмерных последовательностей генома (от начала *Gag* до конца *Nef*), причем все эти последовательности должны быть выделены от трех эпидемиологически не связанных пациентов; 2) картина рекомбинации всех последовательностей должна иметь одинаковую структуру; 3) все последовательности (и сегменты последовательностей) должны группироваться вместе на филогенетическом дереве, т.е. должны быть связаны [212]. Если рекомбинант не соответствует этим критериям, он называется URF.

Механизм рекомбинации несет некоторые преимущества для всех вирусов, в том числе и для ВИЧ. Так, новый вариант вируса может избегать иммунных реакций человеческого организма. Помимо этого, некоторые рекомбинантные

формы могут быть более патогенными и приспособленными, а также обладать высокой способностью к репликации [259].

Различные механизмы изменчивости ВИЧ в сочетании с высокой скоростью репликации и передачей среди определенных групп лиц (ЛУИН, коммерческие секс-работники) привели к большому генетическому разнообразию вируса и его быстрому распространению по всему миру [131].

1.3 Резистентность ВИЧ-1 к лекарственным препаратам и механизмы ее возникновения

Появление АРТ произвело революцию в лечении ВИЧ, а ее широкое внедрение быстро привело к резкому снижению заболеваемости и смертности в развитых странах мира [191]. АРТ подавляет репликацию вируса и снижает вирусную нагрузку ВИЧ-1 в плазме крови ниже пределов обнаружения (<50 копий РНК/мл), что приводит к значительному восстановлению иммунной системы [41], измеряемому увеличением циркулирующих CD4+ Т-лимфоцитов. Для достижения недетектируемой вирусной нагрузки применяют терапию с использованием трех АРВП, направленных как минимум на две различные молекулярные мишени, что является основой для предотвращения/снижения развития лекарственной устойчивости.

При надлежащем следовании назначенной врачом схеме лечения (далее приверженность) АРТ может подавлять репликацию вируса на долгие годы, что значительно продлевает жизнь людей, живущих с ВИЧ. Однако АРТ не способствует элиминации вируса из организма человека. ВИЧ-инфекция — это хроническое заболевание, от которого нет лекарства, и перспектива продолжения терапии в течение всей жизни пациента сопряжена с серьезными проблемами. Эффект терапии может быть снижен из-за отсутствия приверженности, плохой переносимости препаратов и лекарственного взаимодействия между АРВП и

другими лекарственными препаратами, снижающими оптимальный уровень АРВП в крови. Каждый из этих факторов может привести к вирусологической неудаче и развитию лекарственной устойчивости.

Современная АРТ включает 7 классов препаратов, нацеленных на ключевые этапы жизненного цикла ВИЧ-1. Их классификация основана на молекулярных мишенях и механизмах действия: (1) ингибиторы обратной транскриптазы, аналоги нуклеозидов (НИОТ), (2) ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ), (3) ингибиторы интегразы (ИИ), (4) ингибиторы протеазы (ИП), (5) ингибиторы слияния, (6) антагонисты корцепторов [40] и (7) ингибиторы капсида [248].

Способность к образованию большого числа новых вирусных частиц, а также высокий уровень генетической изменчивости позволяют ВИЧ-1 обходить иммунную систему и способствуют развитию устойчивости к АРВП. Мутации лекарственной устойчивости ВИЧ-1 возникают в мишени, на которую направлено действие препарата, и могут влиять на репликационную способность вируса. Устойчивость ВИЧ-1 к АРВП может быть приобретена вирусом в результате селективного давления препарата (приобретенная/вторичная резистентность), или ВИЧ-1 с уже сформированными мутациями лекарственной устойчивости может передаваться от одного человека к другому, в этом случае вирус у впервые инфицированного человека будет обладать передаваемой/первичной резистентностью. До массового внедрения АРТ в клиническую практику ВИЧ-1, не подвергавшиеся селективному давлению АРВП, но при этом имеющие мутации резистентности, встречались редко [240]. Однако с увеличением охвата АРТ растёт и выявляемость ВИЧ-1 с первичной резистентностью [80; 153; 201].

Устойчивость ВИЧ-1 к АРВП, как правило, ограничена в рамках одного класса, так как мутации резистентности специфичны для конкретной мишени, поэтому вирусы с высокой устойчивостью к препаратам одного класса чувствительны к препаратам из другого класса. В случае с ингибиторами обратной транскриптазы, НИОТ и ННИОТ, часто наблюдается синергический эффект в лабораторных условиях, поскольку вирусы, устойчивые к НИОТ, часто становятся

более чувствительными к ННИОТ [262], и наоборот, вирусы, устойчивые к ННИОТ, иногда становятся более чувствительными к НИОТ [149]. Напротив, в каждом из классов лекарств часто наблюдаются высокие уровни перекрестной резистентности, то есть большинство мутаций, вызывающих устойчивость к АРВП, снижают восприимчивость не к одному, а к нескольким АРВП того же класса.

В зависимости от количества мутаций, необходимых для формирования резистентности в сочетании с частотой, с которой они возникают, АРВП подразделяют на препараты с высоким и низким генетическим барьером. В случае, когда для развития резистентности достаточно одной мутации, такие антиретровирусные препараты называют препаратами с низким генетическим барьером. Если же для развития резистентности требуется несколько мутаций, то такие препараты называют препаратами с высоким генетическим барьером. Мутации, которые делают вирус устойчивым к антиретровирусным препаратам, можно разделить на два типа: 1) первичные (major) и дополнительные (accessory/minor). Первичные мутации напрямую нарушают взаимодействие препарата с мишенью, часто снижая скорость репликации вируса. Дополнительные мутации косвенно усиливают резистентность, наоборот повышая репликационную способность [240].

Номенклатура мутаций ВИЧ является традиционной для молекулярной биологии: каждая мутация обозначается однобуквенным кодом для эталонной аминокислоты дикого типа, за которым следует положение аминокислоты, за которым следует однобуквенный код для аминокислотной мутации, обнаруженной в измененной последовательности. Например, мутация обратной транскриптазы "M184V" указывает на то, что вместо метионина (ATG; M) в положении 184 расшифрованный фрагмент генома вируса содержит валин (GTG; V). Поскольку прямое ПЦР-секвенирование выполняется на популяции вирусных геномов, нередко можно обнаружить более одной аминокислоты в определенном положении. Например, обозначение "M184M/V" означает, что вирусы как с метионином, так и с валином были обнаружены в позиции 184.

1.3.1 Ингибиторы обратной транскриптазы: механизм действия и некоторые их представители

Первой мишенью для разработки АРВП стала ОТ, на которую нацелены два различных класса препаратов: НИОТ, которые являются аналогами нативных нуклеозидных субстратов, и ННИОТ, которые связываются с некаталитическим аллостерическим карманом на ферменте. Несмотря на то, что НИОТ и ННИОТ имеют разные точки контакта с ферментом и отличаются по молекулярному механизму действия, оба эти вещества препятствуют синтезу дезоксирибонуклеотидов на матрице ДНК и останавливают образование полноразмерной вирусной ДНК.

НИОТ вводятся в виде пролекарств и для проявления противовирусного эффекта им необходимо проникнуть в клетку-мишень и быть активированными клеточными киназами. Существует два механизма устойчивости к этому классу препаратов: (1) распознавание, при котором ОТ способна избегать активированные НИОТ, сохраняя при этом способность распознавать аналогичный природный субстрат дНТФ, что предотвращает включение НИОТ в растущую цепь вирусной ДНК; и (2) усиленное фосфоролитическое удаление НИОТ, с 3'-конца вирусной ДНК. Мутации, возникающие по второму механизму, развиваются в ответ на прием зидовудина (AZT) и ставудина (d4T) и известны как мутации аналогов тимидина (TAMs) [240]. При этом многие первичные и вторичные мутации к НИОТ (или их комбинации) снижают как функциональную активность ОТ, так и способность вируса к репликации [205].

ННИОТ ингибируют ОТ ВИЧ-1 путем связывания с некаталитическим аллостерическим карманом на ферменте и индуцирования образования гидрофобного кармана, расположенного проксимально к активному участку, но не перекрывающего его [241]. Эти соединения аллостерически подавляют репликацию ВИЧ-1, смещая каталитические остатки аспарагиновой кислоты относительно сайта связывания с полимеразой, что приводит к снижению ее

активности. Мутации устойчивости к ННИОТ нарушают контакт между ингибитором и ферментом. Это может происходить с помощью трех механизмов: (1) они могут блокировать попадание ингибитора в карман для связывания ННИОТ (например, K103N), (2) они могут влиять на контакты между ингибитором и остатками, которые выстилают карман для связывания ННИОТ (например, Y181C), или (3) они могут изменять конформацию или размер кармана для связывания ННИОТ, так что он становится менее специфичным для ингибитора (например, Y188L). Некоторые мутации устойчивости могут влиять на связывание ННИОТ с помощью более чем одного механизма [81].

Устойчивость к ННИОТ встречается чаще, чем к другим классам АРВП, и является серьезным ограничением для их применения. При ННИОТ однонуклеотидные изменения могут привести к высокому уровню резистентности лишь с незначительной потерей репликативной приспособленности [83]. Низкий генетический барьер и минимальное воздействие на способность к репликации ВИЧ, а также медленная реверсия этих мутаций у ЛЖВ в отсутствие АРВП способствуют сохранению устойчивости ВИЧ-1 к ННИОТ в популяции и его распространению [242].

1.3.2 Ингибиторы протеазы: механизм действия и некоторые их представители

Еще одной мишенью для АРТ является вирусный фермент протеаза. ИП блокируют образование зрелых белков, образующихся в результате расщепления вирусных предшественников gag и полипротеина gag-pol, в результате чего вирусная частица становится неинфекционной [236]. Все ИП имеют относительно сходную химическую структуру, вследствие чего наблюдается перекрестная устойчивость ВИЧ между препаратами этого класса. Устойчивость вируса к ИП развивается поэтапно. На первом этапе возникают аминокислотные замены в

субстрат-связывающей щели вирусной протеазы или вблизи нее, например, в кодонах 30, 50, 82 или 84. Было показано, что эти мутации устойчивости в основном отбираются в тех положениях, где ИП выступают за пределы субстрат-связывающей щели, находятся в непосредственном контакте с ингибитором и приводят к общему расширению каталитической [181]. Мутации устойчивости, которые отбираются на первом этапе и снижают восприимчивость к ИП, называются первичными или “основными” мутациями устойчивости. На втором этапе возникают компенсаторные или “незначительные” мутации, например, в кодонах 20, 36 и 71, которые сами по себе не оказывают существенного влияния на лекарственную устойчивость, но улучшают устойчивость и/или репликацию вирусов, содержащих основные мутации [126]. Иногда во время приема ИП в различных участках последовательности вирусной протеазы появляются аминокислотные вставки в диапазоне от 1 до 6 аминокислот. Эти вставки могут проявляться как полиморфизм и могут рассматриваться как незначительные мутации, поскольку они незначительно улучшают репликацию вируса и способствуют устойчивости к ИП только в сочетании с другими мутациями либо в протеазе, либо в *gag* ВИЧ-1. Наличие этих вставок положительно коррелирует с мутациями устойчивости к протеазам, приводящими к снижению чувствительности к современным ИП, таким как атазанавир (ATV) или типранавир (TPV) [140]. Необходимость наличия одной или более основных и одной или более дополнительных мутаций устойчивости к ИП в сочетании с мутациями в месте расщепления Gag объясняет высокий генетический барьер для ИП.

1.3.3 Ингибиторы интегразы: механизм действия и некоторые их представители

Последним классом препаратов широкоприменяемых в России являются ИИ, которые препятствуют интеграции ДНК ВИЧ-1 в геном клетки-хозяина,

критически важному этапу жизненного цикла вируса. Механизм их действия заключается в том, что ингибитор избирательно связывается с комплексом, состоящим из интегразы и вирусной ДНК, после чего взаимодействует с ионами магния в активном центре интегразы, которые необходимы для каталитической активности фермента, тем самым блокируя активность интегразы. Все препараты этой группы состоят из двух основных компонентов: металлосвязывающего фармакофора, который изолирует активный центр фермента, и гидрофобной группы, которая взаимодействует с вирусной ДНК и ферментом в PIC [104]. ИИ первого поколения, ралтегравир (RAL) и элвитегравир (EVG), являются сильнодействующими и хорошо переносимыми препаратами, но было показано, что у до 60% ВИЧ-инфицированных лиц, длительное время принимавших эти препараты, выявляются к ним мутации резистентности. Для развития резистентности к RAL и EVG достаточно одной аминокислотной замены в области интегразы, чтобы обеспечить высокий уровень устойчивости к этим препаратам, что говорит об их низком генетическом барьере. В отличие от ИИ первого поколения препараты второго поколения, долутегравир (DTG) и биктегравир (BIC), обладают высоким генетическим барьером [37]. Мутации, вызывающие устойчивость к ИИ, почти всегда локализуются в активном центре интегразы вблизи аминокислотных остатков, которые координируют основные кофакторы магния [110]. Таким образом, эти мутации оказывают вредное воздействие на ферментативную функцию и способность вируса к репликации [168].

1.3.4 Ингибиторы проникновения: механизм действия и некоторые их представители

Также существуют АРВП, которые ингибируют проникновение вируса в клетку-мишень, а именно: ингибиторы проникновения, ингибиторы слияния, а

также блокаторы корецепторов. Эти группы препаратов назначают редко и обычно в тех случаях, когда к остальным классам уже развилась резистентность. На основе открытия о том, что для слияния вирусного белка gp41 необходимо взаимодействие двух гомологичных доменов, были созданы ингибиторы слияния пептидов. Эти соединения имитируют один из доменов, но не являются его частью. В результате они могут связываться с вирусным белком и нарушать его взаимодействие с другими участками. Дизайн спиральных ингибиторов, в конечном итоге, позволил получить молекулу (Т-20, энфувиртид) с мощной противовирусной активностью *in vivo* [146]. Мутации, которые придают устойчивость к энфувиртиду, приводят к снижению репликации, предположительно потому, что мутации, которые снижают связывание энфувиртида, также снижают эффективность образования шестиспиральных пучков и общую скорость слияния [210]. Эти мутации не обладают перекрестной резистентностью с другими ингибиторами проникновения (ингибиторам прикрепления или ингибиторам корецепторов) [209].

Низкомолекулярные антагонисты CCR5 относятся к блокаторам корецепторов и связываются с гидрофобными карманами внутри трансмембранных спиралей CCR5 [247]. Связывание лекарственного средства индуцирует и стабилизирует конформацию рецептора, которая не распознается ВИЧ. Маравирок (MVC), единственный препарат в этом классе, взаимодействует с гидрофобным трансмембранным карманом CCR5. Это взаимодействие приводит к изменению конформации второй внеклеточной петли рецептора и предотвращает связывание с петлёй V3 gp120 [138]. Поскольку MVC связывается с белком клетки-хозяина, устойчивость к нему отличается от устойчивости к другим АРВП. Потенциальные механизмы резистентности включают (1) переключение тропизма (использование CXCR4 вместо CCR5 для проникновения), (2) повышенное сродство к корецептору, (3) использование связанного с ингибитором рецептора для проникновения и (4) более высокую скорость проникновения.

1.3.5 Ингибитор капсида, механизм действия

Единственный представитель класса ингибиторов капсида – Ленакапавир (LEN) был одобрен FDA в декабре 2022 г. LEN в комбинации с другими АРВП показан для лечения ВИЧ-инфекции, вызванной ВИЧ-1 с множественной лекарственной устойчивостью, у взрослых лиц с большим опытом лечения, которые сталкиваются с неэффективностью текущей АРТ из-за резистентности или непереносимости [248]. LEN является многоступенчатым селективным ингибитором капсидной функции ВИЧ-1. Он связывается с гидрофобным карманом CA, образованным двумя соседними субъединицами CA внутри гексамера, стабилизируя ядро CA и предотвращая связывание клеточных кофакторов (CPSF6 и Nup153) [50]. LEN воздействует на несколько ключевых этапов жизненного цикла вируса ВИЧ-1. Так, LEN стабилизирует капсид, предотвращая его естественную дезинтеграцию после проникновения в клетку, вмешивается в функционирование Gag/Gag-Pol, тем самым нарушая выработку субъединиц капсидного белка вирусной протеазой, а также изменяет кинетику ассоциации субъединиц, что приводит к формированию неправильно собранных капсидов. В настоящее время есть данные по возникновению мутаций резистентности к LEN, полученные на культурах клеток. Первый механизм связан с боковой цепью His67: при возникновении мутации Q67H боковая цепь His67 не переходит в открытую конформацию, в результате чего LEN не может с ней провзаимодействовать. Второй механизм связан с изменением структуры сайта связывания с LEN в гидрофобном кармане CA [51]. Помимо этого, было показано, что противовирусная активность LEN в отношении ВИЧ-2 в 15-25 раз ниже, чем к ВИЧ-1 [161].

Эффективность АРТ зависит от активности отдельных АРВП и количества мутаций ВИЧ-1, необходимых для развития устойчивости. Первичная устойчивость ВИЧ-1 к АРВП может снижать эффект АРТ первого ряда, если у вируса уже имеются мутации к этим АРВП. У пациентов, получающих начальную

схему АРТ на основе препаратов с высоким генетическим барьером для развития резистентности, наиболее распространенными причинами неэффективности АРТ являются отсутствие приверженности и, возможно, фармакологические влияния других препаратов, принимаемых пациентом. Учитывая количество препаратов, а также разнообразие мишеней, на которые они воздействуют, большинство ВИЧ-инфицированных пациентов, даже те, у кого был неудачный опыт приема АРТ, могут успешно достигнуть недетектируемого уровня вирусной нагрузки. Однако, поскольку вирус продолжает эволюционировать и ускользать даже при самых эффективных методах лечения, всегда будут требоваться новые методы лечения ВИЧ-1.

1.4 Характеристика современной эпидемии ВИЧ-инфекции в мире

ВИЧ-инфекция остается серьезной глобальной проблемой общественного здравоохранения. С начала эпидемии 88,4 млн (71,3–112,8 млн) человек были инфицированы ВИЧ и около 42,3 млн (35,7–51,1 млн) человек умерли от ВИЧ при продолжающейся передаче инфекции во всех странах мира; при этом некоторые страны, такие как ЮАР, Мозамбик, Нигерия, Индия и Россия, сообщают о растущих тенденциях в отношении новых случаев инфицирования, в то время как ранее этот показатель снижался.

По оценкам на конец 2023 года насчитывалось 39,9 млн (36,1–44,6 млн) человек, живущих с ВИЧ. В 2023 году 630 тыс. (500–820 тыс.) человек умерли от причин, связанных с ВИЧ, а 1,3 млн (1,0–1,7 млн) человек заразились ВИЧ [250].

СПИД — это глобальная пандемия, вызываемая ВИЧ-1 и ВИЧ-2, которые были занесены в результате множественной межвидовой передачи вирусов иммунодефицита обезьян от нечеловеческих приматов к человеку [223]. Впервые ВИЧ-1 был обнаружен в окрестностях Киншасы, которая сейчас является частью Демократической Республики Конго, примерно в 1920-х годах. Оттуда он начал

распространяться по транспортным путям в другие регионы Африки, расположенные к югу от Сахары, включая Западную Африку, Европу и другие части света [89].

До начала 2000-х годов ВИЧ-инфекция, вызванная ВИЧ-1 субтипов С, А и В, регистрировалась в 48%, 25% и 16% случаев соответственно, оставшиеся 11% приходились на ВИЧ-1 субтипа D, E и другие [194]. Важно отметить, что в этот период генотипирование вируса проводили на основе фрагмента гена *env*, в то время как в настоящее время оценку генетического разнообразия ВИЧ-1 проводят на основе фрагмента гена *pol*, кодирующего протеазу и ОТ вируса, ставшими первыми мишенями для разработки АРВП.

За последние два десятилетия произошли значительные изменения в циркуляции вируса. Так, анализ всех случаев заражения ВИЧ-1 в мире за период с 2010 по 2021 гг. показывает, что субтип С является причиной 23% случаев, субтип В – за 9%, субтип А – за 17%, CRF01_AE – за 9%, CRF02_AG – за 7%, другие CRFs и URFs – за 12% [263]. Стоит отметить, что ВИЧ-2 встречается преимущественно в Западной Африке, хотя были зарегистрированы случаи обнаружения этого вируса в других странах, таких как Португалия, Франция, Индия и США [256].

Африка, являющаяся эпицентром пандемии ВИЧ, демонстрирует уникальное распределение субтипов и рекомбинантных форм вируса [101, 159], связанное с длительной эволюцией вируса в регионе, которая продолжается до сих пор. Так, в Кении сообщается об увеличении распространения ВИЧ-1 субтипа С и снижении субтипа D наряду с обширной межсубтипной рекомбинацией [102]. Недавнее исследование на основе полноразмерных последовательностей ВИЧ, проведенное в Уганде, показало, что на данной территории возросла распространенность межсубтипных рекомбинантов ВИЧ-1 примерно на 46% [151]. В Западной и Западно-Центральной Африке большинство вирусов является CRF02_AG. Субтипы А и G совместно циркулируют в некоторых странах, таких как Нигерия. В Камеруне было зарегистрировано самое большое количество различных геновариантов вируса, так, более 80% новых случаев инфицирования ВИЧ-1 среди

доноров крови в 2004 году было вызваны CRFs и различными URFs, которые в своем геноме содержат сегменты субтипа G (Рисунок 4) [49; 159].

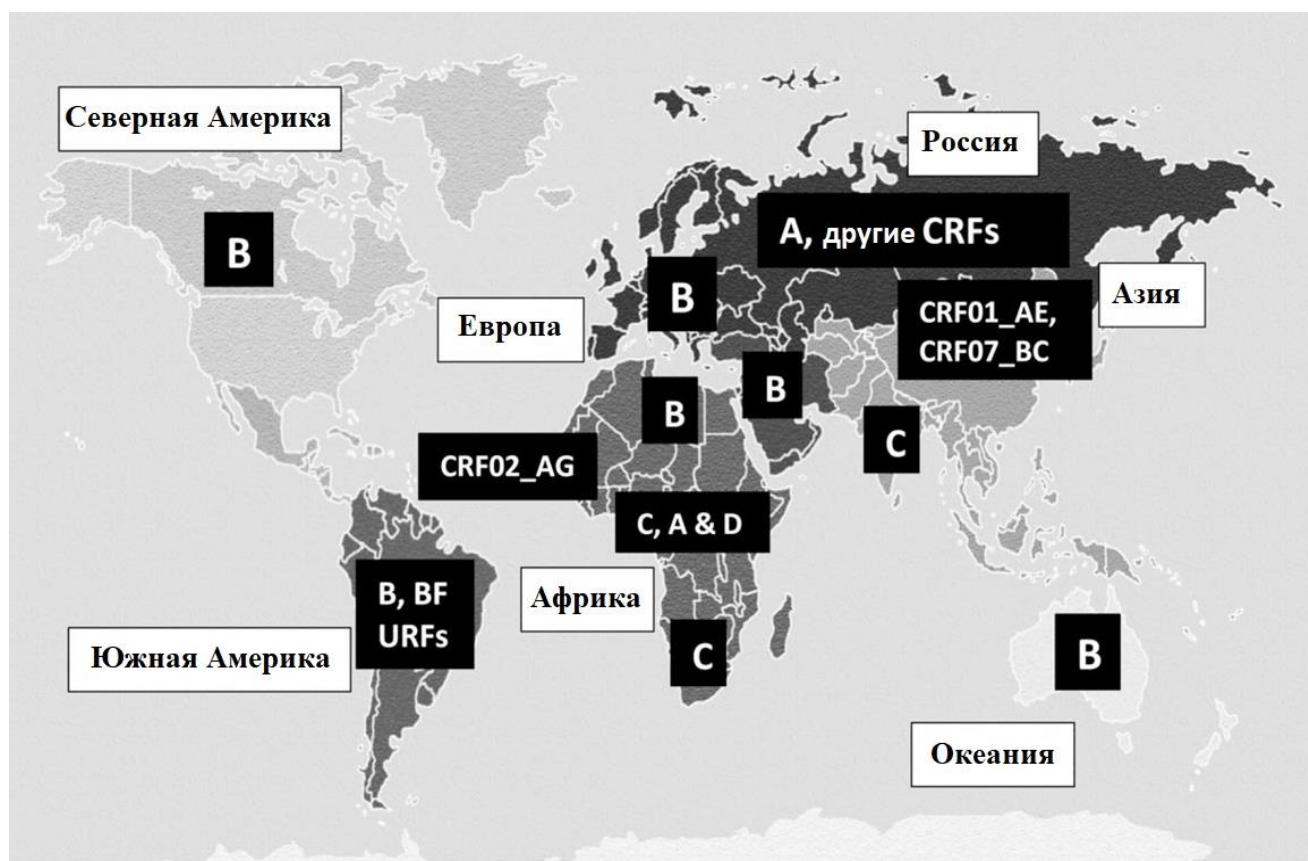


Рисунок 4 – Глобальное распределение основных субтипов ВИЧ-1. Карта, на которой отражено глобальное распространение основных субтипов вируса иммунодефицита человека и CRFs (Адаптировано из [49])

В большинстве государств распространение различных вариантов ВИЧ-1 обусловлено эффектом основателя. Это означает, что в популяции преобладает тот вариант вируса, который первым появился на определенной территории, где и занял свою нишу. Так, в Северной Америке [136; 193] и Австралии [61; 77] ВИЧ-1 субтипа В по-прежнему является наиболее распространенным вирусным штаммом. Помимо этого, во многих странах Европы также доминирует этот геновариант вируса [144; 214; 257], но есть и исключения, так, в Румынии с самого начала эпидемии широко распространен ВИЧ-1 субтипа F1 [204]. Помимо этого, в европейских странах в связи с высоким иммиграционным потоком регистрируется увеличение распространения не-В-субтипов [109]. Так, в Испании субтип F1 был

идентифицирован в группе MCM, а CRF02_AG – среди иммигрантского населения [214]. В Германии было показано, что у 45,6% мигрантов выявляется ВИЧ-1 не-B-субтипа: субтип А чаще регистрировали у восточноевропейцев, а у мигрантов из Африки и Азии – субтип С, D и другие [112]. ВИЧ-1 субтипа В преобладает в странах Южной Америки [34; 157], но его доля также постепенно снижается. Так в 2021 году сообщалось об увеличении распространения ВИЧ-1 субтипа С и F1, а также различных CRFs в Бразилии [103]. Кроме этого, на этой территории в большом количестве регистрируются новые CRFs, так, с 2006 года было обнаружено 13 межсубтипных рекомбинантов BF и BC [43; 92; 215; 217].

В Азии циркулирует несколько генетических вариантов ВИЧ-1 с большим числом CRFs. Субтип А преобладает в России [220], но стоит отметить, что преобладание того или иного геноварианта вируса отличается в зависимости от региона. Кроме этого, ВИЧ-1 субтипа А, известный также как A_{F_{SU}}/A₆, широко распространен в странах бывшего Советского Союза [46; 134; 216]. Данный вариант вируса, как и другие, возник в Африке, а именно в Демократической Республике Конго, и в течении десятилетия распространялся путем гетеросексуальных контактов в Украине, но попав в среду ЛУИН, ему удалось быстро распространиться на территориях близлежащих стран [54; 79], что в значительной степени повлияло на молекулярно-генетическую картину эпидемии в этих странах. Распространенность ВИЧ-1 под-субтипа A₆ в некоторых странах бывшего СССР постепенно снижается, за счет увеличения распространения других генетических вариантов ВИЧ-1, так, к 2020-ым годам доля распространенности CRF02_AG ВИЧ-1 на территориях Республик Кыргызстан и Казахстан превысила 40% [135; 145; 148; 216; 228], а доля CRF63_02A₆ ВИЧ-1 на территориях Республик Таджикистан и Узбекистан составила более 50% [135; 143]. Важно отметить, что некоторые автоматизированные системы определения субтипов ошибочно генотипируют CRF02_AG_{F_{SU}} и CRF63_02A₆ ВИЧ-1, что приводит к неверному определению генетического варианта ВИЧ-1 в базах данных, содержащих последовательности ВИЧ-1, и к некорректной представленности этих геновариантов вируса в различных регионах [229].

В Китае преобладают ВИЧ-1 субтипа В, CRF01_AE и CRF07_BC, но распределение этих геновариантов в разных частях страны отличается. Почти на всей территории страны доминируют ВИЧ-1 субтипа В и CRF01_AE, а в северо-западном регионе страны – ВИЧ-1 CRF07_BC [235; 270]. В Юго-Восточной Азии CRF01_AE, впервые выделенный в Таиланде, является наиболее распространенным [120; 130], хотя в первые два десятилетия после первых случаев заражения на этой территории циркулировал ВИЧ-1 субтипа В [150]. В Индии основным геновариантом ВИЧ-1 является субтип С, но в некоторых регионах страны выявляется значительная доля рекомбинантных вирусов, так, на северо-западе страны более, чем в 40% случаях выявляются рекомбинанты между вирусами субтипов С и В, а также С и А1 [185].

Самое большое число CRFs ВИЧ-1 возникло в результате рекомбинационных событий между ВИЧ-1 субтипов В и С, а также В и CRF01_AE. В настоящее время число этих CRFs превысило 50, и это число продолжает расти, причем более 80% из них были впервые идентифицированы в Китае и соседних странах Юго-Восточной Азии [268].

Молекулярная эпидемиология ВИЧ-инфекции меняется с течением времени. Если до 2000-х годов ВИЧ-инфекция была вызвана вирусами субтипов В и С почти на всех континентах, за исключением африканского, где были зарегистрированы все субтипы вируса, то в настоящее время ситуация кардинально изменилась. На некоторых территориях, например, Китай и Россия, произошла существенная смена доминирующих субтипов. Важно отметить, что распространенность тех или иных генетических вариантов ВИЧ-1 варьирует в зависимости от географического месторасположения. Но во всех странах мира наблюдается общая тенденция в изменении характера эпидемии ВИЧ-инфекции в сторону увеличения генетического разнообразия вируса. Темп выявляемости новых CRFs растет с каждым годом. Так, к 2010 году было зарегистрировано около 45 CRFs ВИЧ-1 [274], а к 2023 году их число увеличилось более чем в три раза, достигнув 170, и эти цифры продолжают расти. Только за 2023 в Китае было обнаружено более 10 новых CRFs. Изменение характера эпидемии может быть связано с высокой

миграционной активностью населения, туризмом, международными грузоперевозками, ростом доступности наркотиков [197], а также с развитием новых технологий секвенирования, которые позволяют обнаружить минорные популяции вируса, процент которых в организме ниже 20% [133].

1.5 Характеристика эпидемии ВИЧ-инфекции в Российской Федерации

В России ситуация с ВИЧ-инфекцией остаётся нестабильной. По состоянию на 31 декабря 2023 года в стране было зарегистрировано 1 692 795 случаев заражения ВИЧ. При этом заболеваемость (число новых выявленных случаев в пересчете на численность населения) населения все еще остается на высоком уровне, хотя в последние годы зарегистрировано снижение данного показателя.

Пораженность ВИЧ-инфекцией на 31 декабря 2023 г. составила 817,6 на 100 тыс. населения России, то есть с ВИЧ жили всего 0,8% населения. При этом наблюдается тенденция к увеличению числа регионов с высоким уровнем распространённости ВИЧ-инфекции (более 0,5% от общей численности населения). В 2014 году таких регионов было 22, а в 2023 году — уже 44. Кроме того, в 24 субъектах Российской Федерации уровень распространённости ВИЧ-инфекции превышает средний показатель по стране. Среди них — 8 регионов Сибирского федерального округа. К наиболее пораженным ВИЧ-инфекцией регионам относятся: Кемеровская (зарегистрировано 2050,8 живущих с ВИЧ на 100 тыс. населения), Свердловская (2020,2), Иркутская (2007,1), Оренбургская (1711,5) и Самарская (1484,1) области, Красноярский край занимает в этом списке 10 место со 1325,2 ЛЖВ на 100 тыс. населения.

В 2023 году было зафиксировано 58 740 новых случаев ВИЧ. Так как ВИЧ-инфекция является хроническим заболеванием, а число новых случаев превышает число умерших (35 410 случаев за 2023 г.), то общее число лиц, живущих с ВИЧ (ЛЖВ) в России продолжает расти (Рисунок 5).

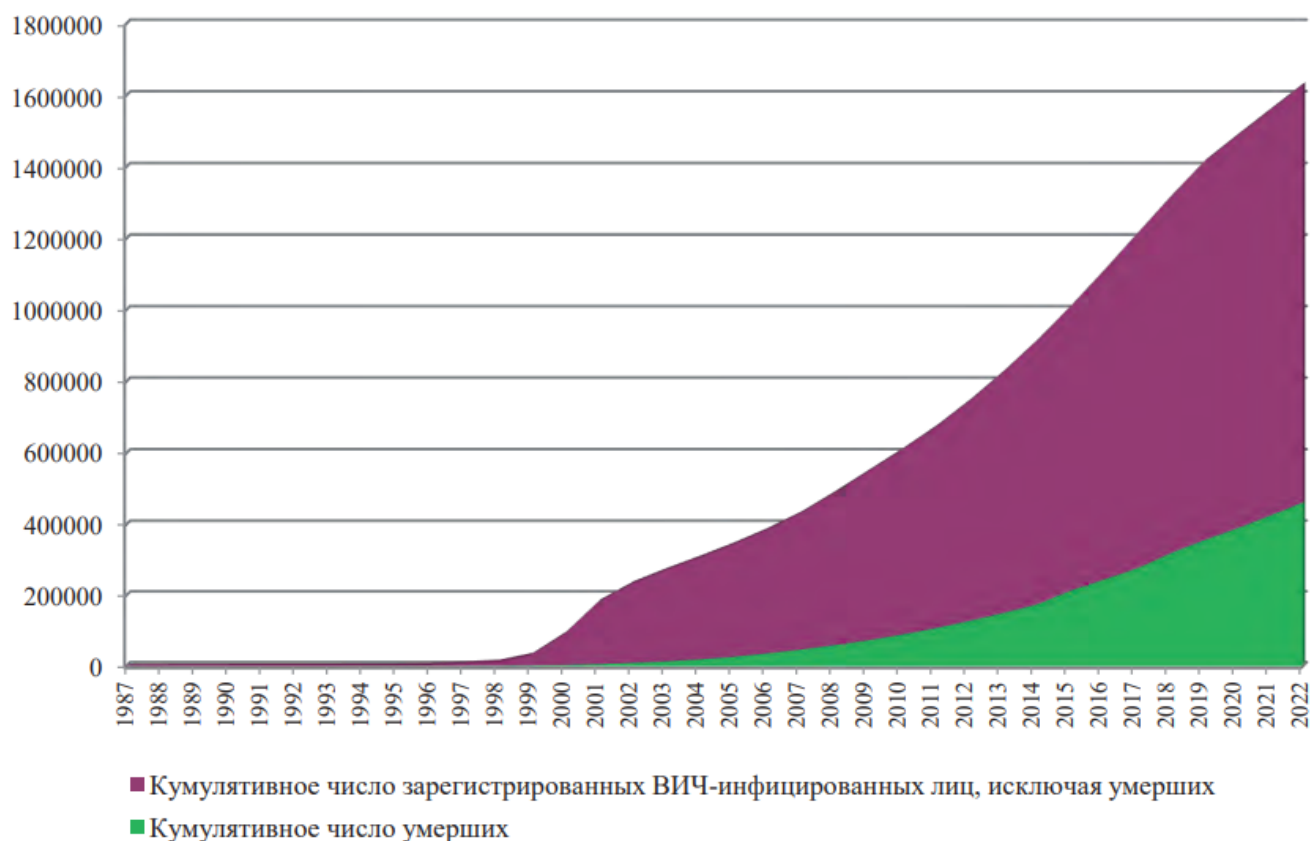


Рисунок 5 – Число зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции среди граждан России в 1987–2022 гг. [29]

Показатель заболеваемости ВИЧ-инфекцией в 2023 г. составил 40,04 на 100 тыс. населения. По состоянию на конец 2023 года в 34 регионах Российской Федерации уровень заболеваемости был выше среднего по стране., среди них — 7 субъектов Сибирского федерального округа. Самый высокий уровень заболеваемости был зарегистрирован в Чукотском автономном округе (зарегистрировано 87,73 новых случаев ВИЧ-инфекции на 100 тыс. населения), Красноярском крае (80,5), Кемеровской (78,45), Иркутской (73,49) областях и Алтайском крае (72,42).

За последние два десятилетия в России произошли значительные изменения в возрастном распределении лиц, у которых выявляется ВИЧ-инфекция. В начале 2000-х годов большинство новых случаев (около 60%) диагностировалось у молодых людей в возрасте 20-29 лет. Однако к 2023 г. ситуация кардинально изменилась: доля этой возрастной группы сократилась до 10,7%. Вместе с тем выросла доля лиц старших возрастных категорий. Так, в 2023 г. 35,3% новых

случаев приходилось на группу 30-39 лет, а 33,6% – на лиц 40-49 лет. Таким образом, в России наблюдается общая тенденция к «старению» ЛЖВ. Важно отметить, что среди всех выявленных ЛЖВ за весь период эпидемии ВИЧ-инфекции в РФ количество инфицированных мужчин было выше, чем женщин [29].

ВИЧ-инфекция перестала быть заболеванием людей, которые входят в группу риска. Теперь он активно распространяется в общей популяции, так как в настоящее время основными путями передачи ВИЧ стали гетеросексуальные контакты и употребление наркотиков внутривенно. Доминирование того или иного пути передачи менялось с течением времени. С начала эпидемии ВИЧ-инфекции и до 2016 г. более 50% случаев заражений регистрировались среди ЛУИН и MSM. С 2017 г. произошло смещение эпидемиологического профиля в сторону полового пути распространения вируса. Так, в 2023 году в структуре впервые выявленных случаев ВИЧ-инфекции в России доминировал гетеросексуальный путь передачи, на который пришлось 77,6% новых диагнозов. Второй по значимости путь передачи – инъекционное употребление наркотиков, на который пришлось 17,7% новых случаев ВИЧ-инфекции, а о заражении путем гомосексуальных контактов сообщили 3,7% лиц [26]. Низкий процент выявляемости ВИЧ-инфекции среди группы MSM может быть связан с высоким уровнем стигматизации, что приводит к сокрытию пути заражения, а также к отказу от тестирования, хотя именно борьба со стигматизацией в этой группе может снизить уровень заболеваемости [106].

Молекулярно-эпидемиологическая характеристика ВИЧ-инфекции на территории России также менялась. Первый случай ВИЧ-инфекции на территории России был зафиксирован в 1987 г. В начале эпидемии темп заболевания оставался низким, что объяснялось ограниченными путями передачи: ятрогенный путь (через медицинские процедуры) и гомосексуальные контакты, которые редко афишируются даже в настоящее время. К середине 1990-х годов на постсоветском пространстве было выявлено семь генетических подтипов вируса (A, B, C, D, F, G, H) и три рекомбинантные формы (CRF01_AE, CRF02_AG и gagDenvG), причем разные генетические варианты циркулировали в конкретных группах населения [12]. Так, в группе MSM основными возбудителями заболевания являлись ВИЧ-1

субтипа В [54]. Кроме этого, был описан случай внутрибольничной вспышки ВИЧ-инфекции, включающей более 250 человек, возбудителем которой являлся ВИЧ-1 субтипа G [18].

В период с 1996 по 2004 год среди ЛУИН была зафиксирована первая волна распространения ВИЧ-инфекции. За это время было выявлено около 300 тысяч новых случаев заражения ВИЧ (на 31.12.1995 г. было зарегистрировано 1090 ЛЖВ) [27; 28]. Более 90% всех случаев ВИЧ-инфекции во всех регионах страны были вызваны ВИЧ-1 субтипа А, о котором было сказано ранее.

С 2005 г. обнаруживается занос новых генетических форм ВИЧ-1 на территорию страны. Проникновение в Россию среднеазиатского варианта ВИЧ-1 CRF02_AG стало ключевым фактором, изменившим молекулярно-генетический профиль эпидемии [22], в особенности на СФО. Так, уже в 2006 г. в Новосибирской области впервые была зарегистрирована новая циркулирующая рекомбинантная форма ВИЧ-1, которой позднее было присвоено наименование CRF63_02A6 (результат рекомбинации между CRF02_AG и субтипом А) [47]. К 2008 году CRF63_02A6 ВИЧ-1 был выявлен более чем у 30% впервые выявленных ВИЧ-инфицированных в Новосибирской области. Эта CRF быстро распространилась на Дальний Восток и в другие регионы СФО. В настоящее время CRF63_02A6 ВИЧ-1 регистрируется не только на территории России, но и в других странах [65; 87; 165].

Распространенность различных ВИЧ-1 варьирует в зависимости от субъекта РФ. ВИЧ-1 субтипа А до сих пор остается доминирующим, но доля распространенности этого геноварианта вируса в некоторых регионах страны существенно снизилась. Во многих регионах РФ доминирует ВИЧ-1 под-субтипа А6, например, в Республике Крым распространённость данного геноварианта вируса составляет 97,6% [11], в Приволжском федеральном округе – 95,9% [5], в Мурманской области – 94,0% [6], в Тюменской области – 93,1% [23], в г. Санкт-Петербург – 88,2% [17], в Орловской области – 87,2% [219], в Архангельской области – 83,4% [6], в Сахалинской области – 81,3% [21] и в Краснодарском крае – 80,5% [1], вторым по распространенности геновариантом ВИЧ-1 в этих регионах являются ВИЧ-1 субтипа В или CRF63_02A6. Кроме этого есть регионы, в которых

доля ВИЧ-1 под-субтипа А6 остается преобладающей, но доля других геновариантов выявляется в большом проценте случаев. Так, в Вологодской области доля ВИЧ-1 под-субтипа А6 составляет 51,25%, а вторым по встречаемости генетическим вариантом является ВИЧ-1 CRF03_AB, который выявляется в 32,5% случаев [20]. В Красноярском крае ВИЧ-1 под-субтипа А6 был выявлен в 68,5% случаев, а ВИЧ-1 CRF63_02А6 – в 15,7%, при этом распространенность URFs ВИЧ-1 достигла 13% [13]. В Приморском крае доля ВИЧ-1 под-субтипа А6 в 2021-2023 гг. составила 40,9%, ВИЧ-1 субтипа В – 29,9%, а распространенность URFs ВИЧ-1 – 15,7% [30]. В некоторых регионах страны доминирующим геновариантом ВИЧ-1 является CRF63_02А6, например, в Новосибирской области распространенность данного геноварианта достигла 80,9% (А6 – 12,7%) [7], в Томской области – 77,7% (URFs – 11,6%) [4], Кемеровской области – 71,7% (URFs – 20,8%) [96], Омской области – 69,2% (URFs – 15,4%) [19] и Алтайском крае – 61,0% (А6 – 33,0%) [5]. Генетический профиль циркулирующих ВИЧ-1 в Калининградской области кардинально отличается от других регионов РФ. В период с 2014 по 2018 гг. на данной территории доминировали URFs ВИЧ-1 (74%), возникшие в результате рекомбинационных событий между ВИЧ-1 субтипов А и В или CRF03_AB, а под-субтип А6 встречался только в 16,67% случаев [31].

ВИЧ-инфекция в России продолжает развиваться. За весь период эпидемии произошло существенное изменение характера эпидемии: ВИЧ-инфекция вышла за пределы ключевых уязвимых групп населения в общую популяцию, кроме этого, выросло число инфицированных лиц активного трудоспособного возраста. Все это наносит существенный урон демографическому, социальному и экономическому развитию страны по причине увеличения смертности среди населения трудоспособного возраста, а также снижения рождаемости и ожидаемой продолжительности жизни граждан.

Помимо этого, было показано, что популяция ВИЧ-1 как на мировом, так и на региональном уровне, постоянно меняется в сторону увеличения генетического разнообразия вируса. Предсказать молекулярно-генетические характеристики ВИЧ на той или иной территории через несколько лет невозможно по причине

специфики эпидемии в разных регионах. На растущую изменчивость вируса влияет высокий процент рискованного поведения среди лиц репродуктивного возраста [62; 261]. Своевременная оценка генетического разнообразия ВИЧ необходима как для изучения эволюции вируса, так и для разработки возможных диагностических, химиотерапевтических и/или профилактических препаратов, поэтому важно постоянно проводить мониторинг циркулирующих ВИЧ-1.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Исследуемые образцы

В период с сентября 2017 года по апрель 2024 года в Красноярском краевом центре по профилактике и борьбе со СПИД были собраны образцы периферической крови у ВИЧ-инфицированных пациентов вне зависимости от демографических и клинических характеристик, даты постановки диагноза и опыта приема АРТ. Сбор эпидемиологических данных о пациентах, включённых в исследование, осуществлял профессиональный эпидемиолог после того, как они были проинформированы о целях исследования. Изучение ВИЧ-1 проводилось в отделе ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Весь полученный клинический материал использовали с информированного согласия пациентов после одобрения проектов локальным этическим комитетом при ГБУЗ Новосибирской области «Городская инфекционная больница №1»: протокол №1 (от 28.03.2017 г.) и протокол №2 (от 27.01.2021 г.).

2.2 Забор крови, хранение сывороток и клеток

Процедура забора образцов периферической крови осуществлялся на месте квалифицированным медицинским работником в вакуумированные пробирки типа Vacutainer (BectonDickinson, США). После забора образцов пробирки аккуратно перемешивали, затем отбирали 250 мкл цельной крови и переносили в стерильные пробирки типа Eppendorf (Германия), содержащих 1 мл гемолитика (AmpliSens, Россия). Пробирки перемешивали на вортексе 10 сек и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин (данный этап повторяли дважды). После этого пробирки центрифугировали 2 мин при 8000xg. Затем осторожно, не касаясь дна и избегая захватывания клеток (лейкоцитов), удаляли супернатант. После

завершения первичного этапа подготовки оставшуюся в вакуумированных пробирках цельную кровь подвергали центрифугированию при 2000xg в течение 15 минут для разделения на фракции, после чего надосадочную жидкость (плазму) аккуратно переносили в стерильные пробирки типа Eppendorf. Клетки и плазму хранили при температуре -70°C. Образцы были транспортированы в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21.

2.3 Выделение нуклеиновых кислот ВИЧ-1 из клинического материала

2.3.1 Выделение РНК ВИЧ-1 из плазмы крови

Выделение вирусной РНК из плазмы крови проводилось поэтапно с использованием наборов реагентов «РИБО-золь-С» и «РИБО-преп» (AmpliSens, Россия). Первый этап выделения осуществлялся с применением набора реагентов «РИБО-золь-С». Перед началом процедуры выделения суммарной РНК из плазмы крови была включена центрифуга с охлаждением (Hettich, Германия), температура установлена на уровне 4 °С, а ускорение — 14000xg. Также были подготовлены необходимые одноразовые пробирки типа Eppendorf в количестве, соответствующем количеству проб для выделения (x2). Пробирки были промаркированы. В первую половину пробирок был добавлен раствор D, содержащий гуанидин тиоционат и меркаптоэтанол, в объёме 300 мкл, после чего были внесены по 100 мкл исследуемых образцов, предварительно нагретых до комнатной температуры. Содержимое пробирок было перемешано на вортексе, затем было произведено короткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирок. Затем пробы были прогреты в твердотельном термостате (BioSan, Латвия) при температуре 56°C в течение 5 минут. После этого к образцам, лизированным в растворе D, был добавлен 30 мкл раствора E, содержащего протеиназу. Содержимое пробирок было перемешано на вортексе, затем было произведено короткое центрифугирование для удаления капель со стенок

пробирок. Затем в эти же пробирки было добавлено по 300 мкл раствора А, содержащего фенол, после чего содержимое было перемешано на вортексе и произведено короткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирок. После этого в пробирки было добавлено по 100 мкл раствора В, содержащего хлороформ, содержимое было интенсивно перемешано на вортексе в течение не менее 15–20 секунд до молочно-белого цвета. Затем пробирки были помещены в морозильную камеру на 10 минут.

Второй этап выделения проводился с использованием набора реагентов «РИБО-преп». В то время как пробы проходили инкубацию и центрифугирование, во вторую половину пробирок было добавлено по 300 мкл раствора для лизиса, содержащего гуанидин тиоционат, тритон X-100 и 1-тио-глицерол, который был предварительно прогрет на твердотельном термостате при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов. После первого этапа выделения из пробирок с клиническими образцами была аккуратно отобрана верхняя фаза в объёме 400 мкл и перенесена в соответствующие пробирки, содержащие раствор для лизиса. Содержимое пробирок было перемешано на вортексе и прогрето при температуре 65 °С в течение 5 минут. Затем в пробирки было добавлено по 400 мкл раствора для преципитации, содержащего изопропанол, содержимое было перемешано на вортексе и центрифугировано на микроцентрифуге в течение 5 минут при 13000 об/мин. После центрифугирования надосадочная жидкость была аккуратно отобрана с избеганием контакта с осадком. Затем осадок был последовательно промыт растворами для отмывки 3 и 4, содержащими изопропанол, в объёме 500 мкл и 200 мкл соответственно. Далее осадок был подсушен в пробирках с открытыми крышками в твердотельном термостате при температуре 65 °С в течение 5 минут до полного испарения изопропанол. После этого сухой осадок был растворён в 65 мкл РНК-буфера, а закрытые пробирки с содержимым были прогреты при температуре 65 °С в твердотельном термостате в течение 5 минут. Образцы РНК были помещены на хранение не более одного года в низкотемпературный морозильник при температуре -70 °С (Sanyo, Япония).

2.3.2 Выделение ДНК ВИЧ-1 из клеток

Выделение ДНК из лейкоцитов проводили с использованием набора реагентов «3361: для выделения ДНК из цельной крови» (DiaGene, Россия). Перед началом процедуры выделения ДНК из клеток крови в раствор для промывки №2 добавили 70 мл ректифицированный 96%-ый этиловый спирт, протеиназу К растворили в 520 мкл деионизированной воды, а раствор для сорбции поставили на твердотельный термошейкер, нагретый до 55°C, до полного растворения осадка. Помимо этого, отобрали необходимое количество одноразовых пробирок типа Eppendorf, микроколонок и пробирок для сбора фильтрата и промаркировали. В пробирки с лейкоцитарным осадком, которые предварительно нагрели до комнатной температуры, добавляли по 200 мкл буфера PBS. После тщательного перемешивания образцы подвергали кратковременному центрифугированию, для сбрасывания капель со стенок пробирок. Далее в пробирки последовательно вносили по 200 мкл буфера LBB и по 8 мкл протеиназы К и инкубировали образцы при температуре 56°C в течение 30 минут в твердотельном термошейкере (BioSan, Латвия) со скоростью вращения блока 1200 об/мин. После инкубации в пробирки добавляли по 560 мкл раствора для сорбции и перемешивали содержимое на вортексе. Затем в заранее подготовленные колонки вносили по 600 мкл выделяемого образца, центрифугировали в течение 3 минут при 10000xg и удаляли фильтрат с использованием вакуумного аспиратора (данный этап повторяли дважды, так как объем колонки составляет 650 мкл, а объем содержимого после добавления всех растворов составляет 968 мкл). После последнего удаления фильтрата на фильтр колонки наносили по 300 мкл раствора для промывки №1, центрифугировали в течение 2 минут при 10000xg и удаляли фильтрат вакуумным аспиратором (данный этап повторяли дважды). Затем на фильтр колонки наносили по 500 мкл раствора для промывки №2, центрифугировали 1 минуты при 13000xg и удаляли фильтрат (данный этап повторяли дважды). Для полного удаления промывочного раствора пробы центрифугировали еще 1 минуту при 13000xg.

После чего колонки помещали в заранее подготовленные пробирки типа Eppendorf, наносили в центр фильтра по 50 мкл деионизированной воды и инкубировали при комнатной температуре в течение 3 минут. Затем ДНК элюировали центрифугированием в течение 1 минуты при 13000xg. Полученный раствор ДНК хранили в низкотемпературном морозильнике при температуре -70°C не более одного года.

2.4 Получение нуклеотидных последовательностей участка гена *pol* ВИЧ-1: *pro-rev* и *int*

С помощью ПЦР были получены фрагменты гена *pol*: *pro-rev* и *int*. Для этого использовалась методика «гнездовой» ПЦР с применением двух пар праймеров. При работе с РНК-матрицей использовали коммерческий набор «РеалБест Мастер микс ОТ» (Вектор-Бест, Россия), содержащего лиофилизированную готовую реакционную смесь для ОТ-ПЦР и элюирующий раствор. В каждую пробирку с готовой реакционной смесью добавляли вирус-специфичные внешние прямой и обратный праймеры 10 pM/мкл (ДНК-синтез, Россия) по 2 мкл каждого, 10 мкл образца (РНК-матрицы) и элюирующий раствор по 36 мкл. При работе с ДНК-матрицей в пробирки добавляли: реакционную смесь БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x) (BioLabMix, Россия) по 12,5 мкл, в состав которой входят высокопроцессивная рекомбинантная HS-Taq ДНК-полимераза с «горячим» стартом, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, ПЦР буфер и Mg²⁺, а также внутренние прямой и обратный праймеры по 1 мкл в концентрации 10 pM/мкл, деионизированную воду (BioLabMix, Россия) в объеме 7,5 мкл и 3 мкл ДНК-матрицы. После добавления всех компонентов пробирки плотно закрывали, перемешивали содержимое на вортексе и проводили короткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирок, не допуская образования пузырей воздуха, после чего помещали в амплификатор. Программа представлена в таблице

1. Следует отметить, что программы для постановки ПЦР с ДНК/РНК-матрицей отличаются лишь одним шагом: при работе с РНК-матрицей необходима обратная транскрипция (первый шаг в таблице), а при работе с ДНК-матрицей она отсутствует. Длина конечных ПЦР-продуктов рассчитывалась с помощью ПО Oligo v.7 (Molecular Biology Insights, USA).

Таблица 1 – Программа первого этапа ПЦР

Температура, °С	Время	Количество циклов
45	30 мин	1
95	4 мин	1
94	15 сек	30
50	30 сек	
72	1 мин * т.п.н.	
72	4 мин	1
4	∞	1

После этого проводили второй раунд ПЦР. Для этого в каждую пробирку добавили: БиоМастер HS-Тaq ПЦР-Color (2×) 12,5 мкл внутренние праймеры по 0,6 мкл в концентрации 10 рМ/мкл, деионизированную воду по 10,5 мкл и 1,8 мкл ДНК-матрицы (продукт первой ОТ-ПЦР/ПЦР). Затем пробирки плотно закрывали, содержимое перемешивали на вортексе и коротким центрифугированием сбрасывали капли со стенок пробирок, не допуская образования пузырей воздуха, после чего помещали в амплификатор. Программа представлена в таблице 2.

Детекцию ПЦР-продуктов проводили с помощью горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле, который получали путем смешивания и нагревания до температуры кипения 2-ух грамм сухой агарозы, 200 мл 1хТАЕ буфера и 40 мкл бромистого этидия. Для приблизительного определения размера ПЦР-продукта использовали молекулярный маркер ДНК маркер Step 50 plus

(BioLabMix, Россия). Визуализацию ПЦР-продуктов осуществляли с применением трансиллюминатором (Vilber, Франция). Полученные фрагменты не превышали размер 1,5 т.п.н.

Таблица 2 – Программа второго этапа ПЦР. Примечание: $t_{\text{опт}}$ – оптимальная температура отжига праймеров, рассчитанная с использованием ПО Oligo v.7

Температура, °С	Время	Количество циклов
95	4 мин	1
94	15 сек	3
$t_{\text{опт}}+5$	30 сек	
72	1 мин * т.п.н. + 10 сек	
94	15 сек	30
$t_{\text{опт}}$	30 сек	
72	1 мин * т.п.н.	
72	4 мин	1
4	∞	1

2.5 Определение нуклеотидной последовательности фрагментов гена pol ВИЧ-1

Для определения последовательности нуклеотидов полученных фрагментов генома ВИЧ-1 использовали метод прямого секвенирования. Секвенирование ампликонов проводили по обеим цепям на капиллярном автоматическом генетическом анализаторе 3500 (AppliedBiosystems, США).

В пробирки добавляли 5,6 мкл деионизированной воды, 1 мкл BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (AppliedBiosystems, США), который содержит флуоресцентно-меченые дидезоксинуклеотидтрифосфаты, 2 мкл буфера, специально разработанного для использования с BigDye, 0,4 мкл праймера 10 pM/мкл и 1 мкл ПЦР-продукта (при хорошей степени свечения на электрофорезе; если свечение было слабее, то ПЦР-продукта добавляли больше за счет уменьшения количества воды). Содержимое пробирок перемешивали на вортексе и коротким центрифугированием сбрасывали капли со стенок пробирок, не допуская образования пузырей воздуха, после чего пробы помещали в амплификатор, используя программу, представленную в таблице 3.

Таблица 3 – Программа секвенирующей ПЦР

Температура, °С	Время	Количество циклов
95	1 мин	1
95	10 сек	30
50	10 сек	
60	2 мин 30 сек	
4	∞	1

После секвенирующей ПЦР проводили термическую обработку продуктов секвенирующей ПЦР с 2,2% додецилсульфатом натрия, для этого в каждую пробирку с пробой добавляли по 12 мкл додецилсульфата натрия. Обработка проводилась в амплификаторе. Программа представлена в таблице 4.

Последним этапом перед прямым секвенированием проводили очистку полученных продуктов. Для данной процедуры использовали фильтрационный гель Sephadex (GE Healthcare, США), разведенный дистиллированной водой в соотношении 1:20. После очистки методом гель-фильтрации, пробы высушивали на вакуумном центробежном концентраторе (Labconco, США) в течение 35 мин при 50°C. После этого в высушенные образцы добавляли по 15 мкл HiDi™

Formamide (AppliedBiosystems, США), который предназначен для денатурации проб перед капиллярным электрофорезом, после чего пробы подвергались автоматическому секвенированию.

Таблица 4 – Программа для термической обработки продуктов секвенирующей ПЦР

Температура, °С	Время	Количество циклов
98	5 мин	1
25	10 мин	

После того как были получены результаты, нуклеотидные последовательности были отредактированы с помощью программы Sequencher 4.1 Software (GeneCodesCorporation, AnnArbor, MI, США). Для редактирования были использованы референсные последовательности различных генетических вариантов ВИЧ-1. Итогом работы была консенсусная нуклеотидная последовательность.

2.6 Определение генетического варианта ВИЧ-1 и анализ лекарственной устойчивости

Определение генетического варианта ВИЧ-1 проводили с использованием нескольких автоматизированных инструментов для определения субтипов ВИЧ-1 REGA v3.0 [200], COMET [233] и программы рекомбинантной идентификации (RIP) [225]. Также определение генетического варианта ВИЧ-1 было проведено с использованием филогенетического метода максимального правдоподобия с использованием IQTree v1.6.12 [246] с референсными последовательностями ВИЧ-1, взятых из специализированной базы данных ВИЧ из Национальной Лаборатории

Лос Аламос [116], множественное выравнивание для построения филогенетического дерева было выполнено и использованием алгоритмов MAFFT [129]. Субтип ВИЧ-1 был присвоен, если исследуемая последовательность попадает в монофилетическую кладу с соответствующей референсной последовательностью субтипа со значением поддержки ветви ≥ 90 . Тот или иной геновариант ВИЧ-1 был присвоен, если три из четырех методов совпадали. Итоговый геновариант ВИЧ-1 был определен с учетом всех полученных фрагментов генома, т.е. если для вируса были получены фрагменты гена PR-RT и IN, то геновариант ВИЧ-1 был «суммарным». Например, если по фрагменту гена PR-RT было определено, что ВИЧ-1 относится к под-субтипу А6, а по фрагменту гена IN – CRF63_02А6, то итоговым геновариантом вируса был URF_63/А6, т.е. рекомбинантный вариант вируса между ВИЧ-1 под-субтипа А6 и CRF63_02А6.

Мутации лекарственной устойчивости к четырем группам АРТ (ИП, НИОТ, ННИОТ и ИИ) были определены с использованием Стэнфордской базы данных по лекарственной устойчивости ВИЧ (HIVdb Program: Mutations Analysis) [222].

2.7 Получение полноразмерных нуклеотидных последовательностей последовательностей генома ВИЧ-1

Получение полноразмерных нуклеотидных последовательностей генома до 8627 п.н. (88,8% от всего генома вируса), за счет синтезирования двух перекрывающихся фрагментов кДНК ВИЧ-1 (до 5,5 т.п.н.). Для получения кДНК на матрице РНК использовали набор БиоМастер ОТ-ПЦР-Экстра (BioLabMix, Россия). Полноразмерную последовательность генома ВИЧ-1 получали с использованием двух пар праймеров для получения двух перекрывающихся фрагментов ДНК. В пробирки добавляли по 12,5 мкл 2× буфера для ОТ-ПЦР-Экстра, в состав которой входят смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, ПЦР буфер и Mg^{2+} , по 1 мкл БиоМастер Экстра-микс, в состав которого входит RNAscribe RT

ревертаза (модифицированная ОТ вируса лейкемии мышей (M-MuLV)), HS-Taq ДНК-полимераза и Pfu ДНК-полимераза, по 1 мкл праймеров в концентрации 10 рМ/мкл, деионизированную воду в объеме 4,5 мкл и 10 мкл РНК-матрицы. После добавления всех компонентов пробирки плотно закрывали и перемешивали содержимое на вортексе. Для удаления капель со стенок пробирок проводили короткое центрифугирование, не допуская образования пузырей воздуха, после чего помещали в амплификатор. Программа представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Программа для первого этапа ПЦР. Примечание: $t_{\text{опт}}$ - оптимальная температура отжига праймеров, рассчитанная с использованием ПО Oligo v.7

Температура, °С	Время	Количество циклов
45	30 мин	1
93	5 мин	1
93	15 сек	30
$t_{\text{опт}}$	20 сек	
68	0,5 мин * т.п.н.	
68	15 мин	1
4	∞	1

После этого проводили второй раунд ПЦР с использованием набора БиоМастер LR HS-ПЦР (2×). Для этого в каждую пробирку вносили: БиоМастер LR HS-ПЦР (2×) 12,5 мкл, внутренние праймеры по 0,6 мкл в концентрации 10 рМ/мкл, деионизированную воду 10,5 мкл и 1,8 мкл ДНК-матрицы (продукт первой ОТ-ПЦР). После добавления всех компонентов пробирки плотно закрывали и перемешивали содержимое на вортексе. Затем проводили короткое центрифугирование, чтобы удалить капли со стенок пробирок, не допуская образования пузырей воздуха, после чего помещали в амплификатор. Программа представлена в таблице 6.

Таблица 6 – Программа для проведения второго этапа ПЦР. Примечание: $t_{\text{опт}}$ - оптимальная температура отжига праймеров, рассчитанная с использованием ПО Oligo v.7

Температура, °С	Время	Количество циклов
93	5 мин	1
93	15 сек	30
$t_{\text{опт}}$	20 сек	
68	1 мин * т.п.н.	
68	4 мин	1
4	∞	1

Детекцию ПЦР-продуктов проводили с помощью электрофоретической детекции в 0,75% агарозном геле, который получали путем смешивания и нагревания до температуры кипения: 1,5 гр сухой агарозы, 200 мл 1хТАЕ буфера и 40 мкл бромистого этидия. Визуализацию ПЦР-продуктов осуществляли с применением трансиллюминатором (Vilber, Франция). Для приблизительного определения размера ПЦР-продукта использовали молекулярный маркер ДНК маркер Sky-High (BioLabMix, Россия).

2.8 Очистка полноразмерного генома ВИЧ-1

Очистка протяженных фрагментов кДНК ВИЧ-1 из ПЦР-смесей проводилась с использованием набора Cleanup S-Car (Евроген, Россия). Все центрифугирования проводились при 11000xg (13000 об/мин). Перед началом процедуры в Промывочный раствор добавили 215 мл ректифицированного 96% этилового спирта. В пробирки с продуктами ПЦР добавляли по 350 мкл Связывающего

раствора S и по 40 мкл изопропилового спирта. Затем пробирки плотно закрывали и перемешивали содержимое на вортексе. После этого проводили короткое центрифугирование для удаления капель со стенок пробирок. Содержимое пробирок в объеме 410 мкл переносили в специальные колонки и центрифугировали в течение 30 с, затем с помощью вакуумного аспиратора удаляли фильтрат из собирательной пробирки. Затем в спин-колонки добавляли по 700 мкл Промывочного раствора, центрифугировали 30 с и удаляли фильтрат (данный этап повторяли дважды). Пустую колонку центрифугировали в течение еще 2-ух минут, чтобы полностью удалить Промывочный раствор, и оставляли при комнатной температуре с открытой крышкой на 10 мин для полного испарения спирта. Далее колонки переносили в пустые пробирки типа Eppendorf, после чего в центр мембраны наносили по 40 мкл Элюирующего раствора, инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут и центрифугировали 1 минуту. После проведения процедуры очистки вирус-специфичных фрагментов ДНК ВИЧ-1 пробы передавались для подготовки библиотек, секвенирования на платформе Illumina и сборке последовательностей генома вируса в ЦКП ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора.

2.9 Проведение рекомбинационного и филогенетического анализа полноразмерных последовательностей геномов ВИЧ-1

Для анализа полноразмерных нуклеотидных последовательностей применяли программы обнаружения рекомбинации jRNMM (локальная версия) и программного обеспечения Simplot 3.5.1 [163]. Для идентификации точек рекомбинации. Simplot запускали с параметрами окна в 400 п.н. и шага в 50 п.н., используя референсные последовательности ВИЧ-1. Все исследуемые последовательности были разделены на регионы в соответствии с идентифицированными точками рекомбинации. Подмножество 50 наиболее

близких фоновых последовательностей извлекали с использованием BLAST [35], после исключали повторяющиеся последовательности.

Для филогенетического анализа полноразмерных последовательностей ВИЧ-1 использовали все доступные полноразмерные последовательности под-субтипа А6, субтипа В, CRF03_А6В и URF_А6В из стран Бывшего Советского Союза (FSU), а также референсные последовательности под-субтипа А6, субтипа В, CRF03_А6В, полученные из Базы данных Лос Аламос [116]. Для каждого набора сгенерированных последовательностей был проведён филогенетический анализ с использованием метода максимального правдоподобия с помощью IQTree версии 1.6.12 [187]. Карты генома были визуализированы с использованием инструмента рисования рекомбинантных ВИЧ-1 [162], точки рекомбинации были выражены в координатах НХВ2 ВИЧ-1 (номер GenBank: K03455), являющегося референсным геномом ВИЧ-1. Филогенетические деревья были визуализированы с использованием iTOL v6 [152].

2.10 Статистический анализ данных и их визуализация

Статистический анализ данных был проведен с помощью языка программирования R (RStudio, Inc. Software, США), в работе были использованы следующие пакеты: dplyr, tidyR, forcats, lubridate, stringr и stringi. Категориальные данные представляли в виде абсолютных значений, для сравнения которых использовали критерий «хи-квадрат» (χ^2). Величина уровня значимости, принятая в работе (p , probability) составляла 0,05 (или 5,0 %), различия признавали значимыми при $p < 0,05$.

Визуализация результатов осуществлялась с применением языка программирования R, в работе были использованы следующие пакеты: ggplot2, ggpubr и patchwork.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Клинико-эпидемиологическая характеристика ВИЧ-инфицированных лиц, включенных в исследование

Красноярский край – это 14-ый по численности населения и второй по площади регион в России. Он входит в состав СФО и Восточно-Сибирского экономического района. По данным на 31 декабря 2020 года, в крае проживает 2,9 миллиона человек, из них 59,3% — это люди трудоспособного возраста. Красноярск, административный центр края, является крупнейшим экономическим, образовательным и культурным центром Восточной Сибири. Город расположен на пересечении Транссибирской магистрали и исторически сложившихся торговых путей по реке Енисей. В настоящее время Красноярск связан прямым воздушным сообщением почти с 70 городами России, стран СНГ и мира. Эти факторы способствуют высокому уровню трудовой и туристической миграции населения в Красноярском крае, в частности в г. Красноярск, которые могут являться факторами распространения инфекционных заболеваний, в том числе и ВИЧ-инфекции.

С начала эпидемии и до 1999 года в Красноярском крае выявлялись спорадические случаи ВИЧ-инфекции, но в течение 1999 г. был зарегистрирован резкий рост заболеваемости – выявлено 156 новых случаев заболевания, что в три раза выше, чем за предыдущие 10 лет. В последующие года был также зарегистрирован кратный рост числа ВИЧ-инфицированных лиц (Рисунок 6). В период с 2003 по 2006 гг. был отмечен небольшой прирост впервые выявленных ЛЖВ (в среднем 628 случаев в год), но с 2007 по 2016 гг. произошел очередной скачок заболеваемости с ежегодным приростом новых случаев заболевания. С 2017 г. наблюдается постепенная стабилизация процесса, т.е. число новых случаев ВИЧ-инфекции снижается и/или остается на уровне предыдущего года. Однако, несмотря на позитивную динамику Красноярский край сохраняет статус территории с напряженной эпидемиологической обстановкой по ВИЧ-инфекции.

Распределение ВИЧ-инфицированных по полу и путям инфицирования в течение 2000-2023 гг. представлены на рисунках 7 и 8. Так, на территории края с начала эпидемии ВИЧ-инфекции и до 2003 г. новые случаи заболевания регистрировались в основном среди мужчин, в период 2004-2006 гг. впервые выявленные ВИЧ-инфицированные мужчины и женщины регистрировались примерно в равном соотношении, а начиная с 2007 г. и по настоящее время ВИЧ-инфекция выявляется среди мужчин и женщин в ~60% и ~40% случаев соответственно (Рисунок 7). Важно отметить, что с 2011 г. основной долей лиц, вовлеченных в эпидемический процесс, являются пациенты активного трудоспособного и репродуктивного возраста (30-49 лет).

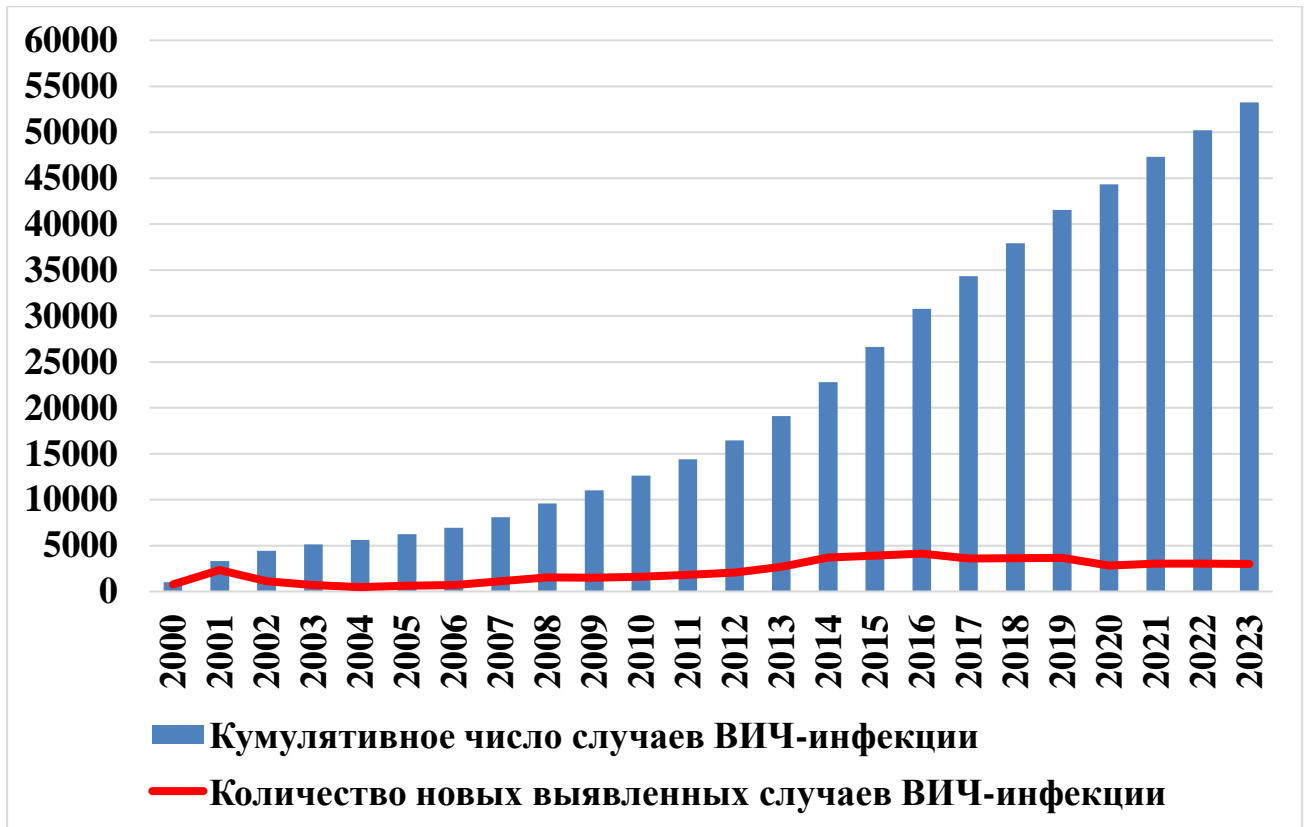


Рисунок 6 – Динамика новых случаев ВИЧ-инфекции в Красноярском крае по данным регионального ЦСПИД на 31.12.2023

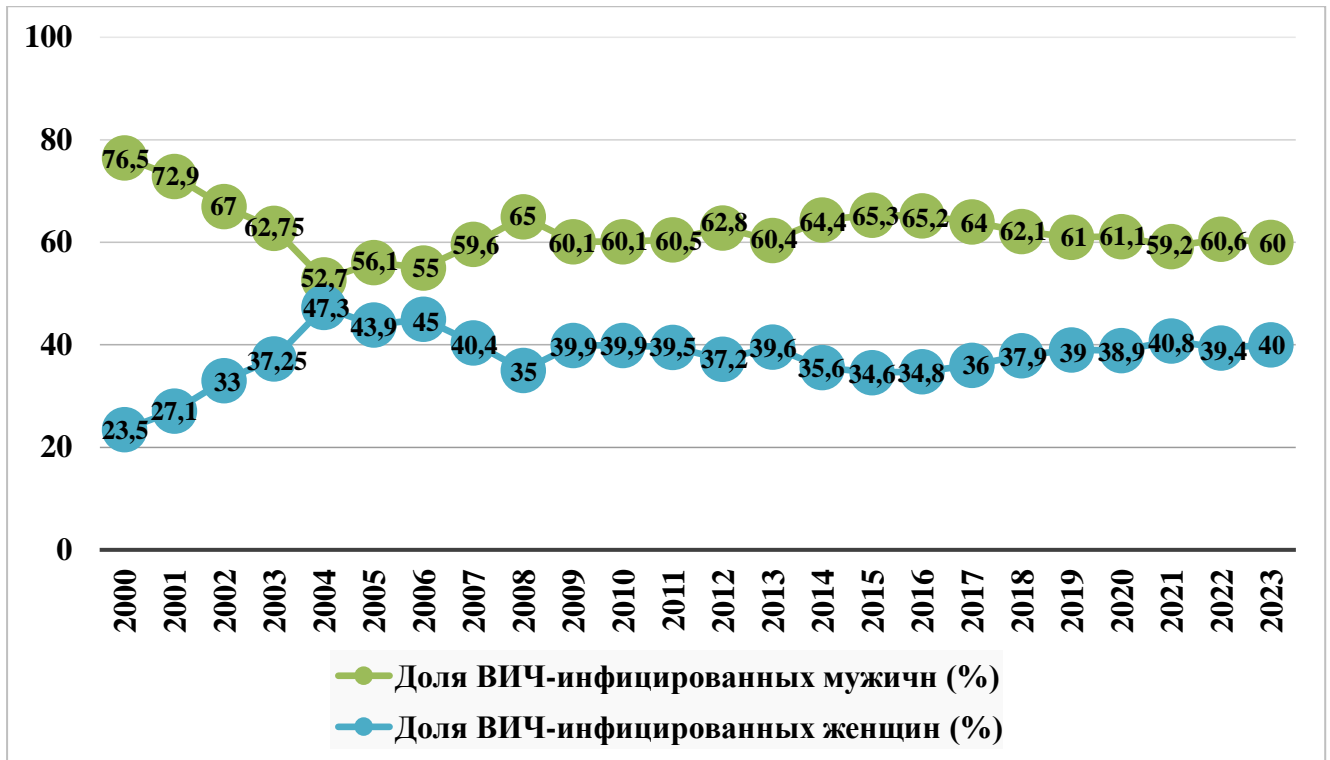


Рисунок 7 – Распределение ВИЧ-инфицированных лиц по полу в Красноярском крае в 2000–2023 гг.

В 1999 году наблюдался рост числа людей, живущих с ВИЧ-инфекцией, что было связано с увеличением числа ЛУИН, доля которых превышала 95%. С 2002 г. наблюдалось снижение темпа распространения ВИЧ-инфекции среди ЛУИН, но в то же время в развитие эпидемического процесса вовлекались половые партнеры ЛУИН. В 2004-2006 гг. впервые выявленные ЛЖВ, инфицированных половым или парентеральным путем, регистрировались в примерно равном соотношении. В 2008 и 2014 гг. наблюдается рост числа впервые выявленных ЛЖВ среди ЛУИН, что может быть связано с эпидемическими вспышками ВИЧ-инфекции в соседних регионах СФО (Кемеровская, Новосибирская, Томская, Омская области и Алтайский край), в которых наблюдался кратный рост случаев заболевания среди ЛУИН (в 3-10 раз) [95, 96]. Начиная с 2016 г. был зарегистрирован рост ЛЖВ, инфицированных гетеросексуальным путем передачи, в то же время число ЛЖВ, инфицированных парентеральным путем, стало сокращаться. Так, к 2023 г. доля ЛЖВ инфицированных гетеросексуальным путем передачи превысила значение в 80%.

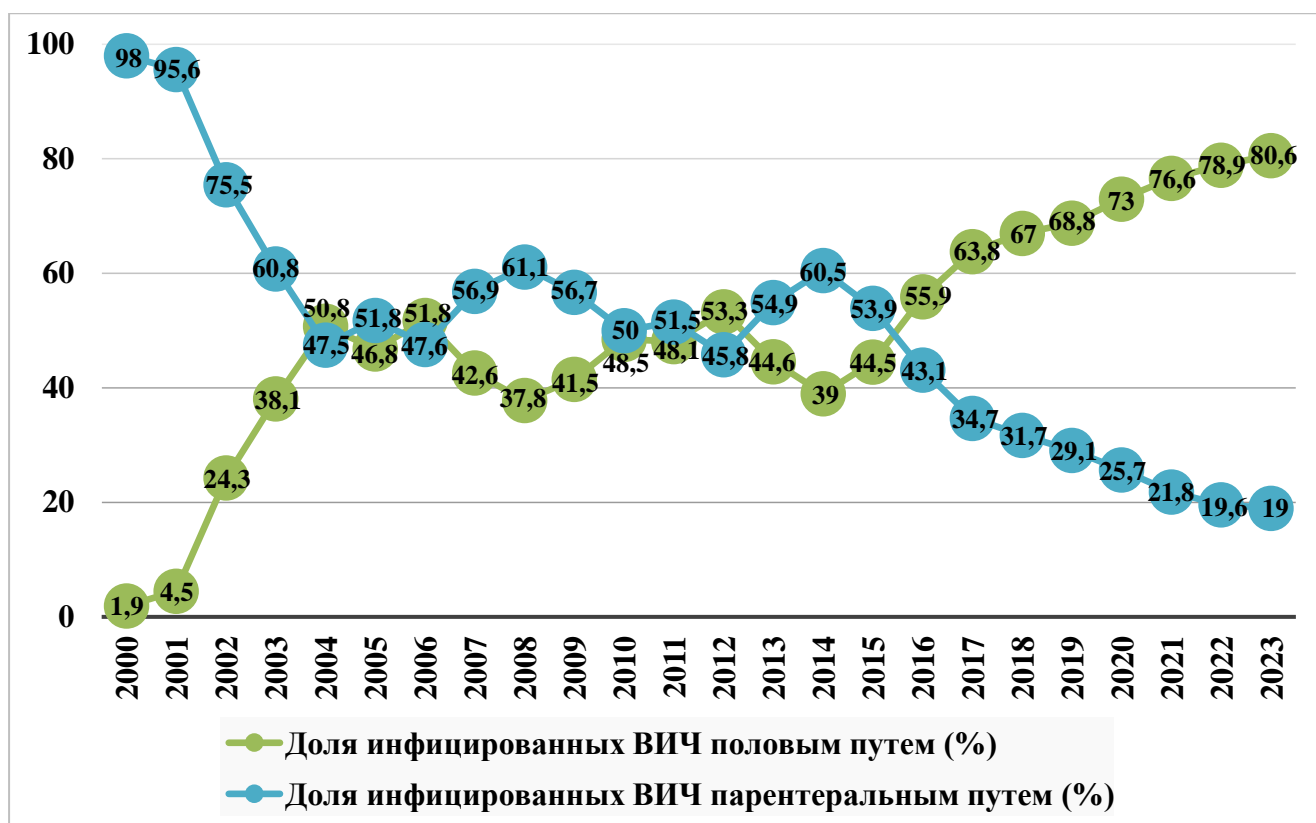


Рисунок 8 – Распределение полового и парентерального путей передачи ВИЧ-инфекции в Красноярском крае в 2000–2023 гг.

В Красноярском крае на 31.12.2024 ситуация по распространению ВИЧ-инфекции выглядит следующим образом:

- 41 762 ЛЖВ выявлено за весь период, из них умерло 11 853;
- с 2017 г. среднее число новых случаев ВИЧ-инфекции в год составляет ~3100 (в диапазоне от 1999 до 3657);
- преобладающий путь передачи – половой гетеросексуальный (86,7%);
- преобладающий пол – мужчины (56,7%);
- преобладающий возраст – 30-49 лет (71,3%).

В ходе наблюдения за распространением ВИЧ-1 в регионе с 2017 по 2024 гг. было собрано 800 образцов периферической крови ВИЧ-инфицированных пациентов, которые наблюдались в «Красноярском краевом центре по профилактике и борьбе со СПИД». Абсолютное большинство лиц, вовлеченных в исследование, 79,9% (639/800) были жителями г. Красноярск, 20,1% (161/800) проживали в близлежащих населенных пунктах: Ачинск, Емельяново,

Сосновоборск, Лесосибирск и др. Были взяты образцы как у пациентов без опыта приема АРТ (наивных пациентов/нелеченые, n=208), так и у пациентов с опытом терапии от двух месяцев и более (леченые, n=592). Основные эпидемиологические характеристики ВИЧ-инфицированных лиц, включенных в исследование, представлены в таблице 7.

В исследовании приняли участие как мужчины, так и женщины, их соотношение составило 59,9% и 40,1% соответственно. Средний возраст ВИЧ-инфицированных лиц составил 38,7 лет, который варьировал от 1 года до 68 лет. Гетеросексуальные контакты и потребление инъекционных наркотиков, доля которых составила по 48,5% (388/800) и 43,5% (348/800), являлись основными путями передачи. Для 2,5% (20/800) был зарегистрирован вертикальный путь инфицирования от матери к ребенку (во время беременности, родов или грудного вскармливания), 2,0% (16/800) сообщили о гомосексуальных контактах (МСМ), а для 3,1% (25/800) путь передачи не был установлен.

3.2 Анализ генетической гетерогенности ВИЧ-1, выделенных от жителей Красноярского края

3.2.1 Генетическое разнообразие ВИЧ-1, выделенных на территории Красноярского края, на основе генотипирования фрагмента гена *pol*

В ходе проведения исследования для 800 лиц с диагнозом ВИЧ-инфекция из плазмы крови и/или лейкоцитов крови были выделены суммарные РНК и/или ДНК. ДНК выделялась в том случае, когда выделение РНК было невозможным и/или затруднительным, в случаях, когда у пациента вирусная нагрузка была менее 2000 копий/мл. Для 800 (100%) образцов были получены фрагменты гена *pol*, кодирующего протеазу и часть обратной транскриптазы вируса (далее N_{pro-gev}). После выравнивания длина данного фрагмента составила 1175 н.о. (НХВ2-позиция: 2253 → 3425). Дополнительно для 343 (42,9%) образцов были получены

Таблица 7 – Эпидемиологическая характеристика ВИЧ-инфицированных лиц, участвующих в исследовании. Примечание: ГТСК – гетеросексуальный путь инфицирования, ЛУИН – лица, употребляющие инъекционные наркотики.

Год	Пол		Путь инфицирования						Всего пациентов
	Мужчины, N (%)	Женщины, N (%)	ГТСК, N (%)	ЛУИН, N (%)	МСМ, N (%)	Вертикальный, N (%)	Бытовой, N (%)	Не установлено, N (%)	
2017	66 (54,1%)	56 (45,9%)	55 (45,1%)	64 (52,5%)	1 (0,8%)	-	-	2 (1,6%)	122
2018	12 (48%)	13 (52%)	11 (44%)	11 (44%)	-	1 (4%)	-	2 (8%)	25
2019	21 (56,8%)	16 (43,2%)	15 (40,5%)	18 (48,6%)	1 (2,7%)	2 (5,4%)	1 (2,7%)	-	37
2020	48 (60%)	32 (40%)	47 (58,75%)	28 (35%)	2 (2,5%)	-	-	3 (3,75%)	80
2021	69 (60%)	46 (40%)	55 (47,8%)	55 (47,8%)	2 (1,75%)	1 (0,9%)	-	2 (1,75%)	115
2022	141 (65,3%)	75 (34,7%)	96 (44,4%)	107 (49,5%)	3 (1,4%)	6 (2,8%)	-	4 (1,9%)	216
2023	91 (59,9%)	61 (40,1%)	70 (46%)	60 (39,5%)	2 (1,3%)	10 (6,6%)	2 (1,3%)	8 (5,3%)	152
2024	31 (58,5%)	22 (41,5%)	39 (73,6%)	5 (9,4%)	5 (9,4%)	-	-	4 (7,6%)	53
Итого	479 (59,9%)	321 (40,1%)	388 (48,5%)	348 (43,5%)	16 (2%)	20 (2,5%)	3 (0,4%)	25 (3,1%)	800

фрагменты гена *pol*, кодирующего интегразу вируса (далее N_{int}), длина которого после выравнивания составила 811 н.о. (HXB2-позиция: 4230 → 5040). Расшифрованные фрагменты генома были использованы для выполнения филогенетического анализа и генотипирования ВИЧ-1.

Генотипирование исследуемых образцов показало, что в 71,1% выявляется специфический для России ВИЧ-1 под-субтипа А6, в 14,9% – CRF63_02А6, в 1,1% – CRF133_А6В, также менее чем в 1% случаях выявлялись такие генетические варианты вируса как субтип В (8/800), CRF03_А6В (1/800), CRF07_ВС (1/800), CRF14_ВG (1/800) и CRF147_А6В (3/800). В 11,1% случаев были обнаружены различные URFs ВИЧ-1, которые возникли в результате рекомбинационных событий между ВИЧ-1 под-субтипа А6 и CRF63_02А6 (URF_63/А6, 8,6% (69/800)), под-субтипа А6 и субтипа В (URF_А6В, 1,6% (13/800)), под-субтипа А6 и CRF02_АG (URF_02А6, 0,6% (5/800)), а также между ВИЧ-1 под-субтипа А6, субтипа В и CRF63_02А6 (URF_А6/В/63, 0,3% (2/800)). Филогенетическое дерево, построенное для нуклеотидных последовательностей гена *pol*, кодирующего PR-RT, приведено на рисунке 9.

Анализ филогенетических кластеров (bootstrap > 97) ВИЧ-1 выявил 64 н.п., формирующих 4 кластера по 4, 15, 20 и 25 н.п. Было обнаружено, что два кластера помимо образцов, полученных в ходе данного исследования, также содержали 2-3 дополнительные последовательности ВИЧ-1, выделенных от жителей Красноярского края, но полученных другими исследовательскими группами под руководством М.Р. Бобковой [186] и Д.Е. Киреева [147] в 2014 и 2016 гг. соответственно.

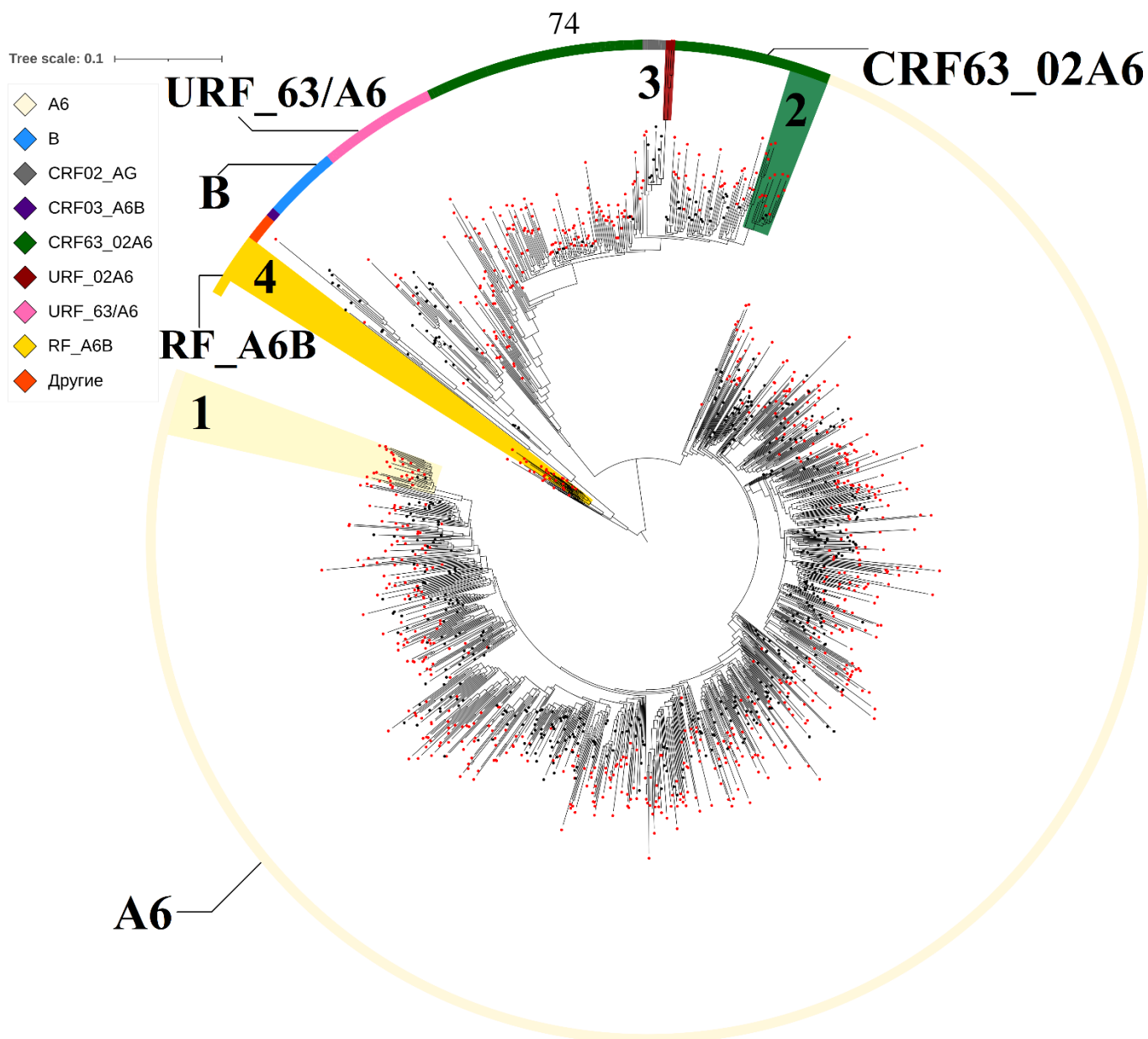


Рисунок 9 – Филогенетическое дерево фрагмента гена *pol* ВИЧ-1, кодирующего PR-RT вируса, выделенных от лиц, проживающих на территории Красноярского края.

Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия, цветовая кодировка внешнего круга описывает генетический вариант н.п., которые в него входят, в соответствии с легендой. Последовательности, выделенные от ВИЧ-инфицированных лиц, проживающих в Красноярском крае отмечены красной точкой, референсные н.п. и н.п. из других регионов РФ отмечены черной точкой.

Филогенетическая клада RF_A6B включает в себя н.п., генотипированные как CRF133_A6B, CRF147_A6B, URF_A6B и URF_A6/B/63. Исследуемые филогенетические кластеры 1-4 выделены заполненными цветом областями

Таблица 8 – Распределение ВИЧ-инфицированных лиц, участвующих в исследовании, по возрасту, полу, путям заражения и году постановке диагноза с указанием выявленных генетических вариантов

Клин.- эпид. показатель	Категория	Общее число пациентов, N (%)	Генетический вариант ВИЧ-1											
			A6, N (%)	B, N (%)	CRF63_ 02A6, N (%)	CRF 133_ A6B, N (%)	CRF 147_ A6B, N (%)	CRF 03_ A6B, N (%)	CRF 07_BC, N (%)	CRF 14_BG, N (%)	URF_ 63/A6, N (%)	URF_ 02A6, N (%)	URF_ A6B, N (%)	URF_ A6/B/63, N (%)
Возраст (года)	<18	25 (3,1)	17 (68,0)	-	6 (24,0)	1 (4,0)	-	-	-	-	1 (4,0)	-	-	-
	18-29	54 (6,75)	37 (68,5)	2 (3,7)	5 (9,3)	-	-	-	-	-	10 (18,5)	-	-	-
	30-39	346 (43,25)	253 (73,1)	5 (1,4)	47 (13,6)	7 (2,0)	1 (0,3)	-	1 (0,3)	1 (0,3)	26 (7,5)	-	4 (1,2)	1 (0,3)
	40-49	314 (39,25)	216 (68,8)	1 (0,3)	56 (17,8)	1 (0,3)	2 (0,6)	1 (0,3)	-	-	25 (8,0)	5 (1,6)	6 (1,9)	1 (0,3)
	≥50	61 (7,6)	46 (75,4)	-	5 (8,2)	-	-	-	-	-	7 (11,5)	-	3 (4,9)	-

Продолжение таблицы 8

Клин.- эпид. показатель	Категория	Общее число пациентов, N (%)	Генетический вариант ВИЧ-1											
			A6, N (%)	B, N (%)	CRF63_ 02A6, N (%)	CRF 133_ A6B, N (%)	CRF 147_ A6B, N (%)	CRF 03_ A6B, N (%)	CRF 07_BC, N (%)	CRF 14_BG, N (%)	URF_ 63/A6, N (%)	URF_ 02A6, N (%)	URF_ A6B, N (%)	URF_ A6/B/63, N (%)
Пол	Мужчины	479 (59,9)	332 (69,3)	7 (1,5)	74 (15,4)	5 (1,0)	2 (0,4)	-	1 (0,2)	1 (0,2)	46 (9,6)	4 (0,8)	7 (1,5)	-
	Женщины	321 (40,1)	237 (73,8)	1 (0,3)	45 (14,0)	4 (1,2)	1 (0,3)	1 (0,3)	-	-	23 (7,2)	1 (0,3)	6 (1,9)	2 (0,6)
Путь заражения	ГТСК	388 (48,5)	285 (73,5)	6 (1,5)	51 (13,1)	4 (1,0)	2 (0,5)	1 (0,3)	1 (0,3)	-	29 (7,5)	4 (1,0)	4 (1,0)	1 (0,3)
	Парентерал ьный	348 (43,5)	241 (69,3)	-	56 (16,1)	5 (1,4)	1 (0,3)	-	-	-	37 (10,6)	-	7 (2,0)	1 (0,3)
	МСМ	16 (2,0)	11 (68,8)	1 (6,2)	1 (6,2)	-	-	-	-	1 (6,2)	-	1 (6,2)	1 (6,2)	-
	Верти кальный	20 (2,5)	16 (80,0)	-	3 (15,0)	-	-	-	-	-	1 (5,0)	-	-	-

Продолжение таблицы 8

Клин.- эпид. показатель	Категория	Общее число пациентов, N (%)	Генетический вариант ВИЧ-1											
			A6, N (%)	B, N (%)	CRF63_ 02A6, N (%)	CRF 133_ A6B, N (%)	CRF 147_ A6B, N (%)	CRF 03_ A6B, N (%)	CRF 07_BC, N (%)	CRF 14_BG, N (%)	URF_ 63/A6, N (%)	URF_ 02A6, N (%)	URF_ A6B, N (%)	URF_ A6/B/63, N (%)
Путь заражения	Бытовой	3 (0,4)	1 (33,3)	-	1 (33,3)	-	-	-	-	-	1 (33,3)	-	-	-
	Не установлен	25 (3,1)	15 (60,0)	1 (5,0)	7 (35,0)	-	-	-	-	-	1 (5,0)	-	1 (5,0)	-
Год постановки диагноза	≤2010	140 (17,5)	136 (97,1)	-	3 (2,1)	-	-	-	-	-	1 (0,7)	-	-	-
	2011-2015	245 (30,6)	168 (68,6)	3 (1,2)	38 (15,5)	2 (0,8)	2 (0,8)	-	-	-	23 (9,4)	2 (0,8)	7 (2,9)	-
	2016-2020	296 (37,0)	186 (62,8)	4 (1,4)	54 (18,2)	7 (2,4)	1 (0,3)	-	1 (0,3)	1 (0,3)	33 (11,1)	2 (0,7)	6 (2,0)	1 (0,3)
	≥2021	119 (14,9)	79 (66,4)	1 (0,8)	24 (20,2)	-	-	1 (0,8)	-	-	12 (10,1)	1 (0,8)	-	1 (0,8)

Филогенетический кластер №1 (Рисунок 9) объединил 28 нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 под-субтипа А6, три из которых были найдены с использованием BLAST – инструментом по поиску близких последовательностей и связей между исследуемой и обнаруженной последовательностями (Рисунок 10). Последовательности ВИЧ-1, формирующие данный кластер, были выделены в основном от жителей г. Красноярск, но два из них были выделены от пациентов, проживающих в Березовском районе, расположенном вблизи г. Красноярск (административный центр п. Березовка расположен в 22 км от г. Красноярск), а один из них был выделен от ВИЧ-инфицированного пациента, проживающим в с. Шушенское, расположенном в 486 км от г. Красноярск. Исследуемые вирусы были выделены от 17 мужчин, 13 из которых сообщили об употреблении инъекционных наркотиков, а также от 11 женщин, 5 из которых являлись ЛУИН, при этом одна из женщин сообщила о гетеросексуальных контактах с ЛУИН. Диагноз ВИЧ-инфекция пациентам был поставлен в период с 2009 по 2023 гг. (Таблица 9).

Филогенетический кластер №2 (Рисунок 9) объединил 17 нуклеотидных последовательностей CRF63_02A6 ВИЧ-1, две из которых были обнаружены с использованием BLAST (Рисунок 11А). Основная доля ВИЧ-1, входящих в данный кластер, была выделена от ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих в г. Ачинск, расположенном в 148 км от г. Красноярск. Два ВИЧ-1 были выделены от жителей г. Красноярск, а один – от жителя г. Назарово, расположенного в 153 км от г. Красноярск и в 35 км от г. Ачинск. Образцы ВИЧ-1 были выделены от 10 мужчин, 8 из которых сообщили, что являлись ЛУИН, а также от 7 женщин, одна из которых являлась ЛУИН. Важно отметить, что одна женщина сообщила о гетеросексуальных контактах с ЛУИН, и еще одна о внутрибольничном инфицировании ВИЧ-инфекцией. Диагноз ВИЧ-инфекция пациентам был поставлен в период с 2014 по 2023 гг. (Таблица 10).

Таблица 9 – Демографические и клинические характеристики пациентов с ВИЧ-инфекцией, вызванной ВИЧ-1 под-субтипом А6, входящих в один филогенетический кластер (ГТСК – гетеросексуальный путь передачи ВИЧ-инфекции, ИБ+ – положительный иммуноблот)

Код образца	Сбор образца (ММ.ГГГГ)	Место проживания	Пол	Возраст	Путь инфицирования	Дата ИБ+ (ММ.ГГГГ)	Прием АРТ
003_SEP_2017	09.2017	Красноярск	м	30	парентеральный	06.2017	нет
016_SEP_2017	09.2017	Красноярск	м	39	парентеральный	07.2017	нет
027_SEP_2017	09.2017	Красноярск	ж	44	ГТСК	08.2017	нет
099_SEP_2017	12.2017	Красноярск	м	49	парентеральный	03.2009	нет
124_JAN_2020	01.2020	Красноярск	м	41	парентеральный	01.2019	да
138_AUG_2020	08.2020	Березовский р-н	ж	45	ГТСК с ЛУИН	08.2015	да
156_AUG_2020	08.2020	Красноярск	ж	38	ГТСК	08.2017	да
158_DEC_2020	12.2020	Красноярск	м	50	ГТСК	10.2019	да
187_DEC_2020	12.2020	Красноярск	м	37	парентеральный	03.2014	да
225_MAR_2021	03.2021	Красноярск	м	33	парентеральный	10.2013	да
245_AUG_2021	08.2021	Березовский р-н	м	33	парентеральный	11.2015	да
253_AUG_2021	08.2021	Красноярск	ж	38	парентеральный	12.2014	да
267_NOV_2021	11.2021	Красноярск	ж	35	ГТСК	10.2019	да
288_NOV_2021	11.2021	Красноярск	м	48	ГТСК	04.2015	да

Продолжение таблицы 9

Код образца	Сбор образца (ММ.ГГГГ)	Место проживания	Пол	Возраст	Путь инфицирования	Дата ИБ+ (ММ.ГГГГ)	Прием АРТ
336_FEB_2022	02.2022	Красноярск	ж	42	парентеральный	03.2017	да
357_FEB_2022	02.2022	Красноярск	м	45	парентеральный	06.2019	да
359_APR_2022	04.2022	Шушенское	ж	27	ГТСК	08.2019	да
392_APR_2022	04.2022	Красноярск	м	40	парентеральный	10.2019	да
418_JUN_2022	06.2022	Красноярск	м	35	парентеральный	11.2014	да
420_JUN_2022	06.2022	Красноярск	м	49	парентеральный	01.2015	да
508_NOV_2022	11.2022	Красноярск	м	47	парентеральный	10.2014	да
551_FEB_2023	02.2023	Красноярск	ж	39	парентеральный	08.2015	да
644_NOV_2023	11.2023	Красноярск	ж	38	ГТСК	04.2015	да
687_DEC_2023	12.2023	Красноярск	ж	48	парентеральный	10.2015	да
766_APR_2024	04.2024	Красноярск	м	39	парентеральный	06.2023	нет
MT369973	12.2016	Красноярск	ж	-	парентеральный	-	нет
MT369981	12.2016	Красноярск	м	-	ГТСК	12.2016	нет
MT369994	12.2016	Красноярск	м	-	-	2016	нет

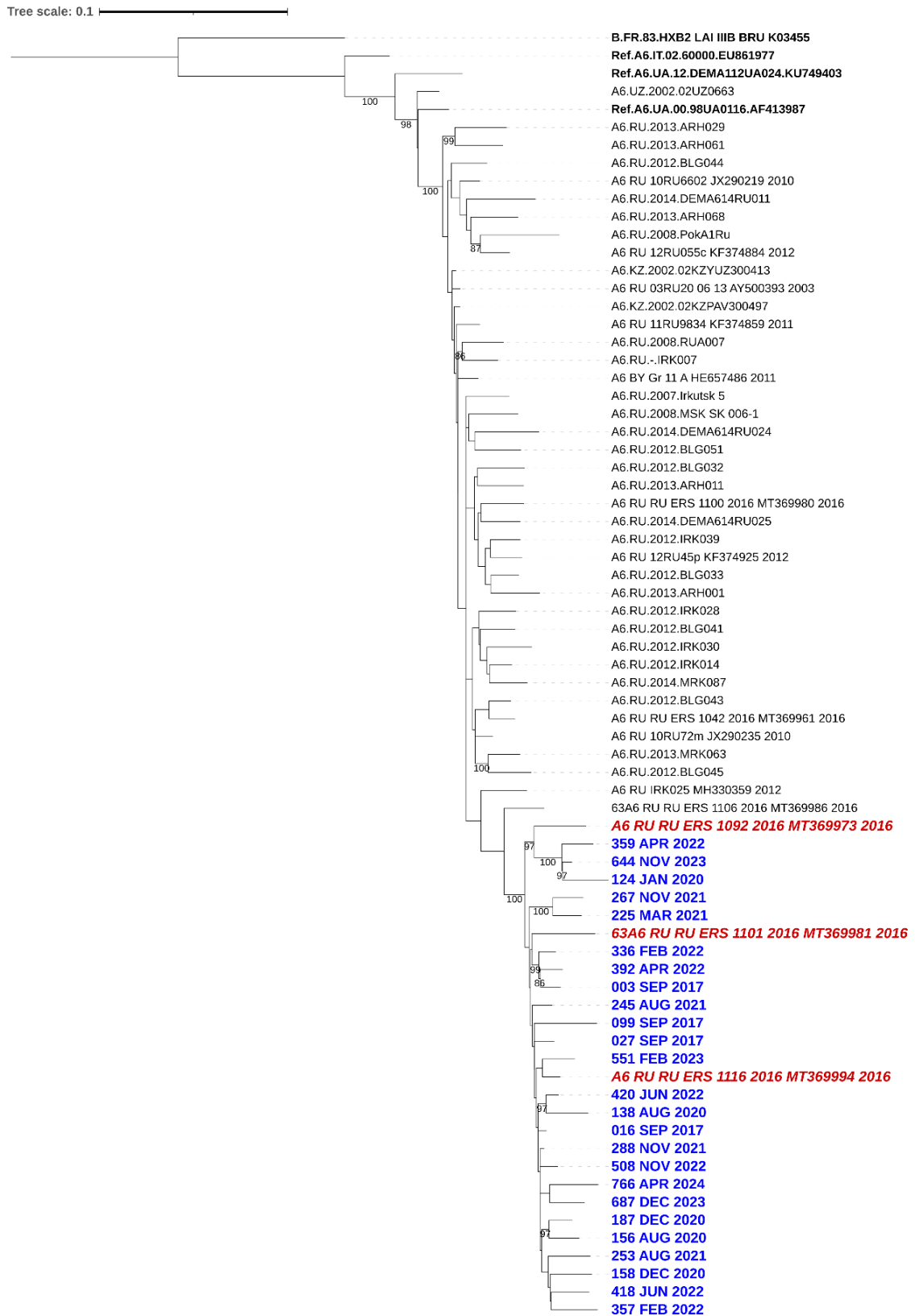


Рисунок 10 – Филогенетическое дерево фрагмента гена *pol*, кодирующего PR-RT ВИЧ-1 под-субтипа А6. Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия. Полуужирным начертанием и черным цветом отмечены референсные н.п., черным цветом без полуужирного начертания отмечены наиболее генетически близкие н.п. из других регионов РФ и стран

бывшего СССР из GenBank. Синим цветом выделены н.п., полученные в ходе данного исследования, красным цветом выделены н.п., обнаруженные в GenBank, формирующие филогенетический кластер №1

Филогенетический кластер №3 (Рисунок 9) составили 4 ВИЧ-1 URF_02A6 (Рисунок 11Б), выделенных от одной женщины, инфицированной при гетеросексуальном контакте, а также от трех мужчин, инфицированных при половых контактах: один мужчина сообщил о том, что является MSM, а другие – о гетеросексуальных контактах. Часть ЛЖВ проживала в г. Красноярск, а один пациент в г. Ачинск. Диагноз лицам, у которых были выделены близкие ВИЧ-1 URF_02A6, был поставлен в период с 2012 по 2018 гг. (Таблица 11). Для подтверждения идентичной структуры фрагменты гена *pol*, кодирующего PR-RT, для всех образцов был проведен анализ точек рекомбинации с использованием RIP. Было показано, что основная часть фрагмента гена PR-RT происходит от ВИЧ-1 CRF02_AG, но с небольшой вставкой фрагмента под-субтипа A6 протяженностью в ~200 п.н. (Рисунок 12). Также для двух образцов (№163 и №688) удалось получить полные нуклеотидные последовательности геномов ВИЧ-1, было показано, что они также имеют идентичную структуру: основная часть генома принадлежит CRF02_AG ВИЧ-1 с тремя вставками под-субтипа A6 (Рисунок 13). Для образца №244 не удалось получить нуклеотидную последовательность полного генома ВИЧ-1. Для образца №447 был получен протяженный фрагмент генома длиной ~4000 п.н., который включал в себя гены *gag* и *pol*, генотипирование полученного фрагмента показало, что он относится к ВИЧ-1 под-субтипа A6, что говорит о том, что популяция циркулирующих ВИЧ-1 у пациента №447 представлена, как минимум двумя различными генетическими вариантами ВИЧ-1 (под-субтип A6 и URF_02A6).

Таблица 10 – Демографические и клинические характеристики пациентов с ВИЧ-инфекцией, вызванной ВИЧ-1 CRF63_02A6, входящих в один филогенетический кластер (ГТСК – гетеросексуальный путь передачи ВИЧ-инфекции, ИБ+ – положительный иммуноблот)

Код образца	Сбор образца (ММ.ГГГГ)	Место проживания	Пол	Возраст	Путь инфицирования	Дата ИБ+ (ММ.ГГГГ)	Прием АРТ
117_SEP_2017	12.2017	Красноярск	м	38	ГТСК	08.2017	нет
415_APR_2022	04.2022	Красноярск	ж	44	парентеральный	08.2016	да
446_JUN_2022	06.2022	Ачинск	м	52	парентеральный	07.2014	да
453_JUN_2022	06.2022	Ачинск	ж	40	ГТСК	04.2017	да
595_MAY_2023	05.2023	Ачинск	м	47	парентеральный	12.2019	да
597_MAY_2023	05.2023	Ачинск	ж	48	неизвестно	02.2023	нет
598_MAY_2023	05.2023	Ачинск	ж	35	ГТСК с ЛУИН	09.2021	да
610_MAY_2023	05.2023	Ачинск	м	43	неизвестно	04.2023	нет
615_NOV_2023	11.2023	Ачинск	м	42	парентеральный	09.2022	да
701_DEC_2023	12.2023	Ачинск	ж	50	ГТСК	06.2023	нет
702_DEC_2023	12.2023	Ачинск	м	41	парентеральный	08.2022	да
755_APR_2024	04.2024	Ачинск	ж	43	неизвестно	02.2024	нет
768_APR_2024	04.2024	Ачинск	м	49	парентеральный	02.2024	нет
769_APR_2024	04.2024	Ачинск	м	44	парентеральный	01.2024	нет

Продолжение таблицы 10

Код образца	Сбор образца (ММ.ГГГГ)	Место проживания	Пол	Возраст	Путь инфицирования	Дата ИБ+ (ММ.ГГГГ)	Прием АРТ
770_APR_2024	04.2024	Назарово	м	39	парентеральный	10.2021	нет
МК589437	09.2014	Ачинск	м	31	парентеральный	09.2014	да
МК589438	12.2014	Ачинск	ж	57	нозокомиальный	10.2014	нет

Таблица 11 – Демографические и клинические характеристики пациентов с ВИЧ-инфекцией, вызванной ВИЧ-1 URF_02A6, входящих в один филогенетический кластер (ГТСК – гетеросексуальный путь передачи ВИЧ-инфекции, ИБ+ – положительный иммуноблот)

Код образца	Сбор образца (ММ.ГГГГ)	Место проживания	Пол	Возраст	Путь инфицирования	Дата ИБ+ (ММ.ГГГГ)	Прием АРТ
163_DEC_2020	12.2020	Красноярск	м	45	МСМ	04.2012	да
244_AUG_2021	08.2021	Красноярск	м	44	ГТСК	07.2018	да
447_JUN_2022	06.2022	Ачинск	м	49	ГТСК	04.2018	да
688_DEC_2023	12.2023	Красноярск	ж	43	ГТСК	08.2014	да

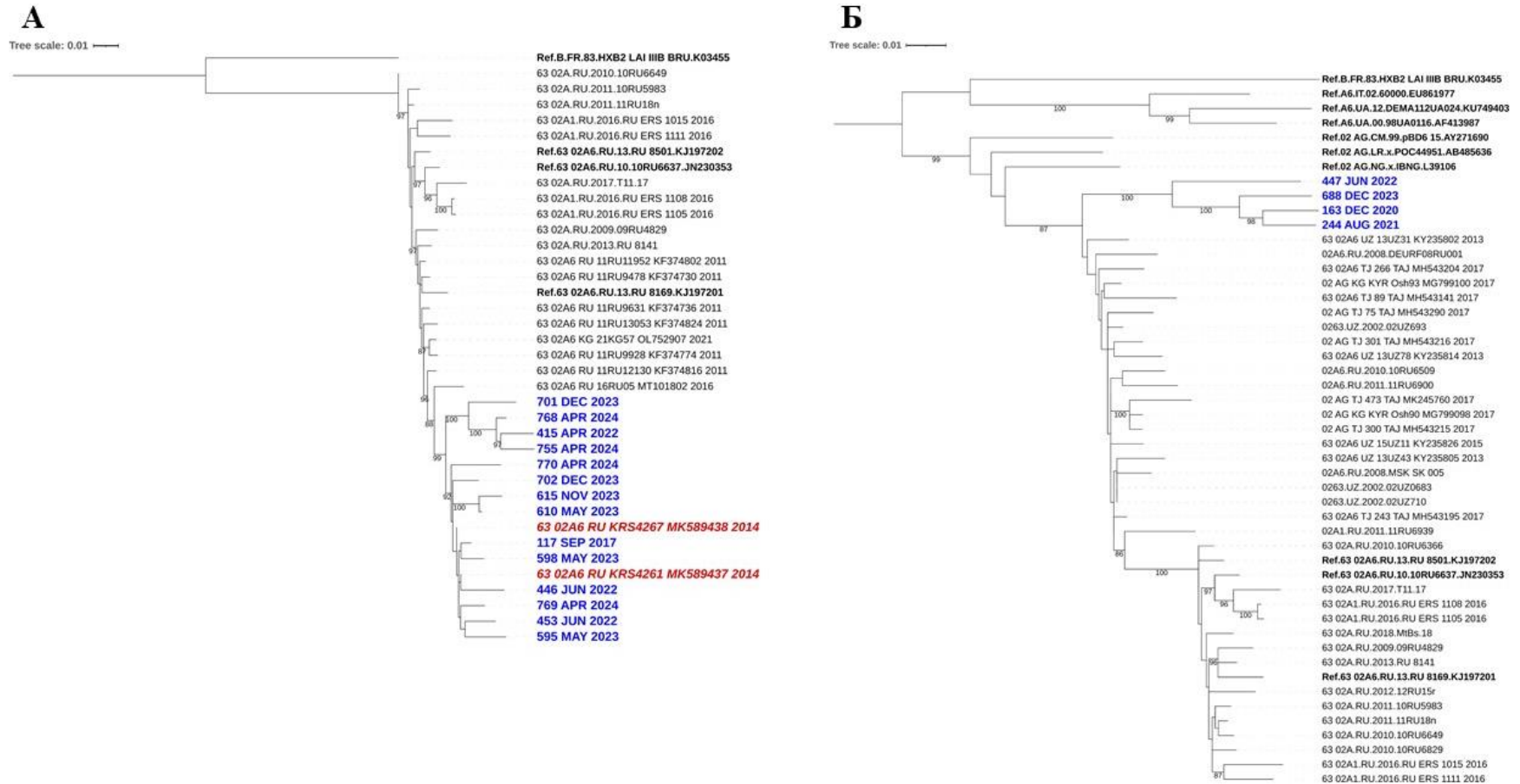


Рисунок 11 – Филогенетические деревья фрагмента гена *pol*, кодирующего PR-RT ВИЧ-1. Филогенетические деревья построены методом максимального правдоподобия. Полужирным начертанием и черным цветом отмечены референсные н.п., черным цветом без полужирного начертания отмечены наиболее генетически близкие н.п. из других регионов РФ и стран бывшего СССР из GenBank. Синим цветом выделены н.п., полученные в ходе данного исследования, красным цветом выделены н.п., обнаруженные в GenBank, которые формируют филогенетические кластеры: А – №2 (CRF63_02A6) и Б – №3 (URF_02A6)

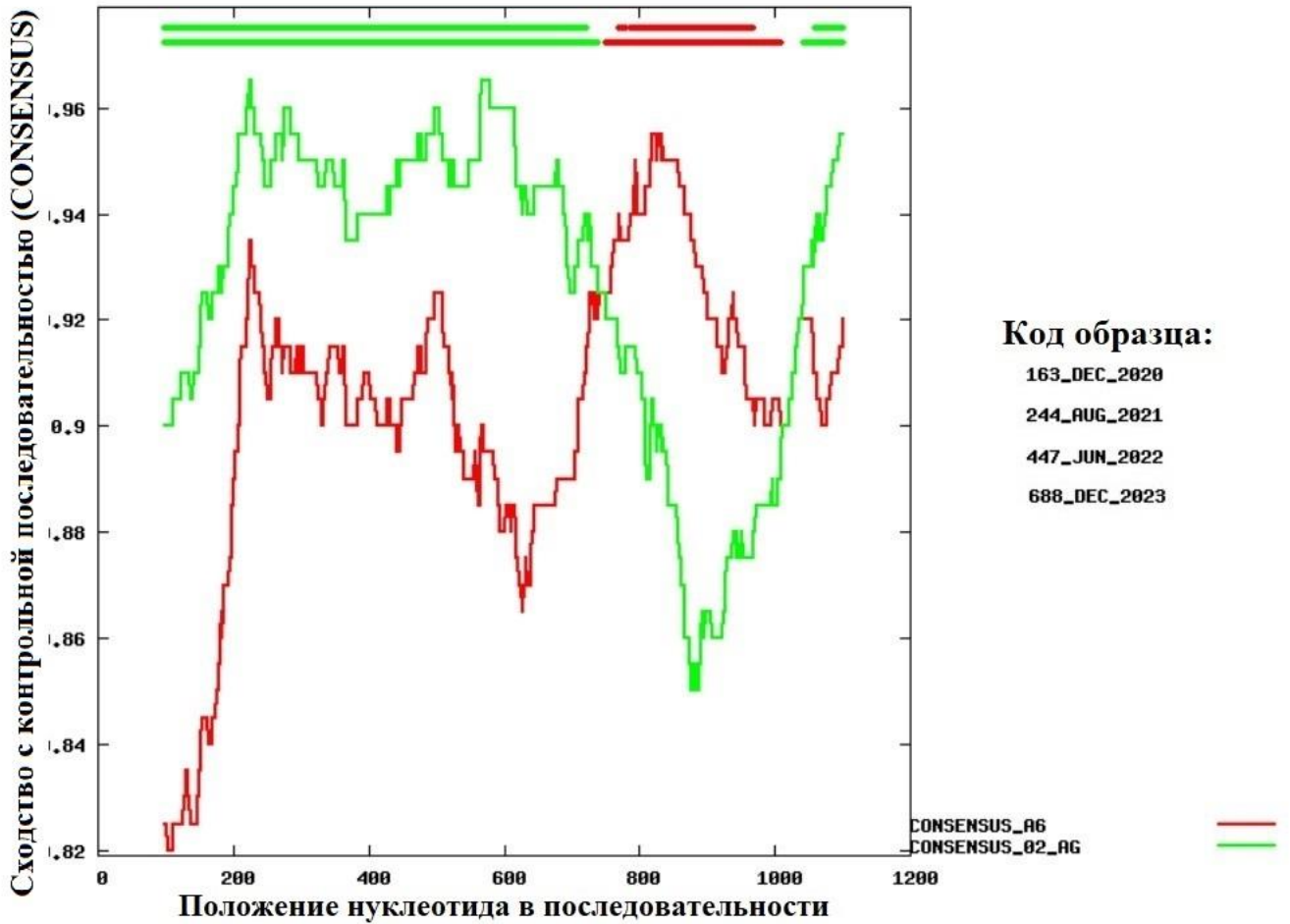


Рисунок 12 – Структура фрагмента генома URF_02A6 ВИЧ-1, кодирующего PR-RT вируса, где 1.00 по оси Y означает, что исследуемая и контрольная последовательность имеют сходство в 100%

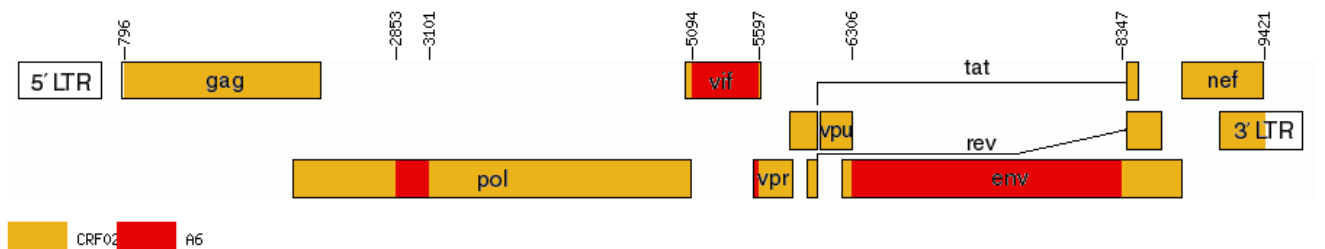


Рисунок 13 – Структура генома образцов №163 и №688 URF_02A6 ВИЧ-1

3.2.2 Рекомбинантные формы ВИЧ-1, выявленные на территории Красноярского края

На территории Красноярского края доля выявленных в ходе проведения исследования рекомбинантных форм (CRFs и URFs) составила 27,9%, но их доля может быть значительно выше. Фрагмент гена *pol*, кодирующий PR-RT вируса и представляющий собой мишень для трех групп препаратов (ИП, НИОТ и ННИОТ), является наиболее часто секвенируемым и депонируемым в международные базы данных (например, GenBank), но его протяженность составляет 12-15% от всего генома ВИЧ-1. Данная проблема частично решается получением фрагмента гена *pol*, кодирующего IN вируса, которая является мишенью для ИИ. Как видно из таблицы 12 в 13,9% (48/345) генотипирование по IN ВИЧ-1 не совпадает с генетическим вариантом, определенным по PR-RT вируса, но для 455 вариантов ВИЧ-1 фрагмент IN не был амплифицирован, по причине того, что на территории Красноярского края назначение ИИ в схемах АРТ ограничено. Так, в 2020 г. всего 15,0% ВИЧ-инфицированных лиц принимали АРТ на основе ИИ, а в 2023 г. – 22,2%. Для сравнения: в Новосибирской области в 2020 г. ИИ принимали 23,1%, а в 2023 г. – 28,7%. Выявление и изучение URFs ВИЧ-1 играет важную роль, так как у различных генетических вариантов вируса могут отличаться биологические свойства, что может привести к изменению характера эпидемии в регионе/стране. Примером такой ситуации является CRF63_02A6 ВИЧ-1, распространение и доминирование которой среди ВИЧ-инфицированных лиц в НСО произошло за короткий промежуток времени, так среди ЛЖВ с ВИЧ-инфекцией, диагностированной в 2012-2016 гг. в 88,1% выявлялись CRF63_02A6 ВИЧ-1 [3].

С целью более детального изучения организации генома ВИЧ-1 для 79 образцов (9,6%) были получены полноразмерные последовательности генома вирусов методом NGS. Были получены геномы «чистых» генетических вариантов ВИЧ-1 (под-субтип А6, субтип В, CRF63_02A6), а также некоторых RFs (Рисунок 14). Из-за высокой генетической изменчивости ВИЧ-1 получение полногеномных

последовательностей всех URFs оказалось затруднительным в виду сложности разработки структур олигонуклеотидов для амплификации целевых фрагментов генома.

Таблица 12 – Генетический вариант ВИЧ-1 по разным областям генома

PR-RT	IN	Генетический вариант на основе PR-RT+IN	Количество
A6	A6	A6	229
	CRF63_02A6	URF_63/A6	1
	URF_63/A6	URF_63/A6	3
	NA	A6	340
B	B	B	4
	NA	B	4
CRF03_A6B	CRF03_A6B	CRF03_A6B	1
CRF07_BC	NA	CRF07_BC	1
CRF63_02A6	A6	URF_63/A6	6
	CRF63_02A6	CRF63_02A6	53
	URF_63/A6	URF_63/A6	11
	NA	CRF63_02A6	66
CRF133_A6B	A6	CRF133_A6B	2
	NA	CRF133_A6B	7
CRF147_A6B	A6	CRF147_A6B	2
	NA	CRF147_A6B	1
URF_02A6	CRF02_AG	URF_02A6	2
	NA	URF_02A6	3
URF14_BG	URF14_BG	URF14_BG	1
URF_63/A6	A6	URF_63/A6	12
	CRF63_02A6	URF_63/A6	6
	URF_63/A6	URF_63/A6	9
	NA	URF_63/A6	22

Продолжение таблицы 12

PR-RT	IN	Генетический вариант на основе PR-RT+IN	Количество
URF_A6B	A6	URF_A6B	2
	NA	URF_A6B	11
URF_A6/B/63	A6	URF_A6/B/63	1
	NA	URF_A6/B/63	1

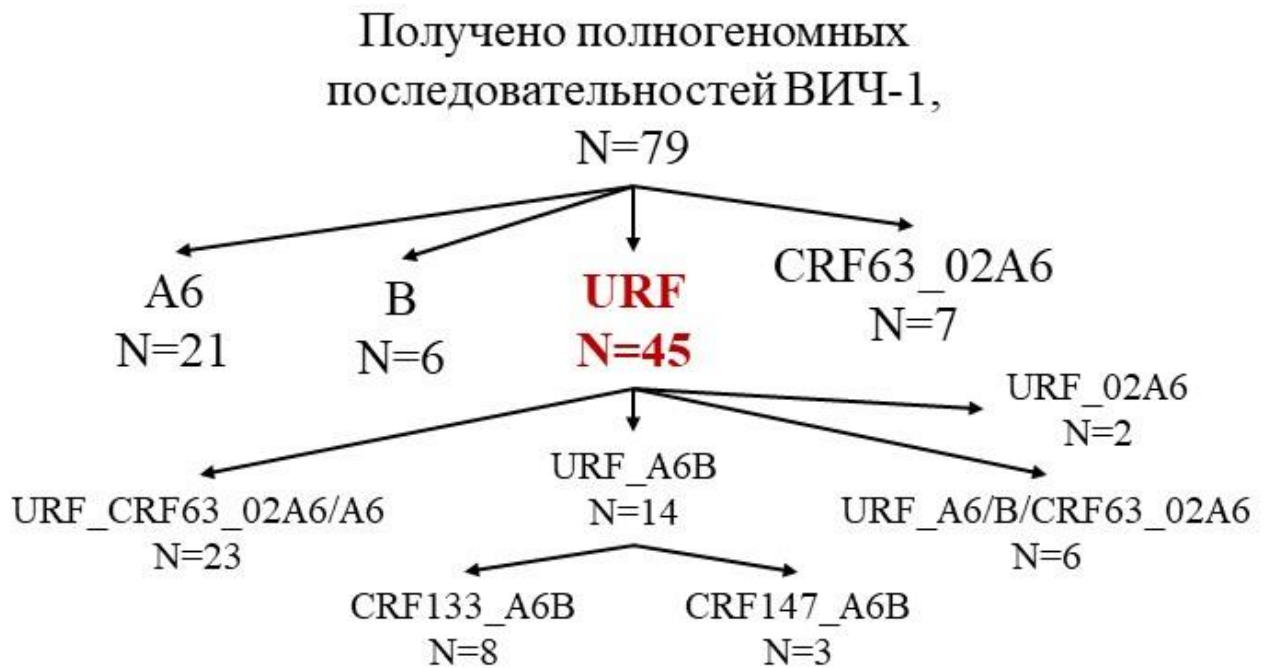


Рисунок 14 – Количество полученных полногеномных последовательностей ВИЧ-1

3.2.2.1 Новые впервые описанные CRF133_A6B и CRF147_A6B ВИЧ-1, выявленные на территории Красноярского края

Молекулярно-генетический анализ всех последовательностей фрагмента гена *pol*, кодирующего PR-RT вируса показал, что 3,4% исследуемых ВИЧ-1 являются URF_A6B и формируют филогенетический кластер №4 (Рисунок 9, 15).

Но только для 20 из них были получены полноразмерные последовательности генома ВИЧ-1, длина которых после выравнивания и удаления LTR с 5' и 3'-концов составила 8797 ± 100 н.о. (HXB2-позиция: 764 → 9561), дополнительно для двух образцов удалось получить протяженные фрагменты генома, длина которых после выравнивания и удаления LTR с 5'-конца составила 4217 ± 50 н.о. (HXB2-позиция: 764 → 4981). Помимо этого, в GenBank была обнаружена одна дополнительная последовательность ВИЧ-1 под номером MT369971 [147], также являющего URF_A6B. Анализ клинико-эпидемиологических данных пациентов, для которых были получены протяженные фрагменты генома вируса показал, что восемь пациентов-мужчин (№12, №128, №131, №189, №263, №319, №349, №739) заразились ВИЧ-инфекцией, употребляя инъекционные наркотические средства, а оставшиеся четыре мужчины – путем гетеросексуальных контактов (№204, №274, №324, №569). Девять пациентов-женщин (№21, №48, №64, №100, №132, №341, №494, №512, №748) указали, что заразились ВИЧ-1 через гетеросексуальные контакты, а одна женщина сообщила, что является ЛУИН (№514). Важно отметить, что пациенты №48, №64 и №204 сообщили о том, что они предположительно заразились ВИЧ-1 от ВИЧ-положительного партнера, который был ЛУИН. Дата постановки диагноза варьировала с декабря 2009 г. по ноябрь 2023 г., а средний возраст ВИЧ-инфицированных лиц составил 38,1 лет. Использование NGS позволило обнаружить в организме одного из пациентов с самой ранней датой постановки диагноза (№64) два генетически отличных ВИЧ-1 относящихся к под-субтипу А6 и URF_A6B. Секвенирование с помощью метода Сэнгера фрагмента гена PR-RT для этого образца выявило только последовательность ВИЧ-1 под-субтипа А6.

Tree scale: 0.01

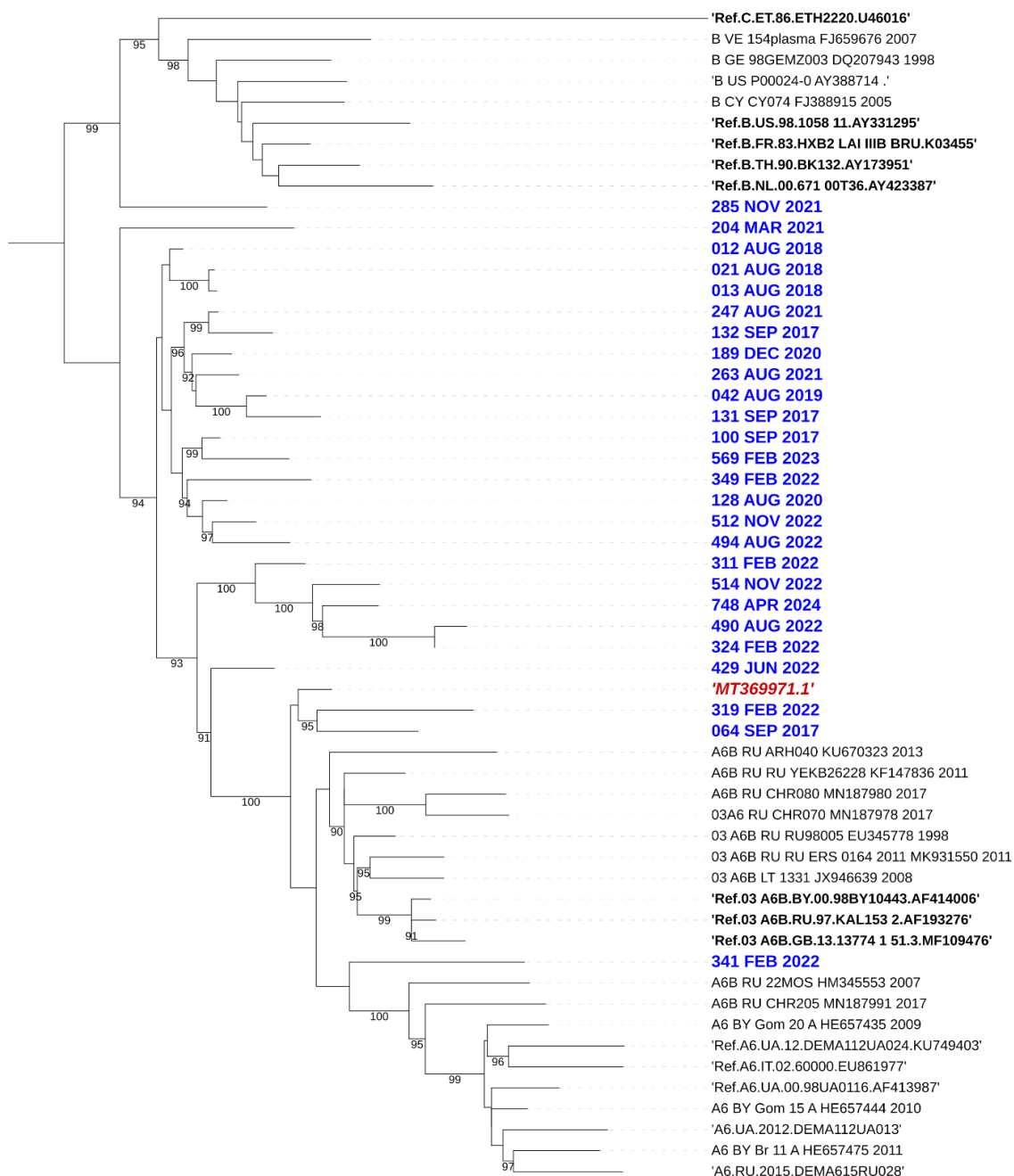


Рисунок 15 – Филогенетическое дерево RF_A6B (включая CRF133_A6B и CRF147_A6B) ВИЧ-1, формирующих филогенетический кластер №4.

Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия. Полу жирным начертанием и черным цветом отмечены референсные н.п., черным цветом без полу жирного начертания отмечены наиболее генетически близкие н.п. из других регионов РФ и стран бывшего СССР из GenBank. Синим цветом выделены н.п., полученные в ходе данного исследования, красным цветом выделены н.п., обнаруженные в GenBank

Таблица 13 – Демографические и клинические характеристики пациентов с ВИЧ-инфекцией, вызванной RF_A6B. Примечание: полужирным курсивом отмечены образцы, для которых получена половина генома вируса (ГТСК – гетеросексуальный путь передачи ВИЧ-инфекции, парент – парентеральный путь передачи ВИЧ-инфекции, ИБ+ – положительный иммуноблот)

Код образца по фрагменту гена PR-RT	Код образца по протяженному фрагменту генома	Сбор образца (ММ.ГГГГ)	Место проживания	Пол	Возраст	Путь инфицирования	Дата ИБ+ (ММ.ГГГГ)	Генетический вариант
048_SEP_2017	Kras48	09.2017	Красноярск	ж	35	ГТСК с ЛУИН	08.2017	URF_A6/B/63
100_SEP_2017	Kras100	12.2017	Красноярск	ж	36	ГТСК	08.2017	CRF133_A6B
131_SEP_2017	Kras131	12.2017	Красноярск	м	44	парент	08.2015	CRF147_A6B
132_SEP_2017	Kras132	12.2017	Сосновоборск	ж	38	ГТСК	11.2016	CRF133_A6B
012_AUG_2018	Kras12	08.2018	Бакчет	м	38	парент	05.2016	CRF133_A6B
021_AUG_2018	Kras21	08.2018	Дзержинское	ж	14	ГТСК	05.2017	CRF133_A6B
64_AUG_2019	Kras64_1	08.2019	Шарыпово	ж	29	ГТСК с ЛУИН	12.2009	A6
	Kras64_2							URF_A6/B
128_AUG_2020	Kras128	08.2020	Красноярск	м	39	парент	11.2017	CRF133_A6B
189_DEC_2020	Kras189	12.2020	Красноярск	м	37	парент	05.2017	CRF133_A6B

Продолжение таблицы 13

Код образца	Код образца по протяженному фрагменту генома	Сбор образца (ММ.ГГГГ)	Место проживания	Пол	Возраст	Путь инфицирования	Дата ИБ+ (ММ.ГГГГ)	Генетический вариант
204_MAR_2021	Kras204	03.2021	Красноярск	м	42	ГТСК с ЛУИН	05.2018	CRF147_A6B
263_AUG_2021	Kras263	08.2021	Красноярск	м	36	парент	10.2012	CRF133_A6B
274_NOV_2021	Kras274	11.2021	Лесосибирск	м	38	ГТСК	03.2012	URF_A6/B/63
319_FEB_2022	Kras319	02.2022	Красноярск	м	50	парент	05.2017	URF_A6B
324_FEB_2022	Kras324	02.2022	Красноярск	м	31	ГТСК	07.2013	URF_A6/B/63
341_FEB_2022	Kras341	02.2022	Красноярск	ж	62	ГТСК	01.2017	URF_A6/B/63
349_FEB_2022	Kras349	02.2022	Красноярск	м	41	парент	11.2015	CRF133_A6B
494_AUG_2022	Kras494	08.2022	Красноярск	ж	34	ГТСК	08.2015	CRF147_A6B
512_NOV_2022	Kras512	11.2022	Красноярск	ж	31	ГТСК	04.2017	CRF133_A6B
514_NOV_2022	Kras514	11.2022	Красноярск	ж	49	парент	01.2020	URF_A6/B/63
569_FEB_2023	Kras569	02.2023	Минусинск	м	44	ГТСК	12.2019	URF_A6B
739_FEB_2024	Kras739	02.2024	Красноярск	м	36	парент	03.2017	URF_A6B
748_APR_2024	Kras748	04.2024	Красноярск	ж	34	ГТСК	11.2023	URF_A6/B/63

Продолжение таблицы 13

Код образца	Код образца по протяженному фрагменту генома	Сбор образца (ММ.ГГГГ)	Место проживания	Пол	Возраст	Путь инфицирования	Дата ИБ+ (ММ.ГГГГ)	Генетический вариант
MT369971	MT369971	12.2016	Красноярск	м	-	парент	2016	URF_A6B

Филогенетический анализ (Рисунок 16) показал, что все URF_A6B ВИЧ-1 формируют отдельную монофилетическую кладу, указывающую на то, что последовательности произошли от одного предка, причем несколько образцы №12, №21, №100, №128, №132, №189, №263, №349 и №131, №204, №494 формируют ОТДЕЛЬНЫЕ ВЕТВИ.

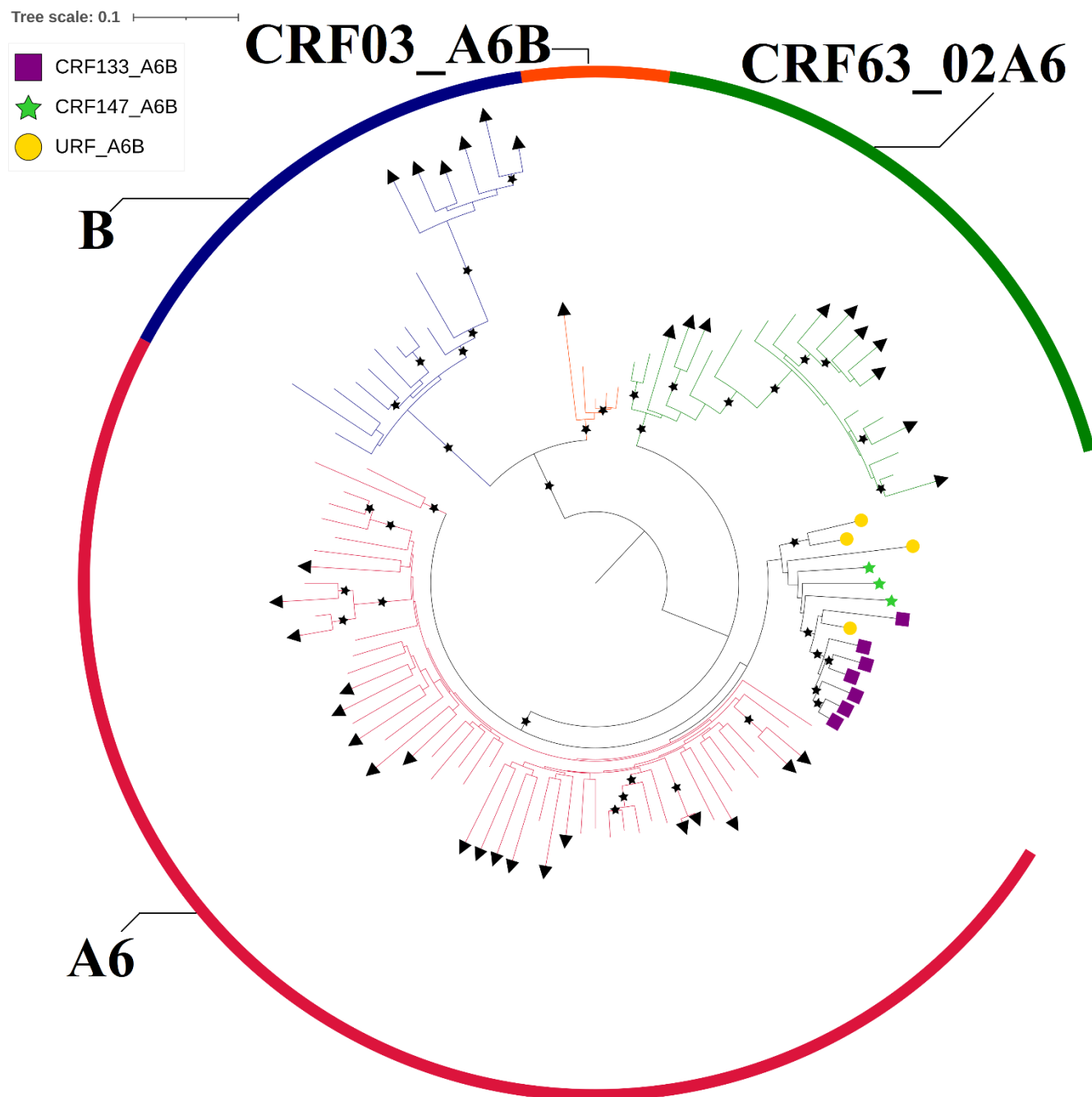


Рисунок 16 – Филогенетическое дерево полноразмерных последовательностей геномов 13 RF_A6B (включая CRF133_A6B и CRF147_A6B) ВИЧ-1.

Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия, филогенетические ветви с коэффициентом поддержки 100 отмечены звездочкой,

цветовая кодировка внешнего круга и ветвей описывает генетический вариант н.п., которые в него входят. Последовательности, полученные в ходе настоящего исследования, отмечены различными геометрическими фигурами, остальные н.п. являются референсными или наиболее генетически близкими из GenBank

Для подтверждения, что эти образцы являются новыми CRFs был проведен рекомбинационный анализ, представленный в таблице 14. Было показано, что каждая группа образцов: №12, №21, №100, №128, №132, №189, №263, №349 и №131, №204, №494 имеют одинаковую структуру генома и соответствуют требованиям Национальной лаборатории Лос Аламос по выделению в новую CRF. Данным ВИЧ-1 были присвоены обозначения CRF133_A6B и CRF147_A6B. Мозаичная структура этих CRFs представляет собой преобладание под-субтипа А6, содержащего три (CRF133_A6B) и два (CRF147_A6B) фрагмента субтипа В. В 1998 г. на территории России была выявлена CRF03_A6B ВИЧ-1, которая также возникла в результате рекомбинационных событий между под-субтипом А6 и субтипом В, но ее геном характеризуется преобладанием субтипа В [160]. Другие исследуемые последовательности (№64_2, №319 и MT369971) были классифицированы как URF_A6B, а последовательности, у которых были обнаружены вставки CRF63_02A6 (№324, №341, №514, №569 и №748) были обозначены как URF_A6/B/63.

Таблица 14 – Структура генома ВИЧ-1, формирующих кластер URF_A6B ВИЧ-1 по фрагменту гена PR-RT

Код образца по протяженному фрагменту генома	Генетический вариант по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras12	CRF133_A6B	<p>5' LTR 790 gag 2149 +/- 18 2376 +/- 63 2702 +/- 32 3218 +/- 23 3475 +/- 10 3786 +/- 25 vif vpr vpu rev tat env nef 9412 3' LTR</p> <p>■ A6 ■ B</p>
Kras21	CRF133_A6B	<p>5' LTR 790 gag 2148 +/- 20 2376 +/- 63 2702 +/- 32 3218 +/- 23 3475 +/- 10 3786 +/- 25 vif vpr vpu rev tat env nef 9412 3' LTR</p> <p>■ A6 ■ B</p>

Продолжение таблицы 14

Код образца по протяженному фрагменту генома	Генетический вариант по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras48	URF_A6/B/63	<p>Genomic map of Kras48 showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, env, tat, rev, nef, and 3' LTR. A legend indicates A6 (red), 63_02 (green), and B (blue). Key coordinates are marked: 796, 1132, 1626, 1974, 2279, 2734, 3203, 3481, 3812, 6139, 8372, and 9497.</p>
Kras64_1	A6	<p>Genomic map of Kras64_1 showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, env, tat, rev, nef, and 3' LTR. A legend indicates N/A (grey) and A1 (red). Key coordinates are marked: 1, 790, 9412, and 9719.</p>

Продолжение таблицы 14

Код образца по протяженному фрагменту генома	Генетический вариант по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras64_2	URF_A6B	<p>Genomic map of Kras64_2 (URF_A6B) showing the structure of the genome. The gag region is red, and the pol region is split into red (A6) and blue (B) segments. The nef region is red. The 5' LTR and 3' LTR are indicated. Nucleotide positions are marked: 790, 2702 +/- 32, 3212 +/- 17, and 9412.</p>
Kras100	CRF133_A6B	<p>Genomic map of Kras100 (CRF133_A6B) showing the structure of the genome. The gag region is red, and the pol region is split into red (A6) and blue (B) segments. The nef region is red. The 5' LTR and 3' LTR are indicated. Nucleotide positions are marked: 769, 2156, 2327, 2685, 3233, 3482, 3812, and 9603.</p>

Продолжение таблицы 14

Код образца по протяженному фрагменту генома	Генетический вариант по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras128	CRF133_A6B	<p>Genomic map for CRF133_A6B. The map shows the following genes and their coordinates (approximate):</p> <ul style="list-style-type: none"> 5' LTR: 790 gag: 790 - 2149 (+/- 19) gag-B junction: 2149 - 2374 (+/- 61) gag-A6 junction: 2374 - 2702 (+/- 32) pol: 2702 - 3218 (+/- 23) pol-A6 junction: 3218 - 3469 (+/- 17) pol-B junction: 3469 - 3794 (+/- 17) vif: 3794 - 4000 vpr: 4000 - 4100 vpu: 4100 - 4200 env: 4200 - 8500 rev: 8500 - 8600 tat: 8600 - 8700 nef: 8700 - 9412 3' LTR: 9412 <p>Legend: A6 (red), B (blue)</p>
Kras131	CRF147_A6B	<p>Genomic map for CRF147_A6B. The map shows the following genes and their coordinates (approximate):</p> <ul style="list-style-type: none"> 5' LTR: 790 gag: 790 - 2148 (+/- 20) gag-B junction: 2148 - 2387 (+/- 29) gag-A6 junction: 2387 - 2695 (+/- 25) pol: 2695 - 3218 (+/- 23) vif: 3794 - 4000 vpr: 4000 - 4100 vpu: 4100 - 4200 env: 4200 - 8500 rev: 8500 - 8600 tat: 8600 - 8700 nef: 8700 - 9412 3' LTR: 9412 <p>Legend: A6 (red), B (blue)</p>

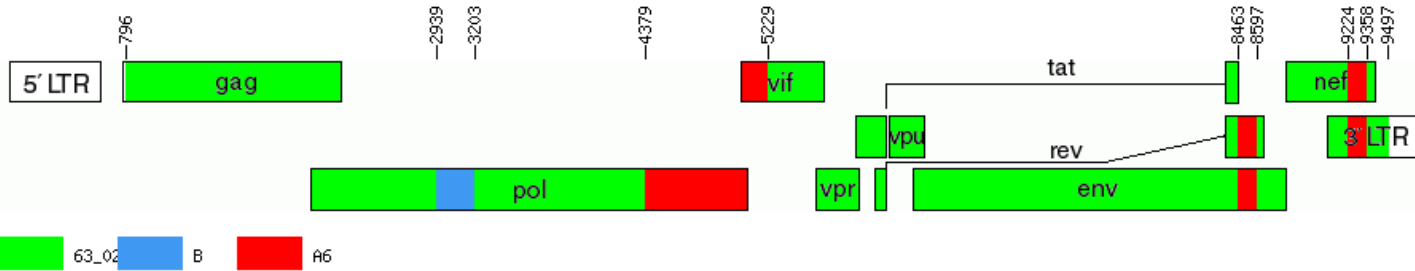
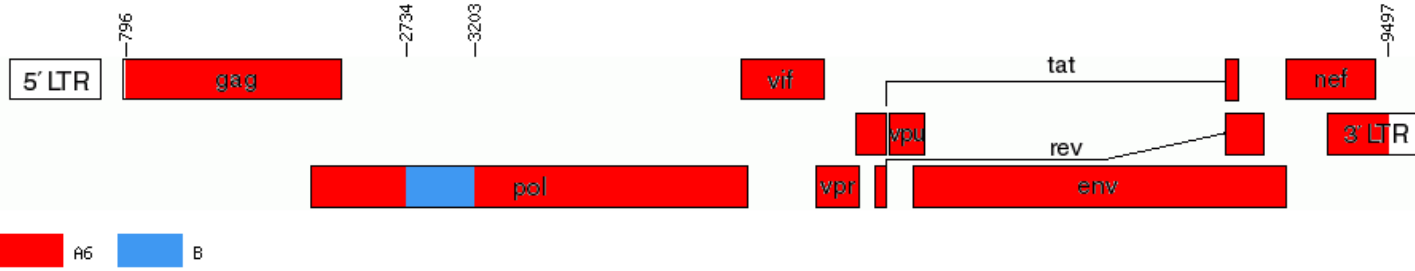
Продолжение таблицы 14

Код образца по протяженному фрагменту генома	Генетический вариант по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras132	CRF133_A6B	<p>Genomic map of CRF133_A6B variant for sample Kras132. The map shows the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, env, tat, rev, and nef regions. The gag region is split into A6 (red) and B (blue) segments. The pol region is also split into A6 (red) and B (blue) segments. The env region is split into A6 (red) and B (blue) segments. The nef region is split into A6 (red) and B (blue) segments. The 3' LTR is also present. The map includes coordinates: 5' LTR (-790), gag (-2142 to -2384), pol (-2715 to -3794), vif, vpr, vpu, env, tat, rev, nef, and 3' LTR (-9412).</p>
Kras189	CRF133_A6B	<p>Genomic map of CRF133_A6B variant for sample Kras189. The map shows the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, env, tat, rev, and nef regions. The gag region is split into A6 (red) and B (blue) segments. The pol region is also split into A6 (red) and B (blue) segments. The env region is split into A6 (red) and B (blue) segments. The nef region is split into A6 (red) and B (blue) segments. The 3' LTR is also present. The map includes coordinates: 5' LTR (-790), gag (-2147 to -2350), pol (-2702 to -3786), vif, vpr, vpu, env, tat, rev, nef, and 3' LTR (-9412).</p>

Продолжение таблицы 14

Код образца по протяженному фрагменту генома	Генетический вариант по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras204	CRF147_A6B	<p>Genomic map of CRF147_A6B showing gene structure and coordinates. The map includes 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, env, tat, rev, nef, and 3' LTR. Coordinates are marked at 796, 2168, 2315, 2669, 3046, and 9497. A legend indicates A6 in red and B in blue.</p>
Kras263	CRF133_A6B	<p>Genomic map of CRF133_A6B showing gene structure and coordinates. The map includes 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, env, tat, rev, nef, and 3' LTR. Coordinates are marked at 790, 2139, 2401, 2700, 3231, 3474, 3794, and 9412. A legend indicates A6 in red and B in blue.</p>

Продолжение таблицы 14

Код образца по протяженному фрагменту генома	Генетический вариант по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras274	URF_A6/B/63	 <p>Genomic map of Kras274 (URF_A6/B/63) showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, env, tat, rev, nef, and 3' LTR. A legend indicates 63_02 (green), B (blue), and A6 (red).</p>
Kras319	URF_A6B	 <p>Genomic map of Kras319 (URF_A6B) showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, env, tat, rev, nef, and 3' LTR. A legend indicates A6 (red) and B (blue).</p>

Продолжение таблицы 14

Код образца по протяженному фрагменту генома	Генетический вариант по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras324	URF_A6/B/63	<p>Genomic map for Kras324 (URF_A6/B/63). The map shows the following features and coordinates (approximate):</p> <ul style="list-style-type: none"> 5' LTR: 796 gag: 796-1986 vif: 5315 vpr: 6209 vpu: 6209 pol: 2747-3152 env: 6209-8285 tat: 8285 rev: 8571 nef: 9497 3' LTR: 9497 <p>Legend: A6 (red), 63_02 (green), B (blue).</p>
Kras341	URF_A6/B/63	<p>Genomic map for Kras341 (URF_A6/B/63). The map shows the following features and coordinates (approximate):</p> <ul style="list-style-type: none"> 5' LTR: 796 gag: 796-2747 vif: 5458 vpr: 6307 vpu: 6307 pol: 2747-3152 env: 6307-8201 tat: 8201 rev: 8201 nef: 9497 3' LTR: 9497 <p>Legend: A6 (red), B (blue), 63_02A6 (green).</p>

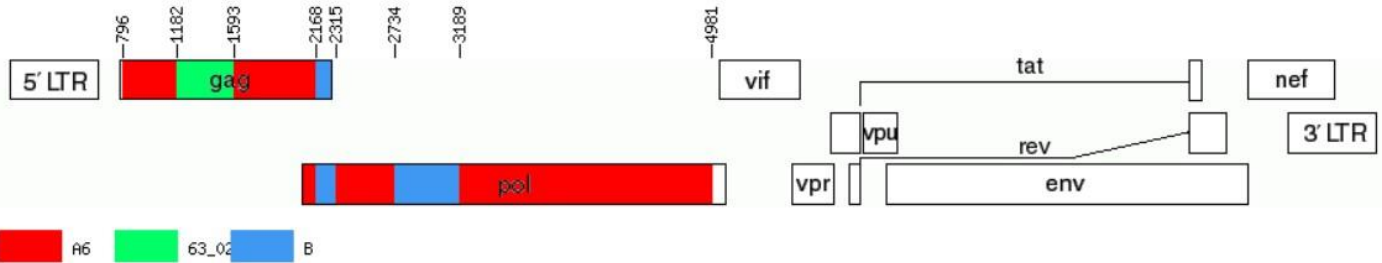
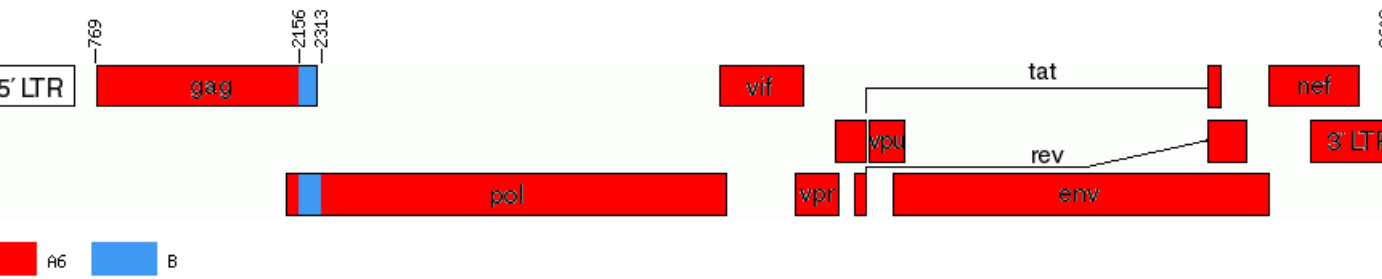
Продолжение таблицы 14

Код образца по протяженному фрагменту генома	Код образца по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras349	CRF133_A6B	<p>Genomic map of CRF133_A6B showing gene structure and coordinates. The map includes 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, rev, tat, env, nef, and 3' LTR. Coordinates are marked at -790, -2139, -2377, -2702, -3218, -3468, -3777, and 9412. A legend indicates A6 in red and B in blue.</p>
Kras494	CRF147_A6B	<p>Genomic map of CRF147_A6B showing gene structure and coordinates. The map includes 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, rev, tat, env, nef, and 3' LTR. Coordinates are marked at -804, -2175, -2346, -2731, -3200, and 9634. A legend indicates A6 in red and B in blue.</p>

Продолжение таблицы 14

Код образца по протяженному фрагменту генома	Код образца по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras512	CRF133_A6B	<p>Genomic map of CRF133_A6B. The map shows the following regions and coordinates (approximate):</p> <ul style="list-style-type: none"> 5' LTR: 796 gag: 2168, 2315 pol: 2734, 3209, 3481, 3812 vif: 4981 vpr vpu env tat rev nef 3' LTR <p>Legend: A6 (red), B (blue)</p>
Kras514	URF_A6/B/63	<p>Genomic map of URF_A6/B/63. The map shows the following regions and coordinates (approximate):</p> <ul style="list-style-type: none"> 5' LTR: 796 gag: 1119, 1668, 1986 pol: 2408, 2753, 3209, 3481, 3812 vif vpr vpu env tat rev nef 3' LTR <p>Legend: A6 (red), 63_02 (green), B (blue)</p>

Продолжение таблицы 14

Код образца по протяженному фрагменту генома	Код образца по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras569	URF_A6/B/63	 <p>Genomic map of Kras569 showing gene structure. The 5' LTR is at the start. The gag gene is highlighted in red (A6) and green (63_02). The pol gene is red (A6) and blue (B). The vif gene is at 4981. The vpr, vpu, and env genes are shown. The tat and rev genes are also present. The nef gene is at the end. The 3' LTR is at the end. Coordinates are marked at 796, 1182, 1593, 2168, 2315, 2734, 3189, and 4981. A legend indicates A6 (red), 63_02 (green), and B (blue).</p>
Kras739	URF_A6B	 <p>Genomic map of Kras739 showing gene structure. The 5' LTR is at the start. The gag gene is red (A6) and blue (B). The pol gene is red (A6) and blue (B). The vif gene is at 769. The vpr, vpu, and env genes are shown. The tat and rev genes are also present. The nef gene is at 9603. The 3' LTR is at the end. Coordinates are marked at 769, 2156, 2313, and 9603. A legend indicates A6 (red) and B (blue).</p>

Продолжение таблицы 14

Код образца по протяженному фрагменту генома	Код образца по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras748	URF_A6/B/63	<p>Genomic map for Kras748 (URF_A6/B/63). The map shows the following features and coordinates (approximate):</p> <ul style="list-style-type: none"> 5' LTR: 769 gag: 1120, 1626, 1984 pol: 2372, 2685, 3198 vif: 6336 vpr: 6336 vpu: 6336 env: 8438 tat: 8438 rev: 8438 nef: 9045 3' LTR: 9603 <p>Legend: A6 (red), B (blue), 63 (green).</p>
MT369971	URF_A6B	<p>Genomic map for MT369971 (URF_A6B). The map shows the following features and coordinates (approximate):</p> <ul style="list-style-type: none"> 5' LTR: 790 gag: 2702 pol: 3211, 3475, 3786 vif: 32 vpr: 28 vpu: 10 env: 25 tat: 9409 rev: 9409 nef: 9409 3' LTR: 9409 <p>Legend: A6 (red), B (blue).</p>

Предварительный анализ нуклеотидных последовательностей с использованием *jpHMM* выявил присутствие от двух до шести точек рекомбинации во всех исследуемых последовательностях ВИЧ-1 URF_A6B, в том числе CRF133_A6B и CRF147_A6B. Алгоритмы программного обеспечения показали, что эти последовательности являются рекомбинантами между ВИЧ-1 под-субтипа А6 и субтипом В (Рисунок 17А); все точки рекомбинации были подтверждены ПО *Simplot* (Рисунок 17Б). Таким образом, две группы образцов, состоящие из восьми (№12, №21, №100, №128, №132, №189, №263, №349) и трех (№131, №204, №494) нуклеотидных последовательностей имели идентичные рекомбинационные профили с шестью и четырьмя точками рекомбинации, разделяющими геном на семь (I-VII) и пять (I-V) геномных фрагментов соответственно. Одна последовательность (MT369971) имела четыре точки рекомбинации, которые разделили геном на пять фрагментов, а две другие последовательности (№64_2, №319) была разделена на три фрагмента двумя точками рекомбинации.

Дальнейший анализ был проведен для проверки рекомбинации и выявления филогенетической связи исследуемых последовательностей. Для каждого субрегиона были построены филогенетические деревья (Рисунок 18-19). Филогенетический анализ фрагментов I, III, V и VII CRF133_A6B ВИЧ-1 и I, III, V CRF147_A6B ВИЧ-1 подтвердил их принадлежность к под-субтипу А6. Данные фрагменты оказались наиболее тесно связаны с последовательностями под-субтипа А6, циркулирующими в России и странах бывшего СССР (Украине, Республике Беларусь и Кыргызской Республике).

Филогенетический анализ фрагментов II, IV и VI CRF133_A6B ВИЧ-1 и II, IV CRF147_A6B ВИЧ-1 показал их принадлежность к субтипу В. Так, фрагмент II в CRF133_A6B и CRF147_A6B ВИЧ-1 был связан с последовательностями субтипа В из России и стран бывшего СССР, в том числе и с 99GEMZ003 (DQ207943), выделенной в Грузии, который является родительским штаммом субтипа В в CRF03_A6B; фрагмент IV в CRF133_A6B и в CRF147_A6B ВИЧ-1, а также фрагмент VI в CRF133_A6B показали родство с областью субтипа В из CRF03_A6B

ВИЧ-1, выделенных в России, Украине, Республике Беларусь и Кыргызской Республике.

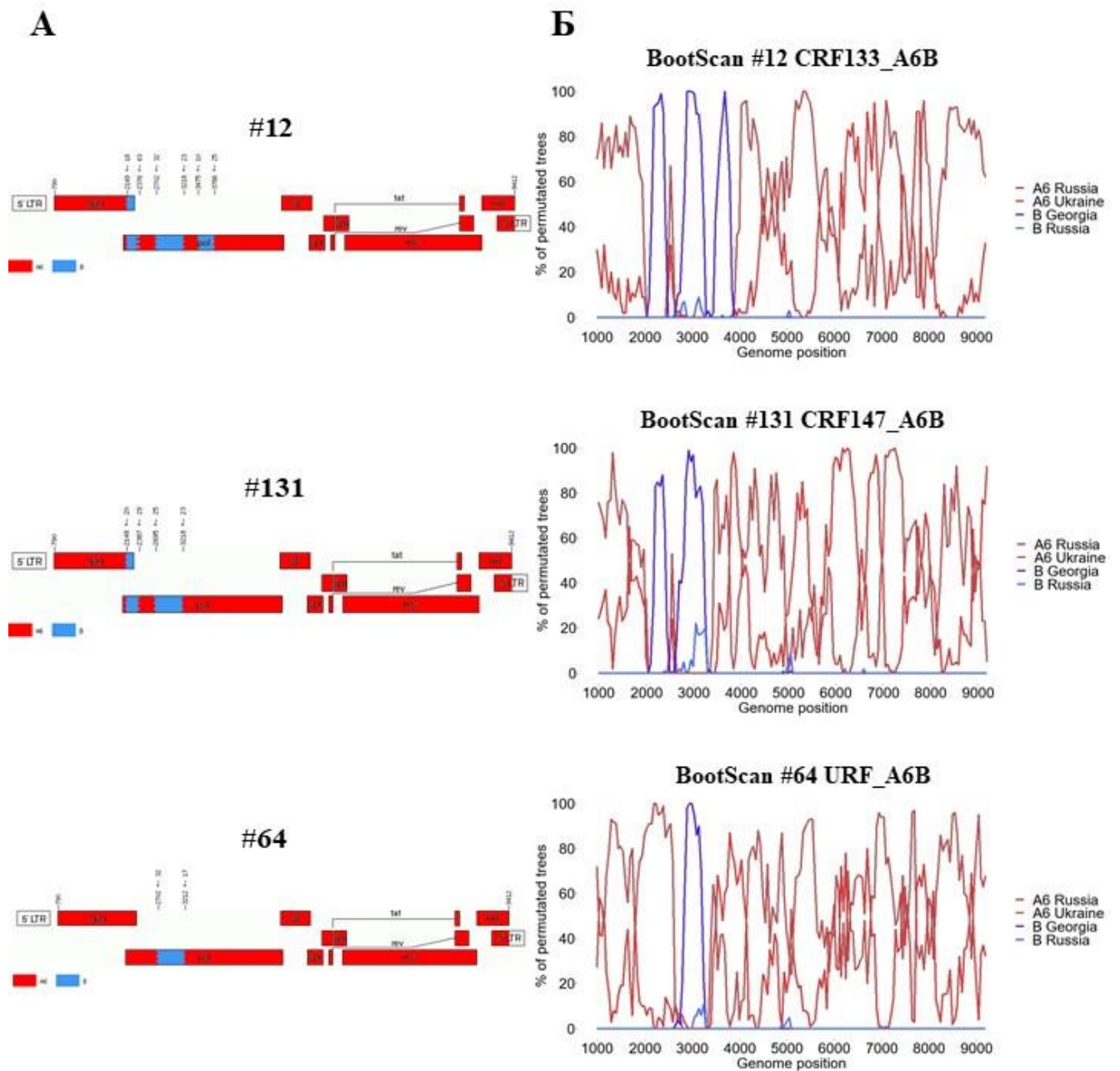


Рисунок 17 – Мозаичная структура геномов (А) и BootScan плотности (Б) новых рекомбинантов ВИЧ-1 А6В

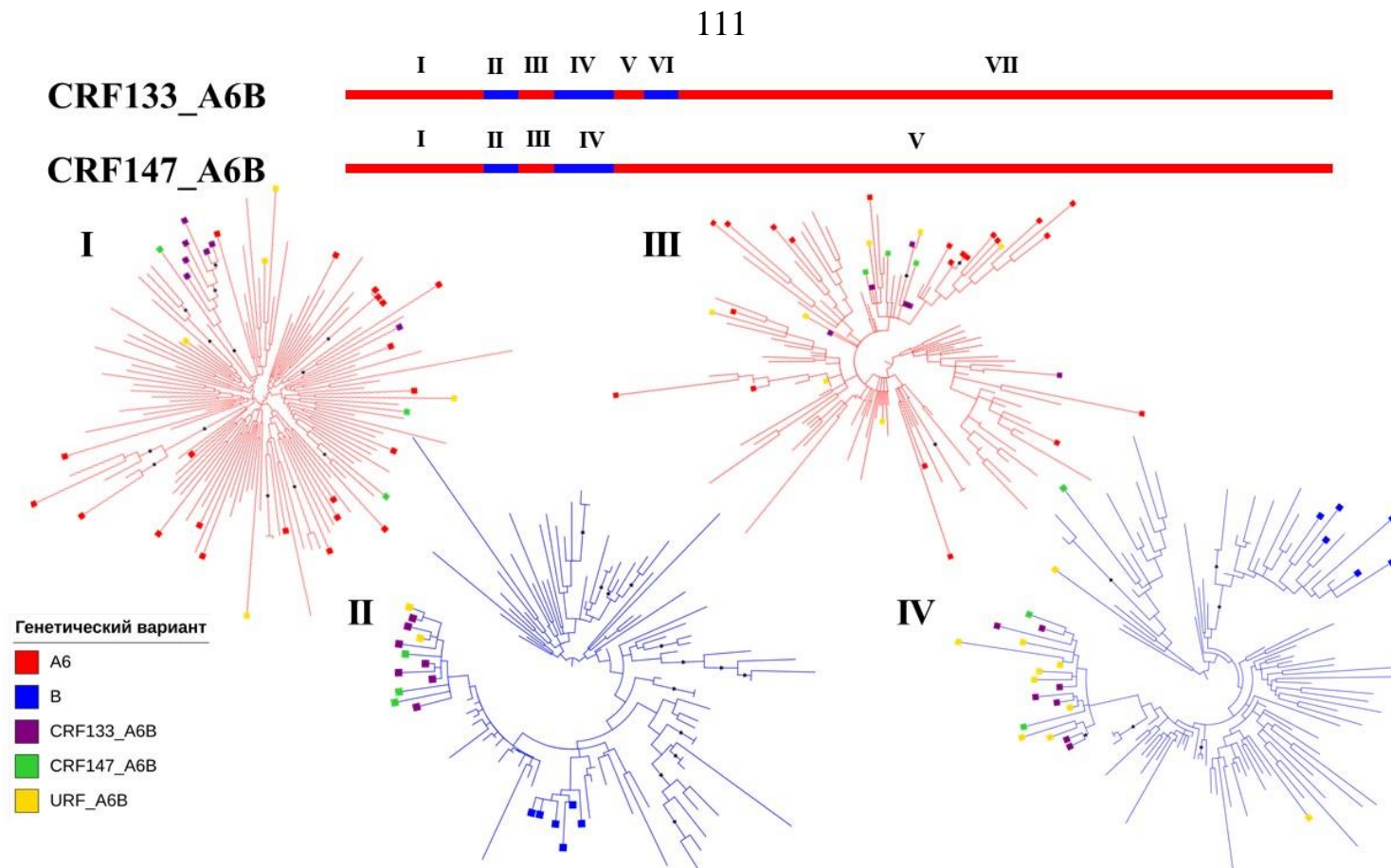


Рисунок 18 – Филогенетические деревья фрагментов I-IV CRF133_A6B и CRF147_A6B ВИЧ-1. Филогенетические деревья построены методом максимального правдоподобия, филогенетические ветви с коэффициентом поддержки 100 отмечены звездочкой. Ветви деревьев окрашены в соответствии с геновариантом фрагментов ВИЧ-1 (ветви фрагментов под-субтипа А6 окрашены красным, субтипа В – синим); последовательности ВИЧ-1, полученные в ходе исследования отмечены квадратом (цветовая маркировка легенды указывает на генетический вариант ВИЧ-1, определенного по полному геному), остальные н.п. являются референсными или наиболее генетически близкими из GenBank

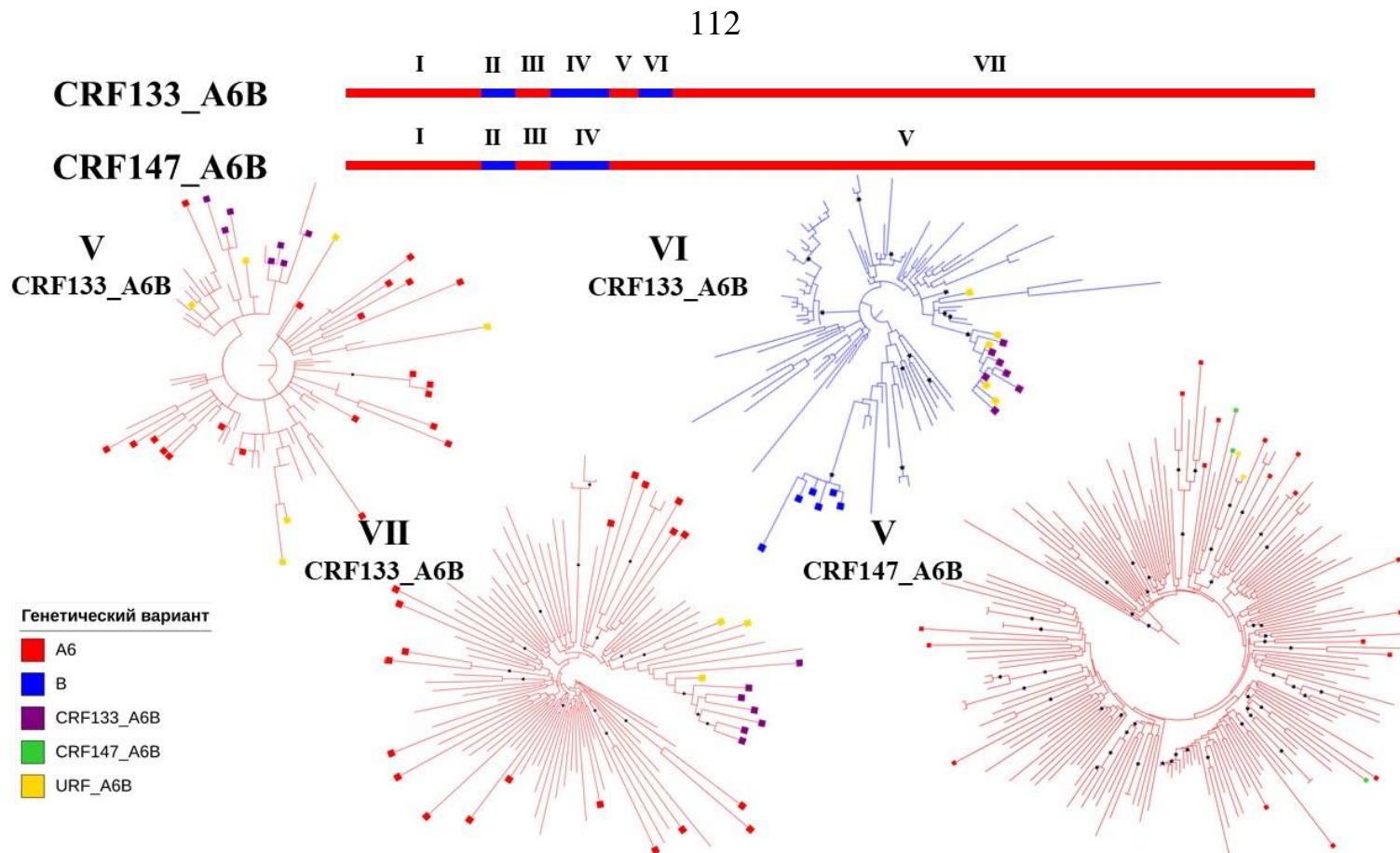


Рисунок 19 – Филогенетические деревья фрагментов V-VII CRF133_A6B и CRF147_A6B ВИЧ-1. Филогенетические деревья построены методом максимального правдоподобия, филогенетические ветви с коэффициентом поддержки 100 отмечены звездочкой. Ветви деревьев окрашены в соответствии с геновариантом фрагментов ВИЧ-1 (ветви фрагментов под-субтипа А6 окрашены красным, субтипа В – синим); последовательности ВИЧ-1, полученные в ходе исследования отмечены квадратом (цветовая маркировка легенды указывает на генетический вариант ВИЧ-1, определенного по полному геному), остальные н.п. являются референсными или наиболее генетически близкими из GenBank

Важно отметить, что рекомбинационный анализ протяженных фрагментов выявил дополнительные последовательности, которые были отнесены к URF_A6/B/63 (по фрагменту гена *pol*, кодирующего PR-RT, были обнаружены только два из них). URF_A6/B/63 ВИЧ-1 могут являться рекомбинантами второго или третьего поколения, т.е. рекомбинация могла произойти между ВИЧ-1 под-субтипа А6, субтипа В и CRF63_02А6 или между ВИЧ-1 CRF63_02А6 и URF_A6В соответственно.

Текущий анализ дополняет другие исследования по выявлению новых рекомбинантных форм ВИЧ-1 [43; 63; 113; 156; 215; 268; 274]. Выявление RFs вируса указывает на случаи суперинфекции/ко-инфекции ВИЧ-1, которые способствуют его дальнейшей эволюции. Корректная идентификация новых генетических вариантов ВИЧ-1 имеет важное значение для прогнозирования развития эпидемии ВИЧ-инфекции в России.

3.2.2.2 Уникальные рекомбинантные формы ВИЧ-1, выявленные на территории Красноярского края

Анализ исследуемых ВИЧ-1 показал, что 11,5% (92/800) являются различными URFs: URF_63/А6, RF_A6В, URF_02А6 и URF_A6/B/63, которые были выделены в 8,6%, 2,0%, 0,6% и 0,3% соответственно. Как было сказано ранее для 45 URFs ВИЧ-1 были получены полноразмерные последовательности геномов ВИЧ-1: 23 URF_63/А6, 14 URF_A6В, 6 URF_A6/B/63 и 2 URF_02А6. Данные пациентов, у которых были выделены URF_63/А6 ВИЧ-1 и их рекомбинационные картины представлены в таблицах 15 и 16 соответственно (данные пациентов, у которых были выделены URF_A6В и URF_A6/B/63 представлены в таблицах 13 и 14 соответственно). URF_63/А6 ВИЧ-1 были выделены от двух женщин и 21 мужчины, средний возраст которых составил 37,6 лет, а диагноз ВИЧ-инфекции был поставлен в период с декабря 2001 г. по ноябрь 2021 г. Одна женщина была

инфицирована ВИЧ-1 гетеросексуальным путем, а другая – парентеральным путем. Среди мужчин преобладал парентеральный путь передачи ВИЧ-инфекции, о нем сообщили 11 человек, 8 указали, что заразились ВИЧ-инфекции путем гетеросексуальных контактов, и по одному случаю пришлось на вертикальный путь передачи и через гомосексуальные контакты. Абсолютное большинство ЛЖВ (87,0%), у которых были выделены URF_63/A6 ВИЧ-1 проживали в г. Красноярск, оставшиеся 3 пациента проживали в п. Емельяново, п. Козульке и с. Богучаны, расположенных в 26 км, 113 км и 567 км от г. Красноярск соответственно.

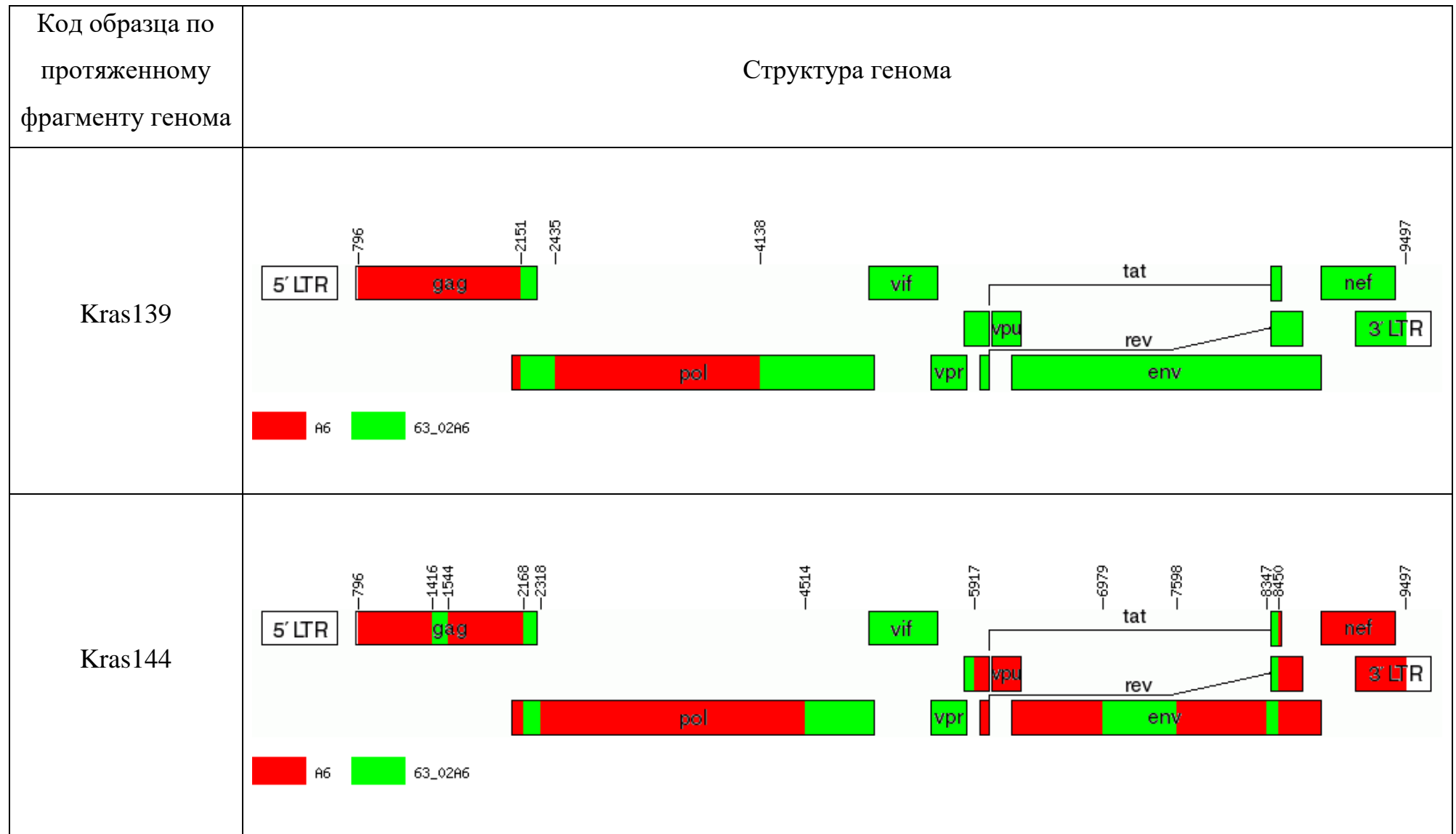
Таблица 15 – Демографические и клинические характеристики пациентов с ВИЧ-инфекцией, вызванной ВИЧ-1 URF_63/А6 (ГТСК – гетеросексуальный путь передачи ВИЧ-инфекции, ИБ+ – положительный иммуноблот)

Код образца по фрагменту гена PR-RT	Код образца по протяженному фрагменту генома	Сбор образца (ММ.ГГГГ)	Место проживания	Пол	Возраст	Путь инфицирования	Дата ИБ+ (ММ.ГГГГ)
139_AUG_2020	Kras139	08.2020	Красноярск	м	35	парентеральный	09.2014
144_AUG_2020	Kras144	08.2020	Красноярск	м	38	ГТСК	10.2016
153_AUG_2020	Kras153	08.2020	Красноярск	м	34	ГТСК	05.2016
211_MAR_2021	Kras211	03.2021	Красноярск	м	39	парентеральный	01.2016
266_NOV_2021	Kras266	11.2021	Красноярск	м	40	ГТСК	11.2015
277_NOV_2021	Kras277	11.2021	Красноярск	м	45	ГТСК	03.2017
305_NOV_2021	Kras305	11.2021	Козулька	м	39	парентеральный	10.2018
335_FEB_2022	Kras335	02.2022	Красноярск	м	37	ГТСК	02.2018
379_APR_2022	Kras379	04.2022	Красноярск	м	2	вертикальный	04.2019
414_APR_2022	Kras414	04.2022	Красноярск	ж	34	парентеральный	10.2013
445_JUN_2022	Kras445	06.2022	Красноярск	м	39	ГТСК	01.2015
458_JUN_2022	Kras458	06.2022	Емельяново	м	48	парентеральный	02.2019
482_AUG_2022	Kras482	08.2022	Красноярск	м	32	МСМ	12.2014
504_NOV_2022	Kras504	11.2022	Богучаны	м	40	парентеральный	03.2021

Продолжение таблицы 15

Код образца по фрагменту гена PR-RT	Код образца по протяженному фрагменту генома	Сбор образца (ММ.ГГГГ)	Место проживания	Пол	Возраст	Путь инфицирования	Дата ИБ+ (ММ.ГГГГ)
507_NOV_2022	Kras507	11.2022	Красноярск	м	48	парентеральный	09.2019
517_NOV_2022	Kras517	11.2022	Красноярск	ж	52	ГТСК	11.2021
529_NOV_2022	Kras529	11.2022	Красноярск	м	41	парентеральный	01.2015
544_NOV_2022	Kras544	11.2022	Красноярск	м	35	ГТСК	06.2018
564_FEB_2023	Kras564	02.2023	Красноярск	м	45	парентеральный	07.2019
567_FEB_2023	Kras567	02.2023	Красноярск	м	29	парентеральный	11.2021
575_FEB_2023	Kras575	02.2023	Красноярск	м	34	ГТСК	11.2015
584_FEB_2023	Kras584	02.2023	Красноярск	м	37	парентеральный	06.2018
593_MAY_2023	Kras594	05.2023	Красноярск	м	41	парентеральный	12.2001

Таблица 16 – Рекомбинационная картина URF_63/A6 ВИЧ-1



Продолжение таблицы 16

Код образца по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras153	<p>Genomic map of Kras153 showing gene structure. The 5' LTR is at position 796. The gag gene is red (A6) from 796 to 2096 and green (63_02A6) from 2096 to 2279. The pol gene is red (A6) from 2279 to 5518. The vif gene is red (A6) from 5518 to 5790. The vpr gene is green (63_02A6) from 5790 to 5998. The vpu gene is red (A6) from 5998 to 6123. The env gene is red (A6) from 6123 to 8473. The tat gene is red (A6) from 8473 to 8937. The rev gene is red (A6) from 8937 to 9044. The nef gene is green (63_02A6) from 9044 to 9497. The 3' LTR is green (63_02A6) from 9497 to the end. A legend indicates red represents A6 and green represents 63_02A6.</p>
Kras211	<p>Genomic map of Kras211 showing gene structure. The 5' LTR is at position 796. The gag gene is green (63_02A6) from 796 to 1012 and red (A6) from 1012 to 1593. The pol gene is green (63_02A6) from 1593 to 1990 and red (A6) from 1990 to 2444. The vif gene is red (A6) from 2444 to 2581. The vpr gene is green (63_02A6) from 2581 to 2874. The vpu gene is green (63_02A6) from 2874 to 5998. The env gene is green (63_02A6) from 5998 to 8473. The tat gene is red (A6) from 8473 to 8937. The rev gene is red (A6) from 8937 to 9044. The nef gene is green (63_02A6) from 9044 to 9497. The 3' LTR is green (63_02A6) from 9497 to the end. A legend indicates red represents A6 and green represents 63_02A6.</p>

Продолжение таблицы 16

Код образца по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras266	<p>Genomic map of Kras266 showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, env, tat, rev, nef, and 3' LTR. Coordinates are marked at 796, 1626, 1839, 2417, 2975, 3379, 4712, 5423, 6231, 8272, 8856, 9387, and 9497. A legend at the bottom left shows a green box for 63_02 and a red box for A6.</p>
Kras277	<p>Genomic map of Kras277 showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, env, tat, rev, nef, and 3' LTR. Coordinates are marked at 796, 1137, 2096, 2873, 5423, 6231, 8272, 8869, and 9497. A legend at the bottom left shows a green box for 63_02 and a red box for A6.</p>

Продолжение таблицы 16

Код образца по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras305	<p>Genomic structure diagram for Kras305. The diagram shows the organization of the HIV-1 genome with various genes and their coordinates. The 5' LTR is at the start, followed by gag (796-2279), pol (2279-4475), vif (3405-3896), vpr (6234-6521), vpu (6234-6521), tat (7652-8250), rev (8250-9497), and nef (9497-9497). The 3' LTR is at the end. A legend at the bottom shows a green box for '63_02' and a red box for 'A6'.</p>
Kras335	<p>Genomic structure diagram for Kras335. The diagram shows the organization of the HIV-1 genome with various genes and their coordinates. The 5' LTR is at the start, followed by gag (796-1836), pol (1836-2903), vif (2408-2627), vpr (6234-6521), vpu (6234-6521), tat (7652-8250), rev (8250-9497), and nef (9497-9497). The 3' LTR is at the end. A legend at the bottom shows a green box for '63_02' and a red box for 'A6'.</p>

Продолжение таблицы 16

Код образца по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras379	<p>Genomic map of Kras379 showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, env, tat, rev, nef, and 3' LTR regions. The gag region is split into A6 (red) and 63_02A6 (green) segments. The pol region is primarily A6 (red) with a 63_02A6 (green) segment at the beginning. The env region is primarily 63_02A6 (green) with A6 (red) segments at the beginning and end. The tat and rev regions are connected by lines, indicating they are part of the same transcript. The nef region is A6 (red). The 3' LTR is A6 (red). The coordinates for the regions are: 5' LTR (796-1060), gag (1060-1699), pol (2361-2874), vif (6281-8372), vpr (8372-9497), vpu (8372-9497), env (8372-9497), tat (8372-9497), nef (9497-9497), and 3' LTR (9497-9497). A legend indicates that red represents A6 and green represents 63_02A6.</p>
Kras414	<p>Genomic map of Kras414 showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, env, tat, rev, nef, and 3' LTR regions. The gag region is split into A6 (red) and 63_02A6 (green) segments. The pol region is primarily A6 (red) with a 63_02A6 (green) segment at the beginning. The env region is primarily 63_02A6 (green) with A6 (red) segments at the beginning and end. The tat and rev regions are connected by lines, indicating they are part of the same transcript. The nef region is A6 (red). The 3' LTR is A6 (red). The coordinates for the regions are: 5' LTR (796-2151), gag (2151-2435), pol (2627-2846), vif (5582-5760), vpr (5987-8490), vpu (8490-9497), env (8490-9497), tat (8490-9497), nef (9497-9497), and 3' LTR (9497-9497). A legend indicates that red represents A6 and green represents 63_02A6.</p>

Продолжение таблицы 16

Код образца по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras445	<p>Genomic map of Kras445 showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, tat, rev, env, nef, and 3' LTR. The gag, pol, vif, vpr, and tat genes are shown in red, indicating they are from the A6 strain. The vpu, rev, env, and nef genes are shown in green, indicating they are from the 63_02A6 strain. The 5' LTR and 3' LTR are shown in white. The map shows the relative positions of these genes along the genome, with coordinates marked above the features: 813, 6733, 9299, and 9579. A legend at the bottom indicates that red represents A6 and green represents 63_02A6.</p>
Kras458	<p>Genomic map of Kras458 showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, tat, rev, env, nef, and 3' LTR. The gag, pol, vpr, vpu, tat, rev, and env genes are shown in green, indicating they are from the 63_02 strain. The vif, nef, and 3' LTR genes are shown in red, indicating they are from the A6 strain. The 5' LTR is shown in white. The map shows the relative positions of these genes along the genome, with coordinates marked above the features: 809, 1597, 2094, 2406, 2526, 3377, 4473, 5758, 6027, 8415, 9005, and 9493. A legend at the bottom indicates that green represents 63_02 and red represents A6.</p>

Продолжение таблицы 16

Код образца по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras482	<p>Genomic map for Kras482 showing gene structure. The map includes the following elements and coordinates:</p> <ul style="list-style-type: none"> 5' LTR (white box) gag (red box, coordinate 796) pol (red box) vif (red box) vpr (red box) vpu (red box) env (red box) tat (red box, coordinate 8331) rev (red box) nef (green box, coordinate 9358) 3' LTR (white box, coordinate 9497) <p>Legend: Red box = A6, Green box = 63_02A6.</p>
Kras504	<p>Genomic map for Kras504 showing gene structure. The map includes the following elements and coordinates:</p> <ul style="list-style-type: none"> 5' LTR (white box) gag (green/red box, coordinates 763, 1129, 2133) pol (green/red box, coordinates 2819, 4370) vif (green box, coordinate 6914) vpr (green box, coordinate 6999) vpu (green/red box, coordinate 7631) env (green/red box, coordinate 8048) tat (green box, coordinate 9501) rev (green box) nef (green box, coordinate 9501) 3' LTR (white box, coordinate 9501) <p>Legend: Green box = 63_02, Red box = A6.</p>

Продолжение таблицы 16

Код образца по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras507	<p>Genomic map of Kras507 showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, tat, rev, env, nef, and 3' LTR. The gag gene is red (A6) with a green (63_02A6) segment at the end. The pol gene is red (A6) with a green (63_02A6) segment at the beginning. The env gene is red (A6) with a green (63_02A6) segment in the middle. The nef gene is red (A6). The 3' LTR is red (A6). The vif, vpr, vpu, tat, rev, and env genes have green (63_02A6) segments. The coordinates are marked at 801, 2150, 2443, 2995, 3181, 6623, 7649, 8233, 8451, and 9512.</p>
Kras517	<p>Genomic map of Kras517 showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, tat, rev, env, nef, and 3' LTR. The gag gene is red (A6) with a green (63_02A6) segment at the end. The pol gene is green (63_02A6). The env gene is red (A6) with a green (63_02A6) segment in the middle. The nef gene is green (63_02A6). The 3' LTR is green (63_02A6). The vif, vpr, vpu, tat, rev, and env genes have red (A6) segments. The coordinates are marked at 796, 1926, 6353, 7386, 7480, 8285, 9389, and 9497.</p>

Продолжение таблицы 16

Код образца по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras529	<p>Genomic map of Kras529 showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, tat, rev, env, nef, and 3' LTR. Coordinates are marked at 763, 1183, 2051, 2312, 2948, 3296, 4118, 7313, 7485, 8511, and 9461. A legend indicates green represents 63_02 and red represents A6.</p>
Kras544	<p>Genomic map of Kras544 showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, tat, rev, env, nef, and 3' LTR. Coordinates are marked at 796, 2151, 2735, 4952, 8387, 8581, 8817, and 9497. A legend indicates red represents A6 and green represents 63_02A6.</p>

Продолжение таблицы 16

Код образца по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras564	<p>Genomic map of Kras564 showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, env, tat, rev, nef, and 3' LTR. Red segments represent A6 and green segments represent 63_02A6. Coordinates are marked above the map: 763, 1053, 1472, 2103, 2378, 2834, 3804, 4090, 8679, 9141, 9465.</p>
Kras567	<p>Genomic map of Kras567 showing gene structure. The map includes the 5' LTR, gag, pol, vif, vpr, vpu, env, tat, rev, nef, and 3' LTR. Red segments represent A6 and green segments represent 63_02A6. Coordinates are marked above the map: 763, 1099, 3372, 4145, 8766, 9228, 9342, 9477.</p>

Продолжение таблицы 16

Код образца по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras575	<p>Genomic map of Kras575 showing gene structure. The 5' LTR is at position 825. The gag gene is red (A6) and ends at 825. The pol gene is red (A6) and spans from approximately 1000 to 6000. The vif gene is red (A6) and ends at 5563. The vpr and vpu genes are green (63_02A6). The env gene is green (63_02A6) and spans from approximately 6500 to 8600. The tat and rev genes are green (63_02A6) and are located between vpu and env. The nef gene is red (A6) and ends at 8688. The 3' LTR is at position 9549. A legend indicates that red boxes represent A6 and green boxes represent 63_02A6.</p>
Kras584	<p>Genomic map of Kras584 showing gene structure. The 5' LTR is at position 766. The gag gene is red (A6) and ends at 1371. The pol gene is red (A6) and spans from approximately 1500 to 4400. The vif gene is green (63_02A6) and ends at 4430. The vpr and vpu genes are green (63_02A6). The env gene is green (63_02A6) and spans from approximately 6500 to 9000. The tat and rev genes are green (63_02A6) and are located between vpu and env. The nef gene is red (A6) and ends at 9092. The 3' LTR is at position 9473. A legend indicates that green boxes represent 63_02A6 and red boxes represent A6.</p>

Продолжение таблицы 16

Код образца по протяженному фрагменту генома	Структура генома
Kras594	<p>The diagram illustrates the genomic structure of Kras594. It features a 5' LTR followed by the gag gene (red box, ending at position 803). The pol gene (red box) is located below the gag gene. The vif gene (red box) is positioned above the pol gene, with its start at position 5787. The vpr gene (red box) and vpu gene (green box) are located below the vif gene, with vpr starting at 5787 and vpu starting at 6380. The env gene (red box) is located below the vpr and vpu genes. The tat gene (red box) is located above the env gene, and the rev gene (red box) is located below the env gene. The nef gene (red box) is located above the 3' LTR, which ends at position 9534. A legend at the bottom left indicates that red boxes represent the A6 variant and green boxes represent the 63_02A6 variant.</p>

Филогенетический анализ (Рисунок 20) 29 URFs ВИЧ-1, геном которых включает в себя участки CRF63_02A6, показал, что 17 из этих ВИЧ-1 (№48, №139, №211, №266, №341, №379, №414, №458, №504, №507, №514, №529, №544, №564, №575, №584, №748) группируются на филогенетическом дереве вместе и образуют общую филогенетическую кладу с CRF63_02A6 ВИЧ-1, причем 4 из них (№48, №341, №514, №748) формируют отдельную монофилетическую кладу с коэффициентом поддержки 100. Помимо этого 5 других полноразмерных последовательностей ВИЧ-1 (№144, №277, №324, №335, №517), которые также также группируются вместе, но образуют общую филогенетическую кладу с RF_A6B ВИЧ-1. Оставшиеся 7 последовательностей группировались с «чистыми» генетическими вариантами ВИЧ-1: 3 н.п. группировались с CRF63_02A6 (№274, №305, №567), а 4 – с под-субтипом А6 (№153, №445, №482, №594).

Рекомбинационный анализ URFs ВИЧ-1 (Рисунок 21-24), в геном которых входит CRF63_02A6 показал, что каждый из выделенных ВИЧ-1 имеет уникальную структуру генома. Анализ структуры рекомбинации 17 URFs ВИЧ-1 (№48, №139, №211, №266, №341, №379, №414, №458, №504, №507, №514, №529, №544, №564, №575, №584, №748) (Рисунок 21), группирующихся вместе показал, что чем ближе исследуемые последовательности к CRF63_02A6 ВИЧ-1, тем большая часть генома соответствует CRF63_02A6 ВИЧ-1, и наоборот. Рекомбинационный анализ образцов (№48, №341, №514, №748) из монофилетической клады с коэффициентом поддержки 100 показал, что в каждом из этих URFs ВИЧ-1 присутствуют вставки ВИЧ-1 субтипа В, координаты которых совпадают со вставками субтипа В в URF_A6B ВИЧ-1. Рекомбинационный анализ других 5 URFs (№144, №277, №324, №335, №517) (Рисунок 22) не выявил закономерностей в их структуре генома. Анализ структур генома URFs ВИЧ-1, группирующихся с под-субтипом А6 (№153, №445, №482, №594) (Рисунок 23) и CRF63_02A6 (№274, №305, №567) (Рисунок 24) показал, что от 71,2% до 93,3% генома этих URFs ВИЧ-1 относятся к генетическому варианту (под-субтипу А6 или CRF63_02A6), с которыми они группируются.

Анализ структур генома всех исследуемых полногеномных последовательностей URFs ВИЧ-1, а также новых CRF133_A6B и CRF147_A6B (Рисунок 25) показал высокую частоту рекомбинационных событий в районах *gag-pol* и регуляторных генах, таких как *vif-vpr-vpu* и *nef*. При этом наиболее устойчивым к рекомбинации является ген *env*, кодирующий белки gp120 и gp41, необходимые для связывания вирусной частицы с клеткой-мишенью.

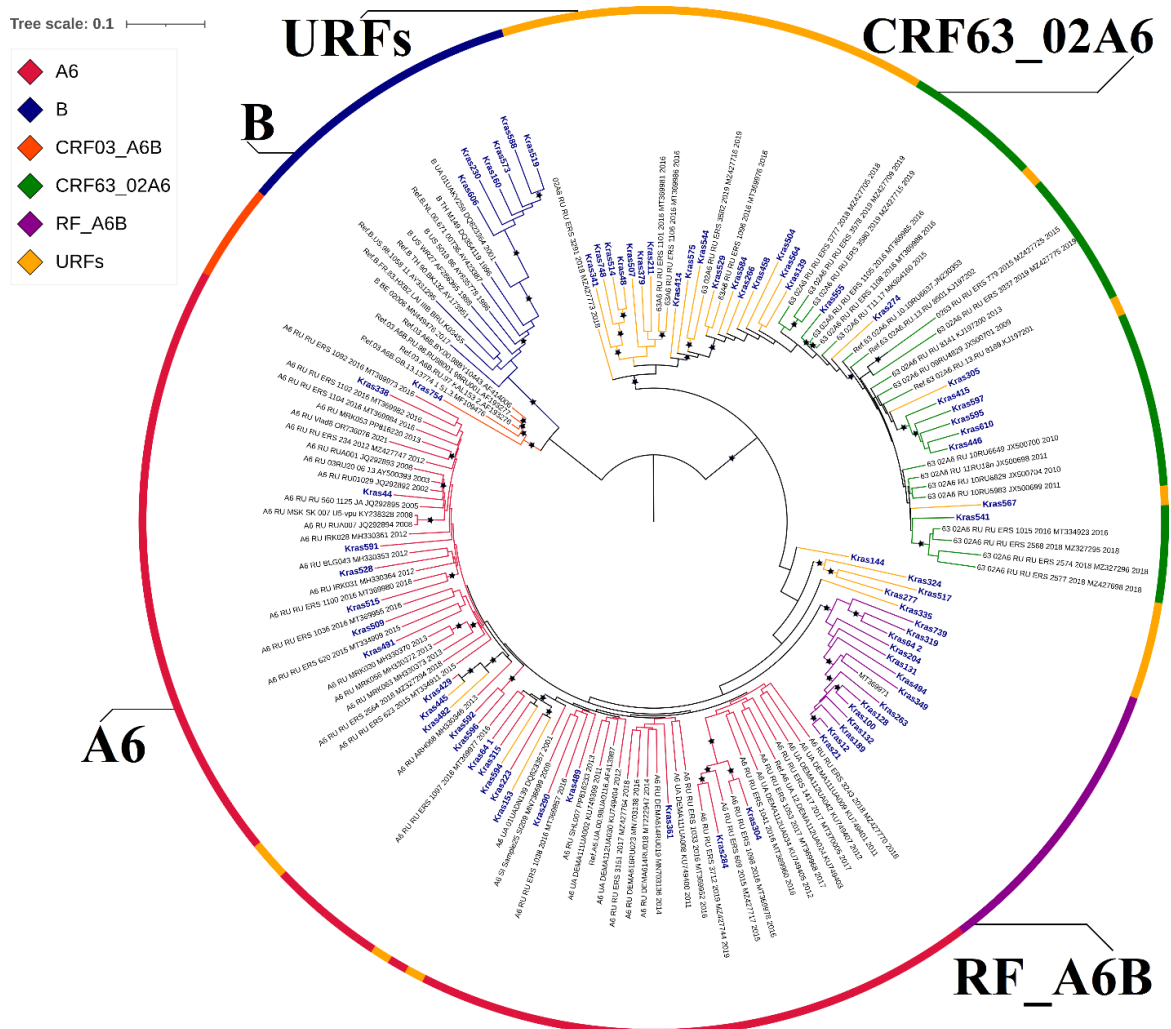


Рисунок 20 – Филогенетическое дерево всех полноразмерных последовательностей ВИЧ-1, полученных в ходе исследования. Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия, филогенетические ветви с коэффициентом поддержки 100 отмечены звездочкой, цветовая кодировка внешнего круга и ветвей описывает генетический вариант н.п., которые в него входят, в соответствии с легендой. Последовательности, полученные в ходе настоящего исследования, выделены синим цветом, остальные н.п. являются референсными или наиболее генетически близкими из GenBank

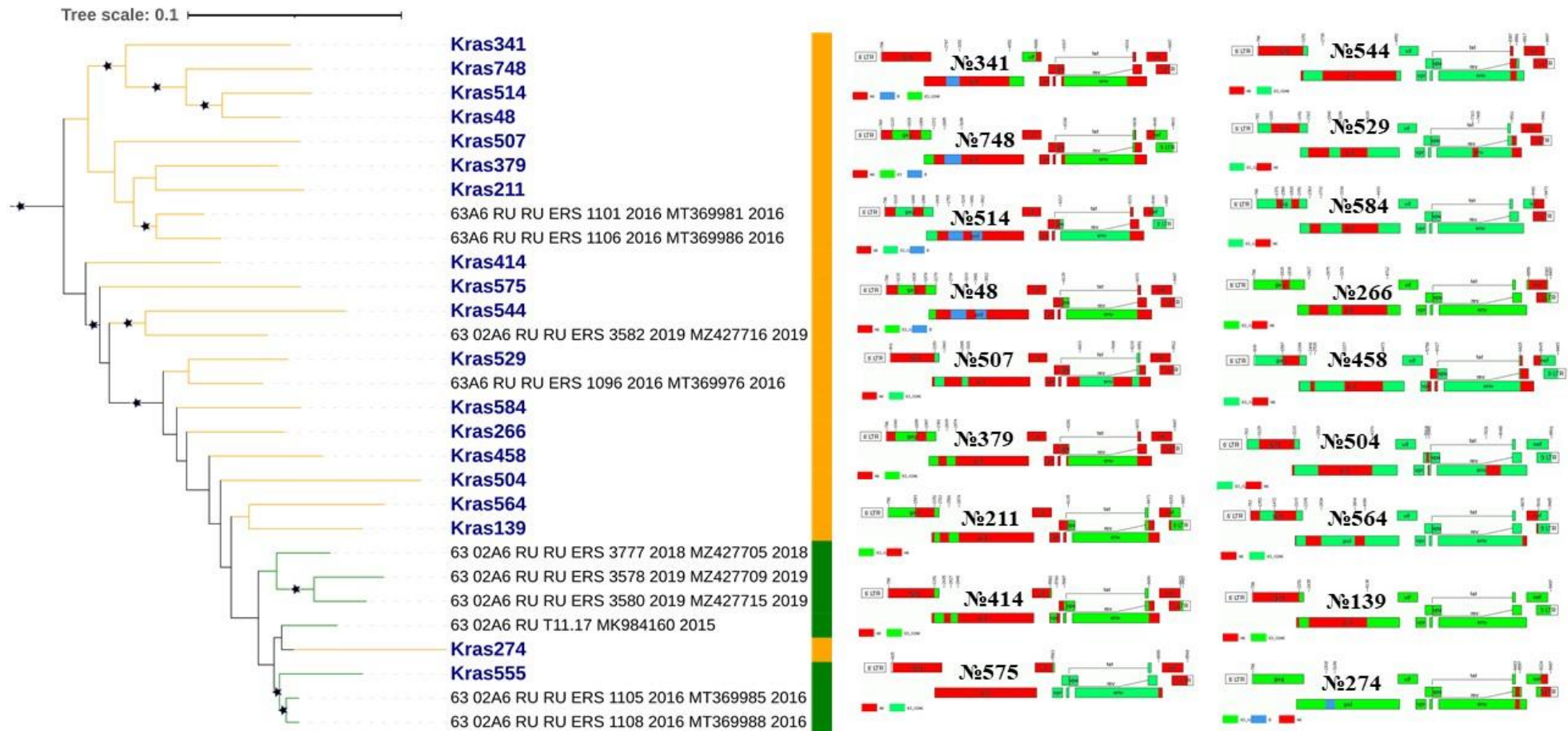


Рисунок 21 – Структура геномов 18 URFs ВИЧ-1

(красный – А6, синий – В, зеленый – CRF63_02А6, желтый – URFs ВИЧ-1)

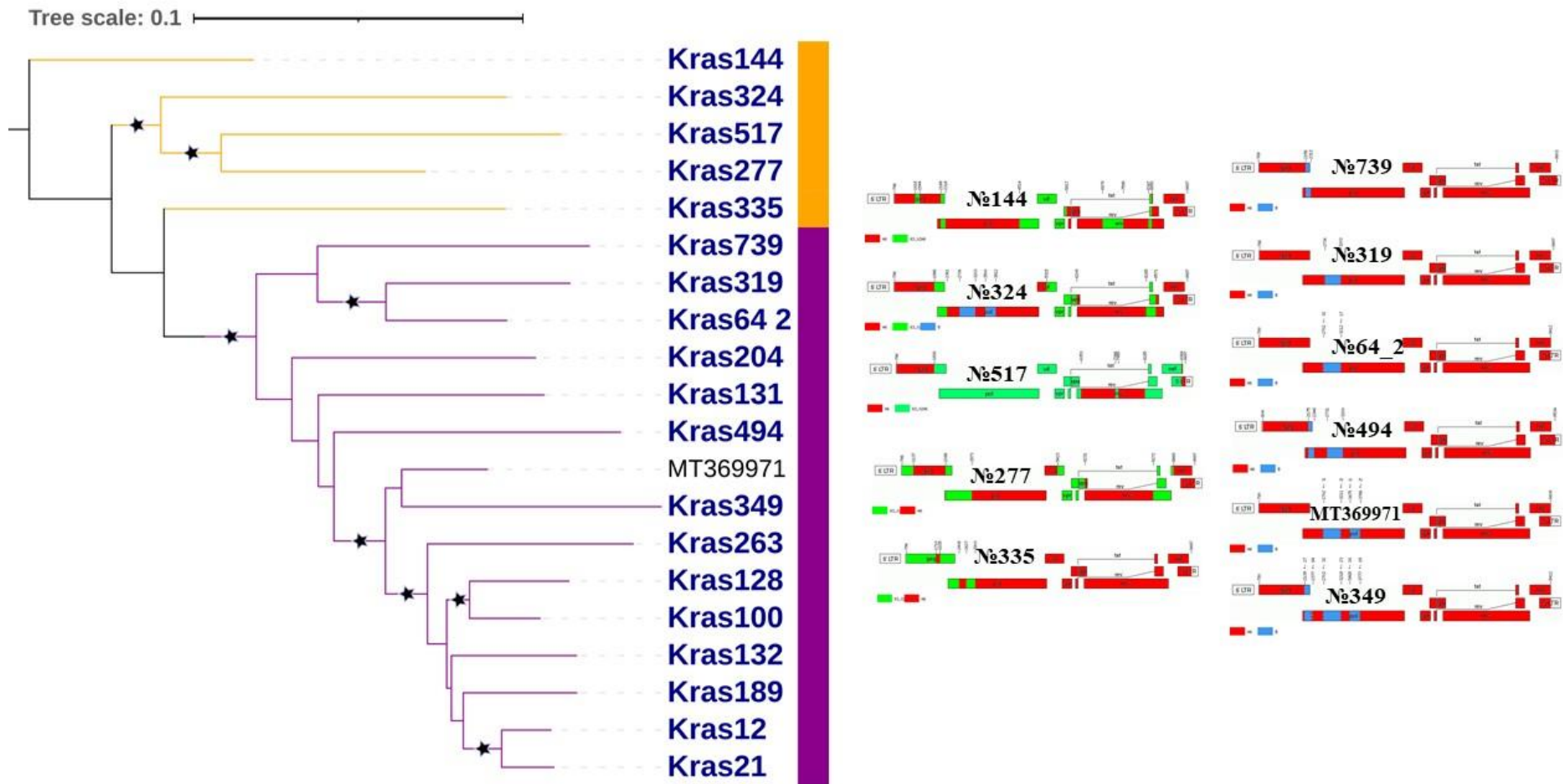


Рисунок 22 – Структура геномов 5 URFs ВИЧ-1

(красный – A6, синий – B, зеленый – CRF63_02A6, желтый – URFs ВИЧ-1, фиолетовый RF_A6B)

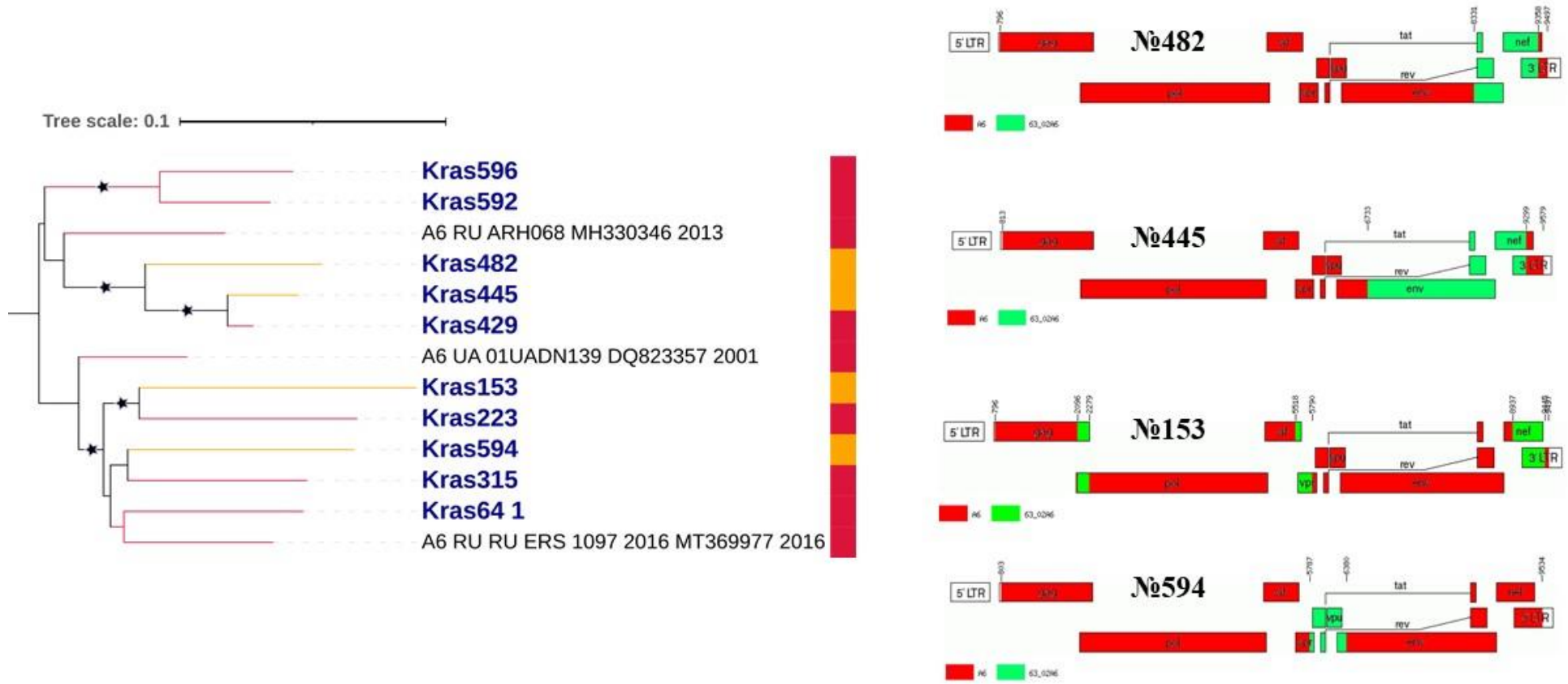


Рисунок 23 – Структура геномов 4 URFs ВИЧ-1 (красный – А6, зеленый – CRF63_02А6, желтый – URFs ВИЧ-1)

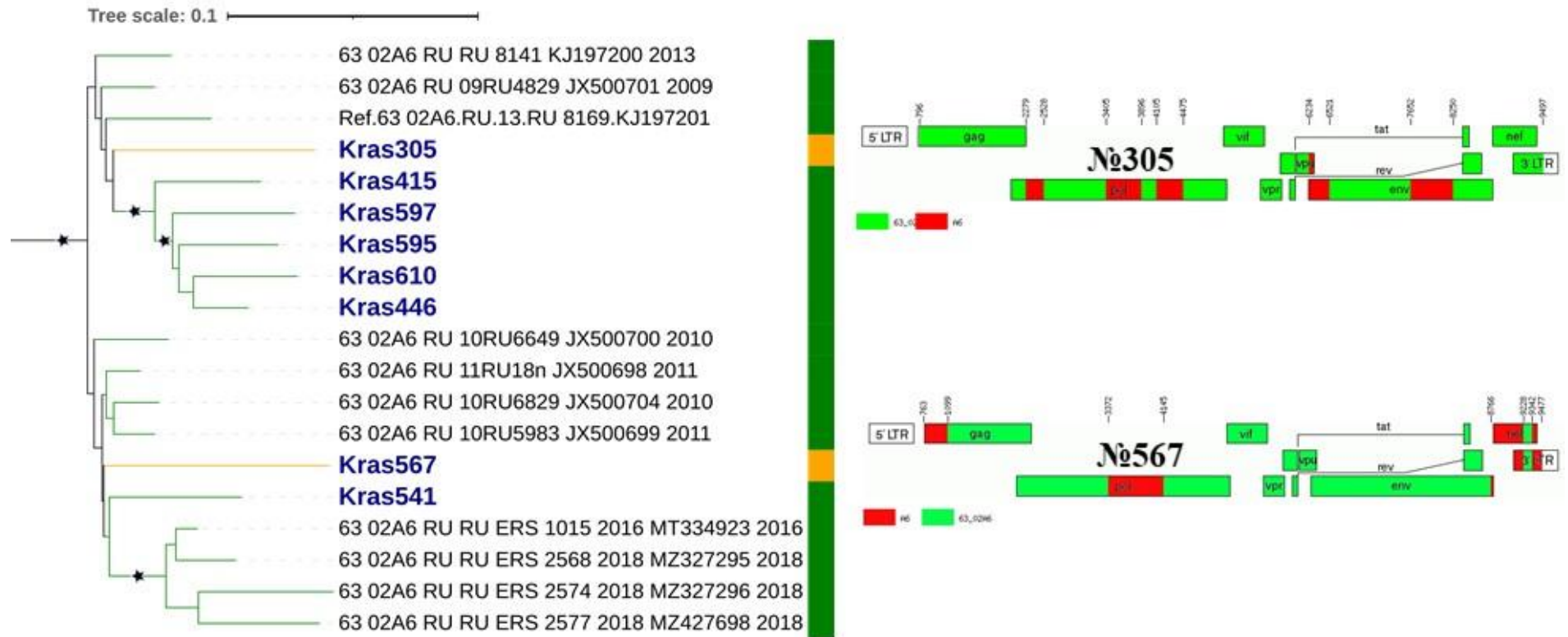


Рисунок 24 – Структура геномов 2 URFs ВИЧ-1 (красный – A6, зеленый – CRF63_02A6, желтый – URFs ВИЧ-1)

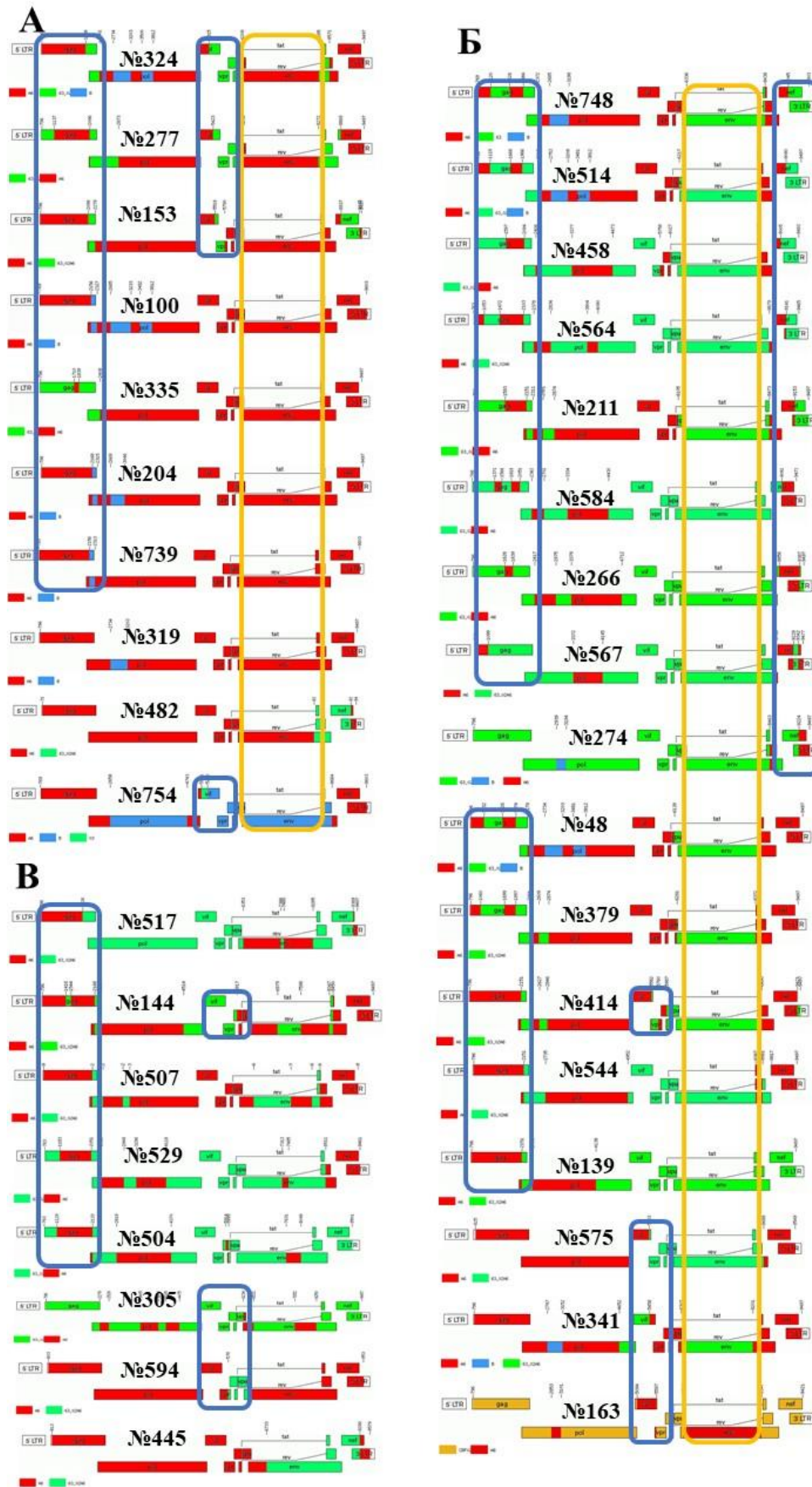


Рисунок 25 – Анализ паттернов рекомбинации: А) URFs ВИЧ-1 на основе генома под-субтипа АБ и В с интактным *env* и участками рекомбинации в районах *gag*-

pol и *vif-vpr-vpu*; Б) URFs ВИЧ-1 на основе генома CRF63_02A6 с интактным *env* и участками рекомбинации в районах *gag-pol*, *vif-vpr-vpu* и *nef*; В) URFs ВИЧ-1 на основе генома под-субтипа А6, CRF63_02A6 или CRF02_AG с участками рекомбинации в районах *gag-pol*, *vif-vpr-vpu* и *env*. Желтым выделены интактные участки *env*, синим – участки рекомбинации в *gag-pol*, *vif-vpr-vpu* и *nef*. Цветовая кодировка в структуре геномов: красный – А6, синий – В, зеленый – CRF63_02A6, темно-желтый – CRF02_AG

3.3 Анализ мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1

3.3.1 Распространенность мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1, выделенных от лиц, не имеющих опыта приема антиретровирусной терапии

Часть ВИЧ-инфицированных лиц (208/800, 26,0%), вовлеченных в настоящее исследование, были нелечеными или наивными, т.е. с момента постановки диагноза и до момента забора образца периферической крови не имели опыта приема АРТ.

Для сравнительной оценки распространенности мутаций лекарственной устойчивости к АРВП в разные периоды времени данная выборка была поделена на две группы: с ВИЧ-инфекцией, диагностированной до и после 2019 года. Среди путей инфицирования в первой группе преобладал парентеральный и гетеросексуальный путь передачи, доля которых составила 54% и 42,7% соответственно, в трех случаях (2,4%) путь передачи ВИЧ-инфекции не был установлен, и один пациент (0,8%) сообщил, что являлся МСМ. Во второй группе основная доля ВИЧ-инфицированных лиц (72%) сообщила о гетеросексуальном пути передачи заболевания, 9,8% и 6,1% ЛЖВ указали, что являлись ЛУИН и МСМ соответственно, в одном случае инфицирование произошло при бытовом контакте, а в 11% не удалось установить путь передачи.

В первой группе лиц, с ВИЧ-инфекцией, диагностированной до 2019 г. включительно, у 15,2% (19/125) пациентов была обнаружена хотя бы одна мутация лекарственной устойчивости, а во второй группе, с ВИЧ-инфекцией, диагностированной после 2019 г., аналогичный показатель был обнаружен у 13,3% (11/83) пациентов. По полученным данным распространенность мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью ВИЧ-1 к АРТ, снизилась почти на 2%, что не является статистически значимым показателем ($p\text{-value}>0.05$). Небольшое снижение распространения мутаций резистентности среди наивных ВИЧ-инфицированных пациентов может быть связано с повышением охвата ЛЖВ терапией, а также с ростом числа ВИЧ-инфицированных лиц с неопределяемой вирусной нагрузкой (Таблица 17).

Таблица 17. Показатели ВИЧ-инфекции в Красноярском крае, 2017-2023 гг. (по данным ф. 61 от медицинских организаций, подчиненных министерству здравоохранения края).

Наименование показателей	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Число ЛЖВ, абс.	18 842	19 171	20 548	22 868	23 303	23 862	24 936
Число охваченных АРВ-терапией, абс.	6 587	10 111	12 644	14 701	16 190	18 649	20 008
Охват АРВ-терапией от состоящих под ДН, %	36,2	51,8	64,3	69,9	81	89,3	92
Число пациентов с неопределяемой вирусной нагрузкой, абс.	3 850	5 950	8 079	10 056	10 199	11 369	14 068
Доля пациентов с неопределяемой вирусной нагрузкой, %	58,4	58,8	63,9	68,4	61,2	61	70

Исследование мутаций резистентности к АРТ среди ВИЧ-инфицированных пациентов, ранее не получавших лечение, выявило, что во второй группе их число по сравнению с первой. Так, в более поздний период времени были зарегистрированы замены в 6 кодонах, по сравнению с 20 заменами в более ранний

период времени, важно отметить, что при этом встречаемость мутации K103N во второй группе была в три раза выше (Рисунок 26).

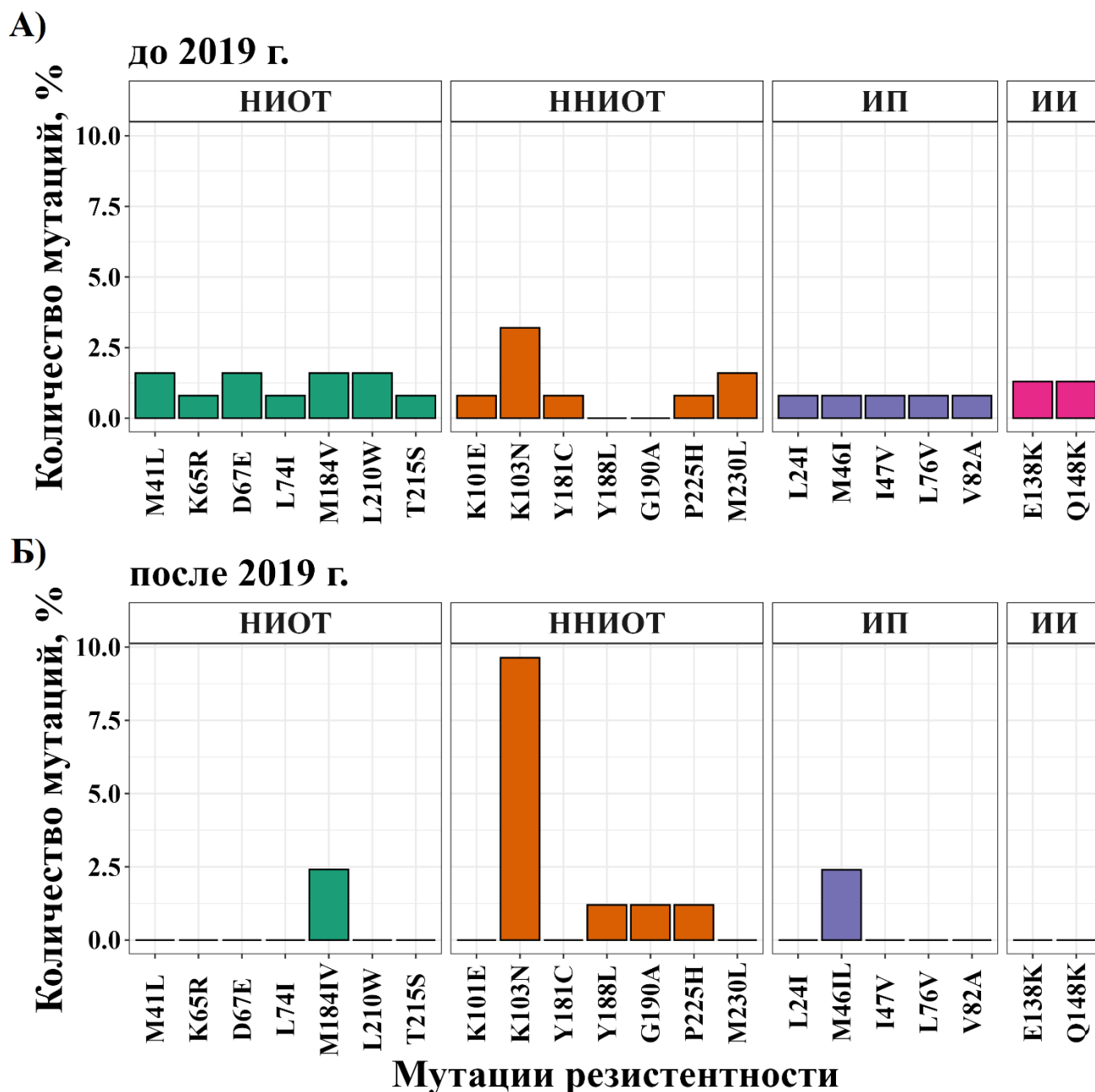
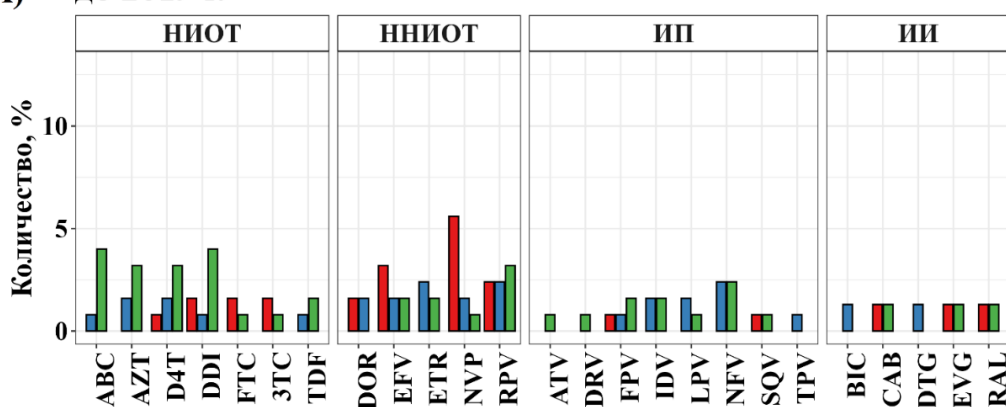


Рисунок 26 – Распространенность мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к АРВП у наивных ВИЧ-инфицированных пациентов с ВИЧ-инфекцией, диагностированной: А – до 2019 г. ($N_{\text{pro-rev}}=125$; $N_{\text{int}}=77$), Б – после 2020 г. ($N_{\text{pro-rev}}=83$; $N_{\text{int}}=81$). По оси X указаны мутации лекарственной устойчивости к соответствующим АРВП; по оси Y указано количество ВИЧ-инфицированных лиц (в %), у которых были обнаружены эти мутации

Анализ прогнозируемой лекарственной устойчивости вируса к АРВП среди нелеченых ВИЧ-инфицированных пациентов показал, что как в первой, так и во второй группе чаще выявляются ВИЧ-1 с мутациями, определяющими развитие устойчивости вируса к ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ и ННИОТ). Важно отметить, что во второй группе уровень прогнозируемой лекарственной устойчивости к EFV был в три раза выше, а к NVP – в два раза. Напротив, у второй группы прогнозируемая лекарственная устойчивость ВИЧ-1 к другим ингибиторам обратной транскриптазы незначительно снизилась. К ИП только у 2,4% ЛЖВ были выделены ВИЧ-1 с мутациями, ассоциированными с резистентностью среднего и низкого уровней, а к ИИ во второй период времени каких-либо мутаций резистентности выявлено не было (Рисунок 27).

А) до 2019 г.



Б) после 2019 г.

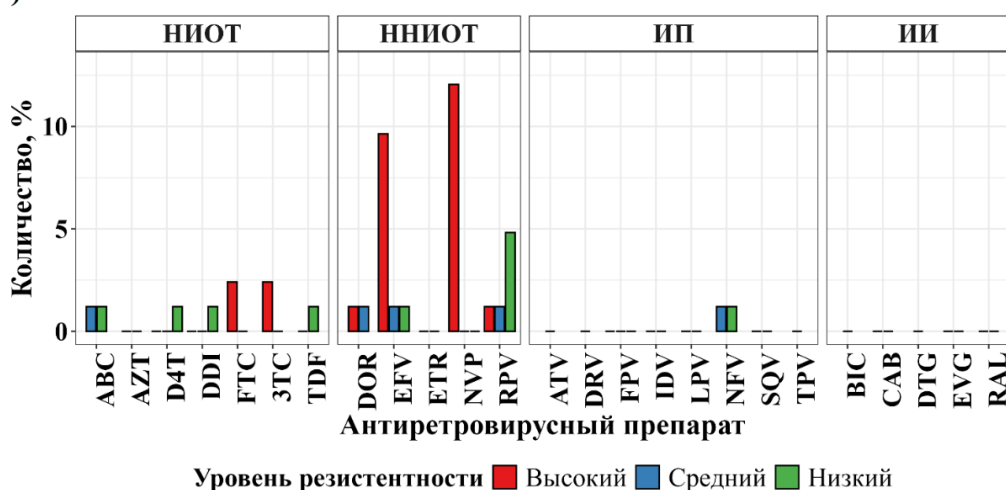


Рисунок 27 – Уровень прогнозируемой лекарственной устойчивости к АРВП среди наивных пациентов: А – до 2019 г. ($N_{\text{pro-rev}}=125$; $N_{\text{int}}=77$),

Б – после 2020 г. ($N_{\text{pro-rev}}=83$; $N_{\text{int}}=81$). По оси X указаны сокращенные наименования АРВП; по оси Y указано количество ВИЧ-инфицированных лиц (в %), ВИЧ-1 которых обладают устойчивостью к АРВП. Цветовая кодировка столбцов описывает прогнозируемый уровень резистентности ВИЧ-1 к указанным препаратам в соответствии с легендой снизу, отсутствие столбца означает, что не было выделено вирусов, несущих мутации резистентности к АРВП

3.3.2 Распространенность мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1, выделенных от лиц с опытом приема антиретровирусной терапии

Основная доля лиц (592; 74,0%), включенных в исследование, имела опыт приема АРТ в среднем 3,6 года, в диапазоне от нескольких месяцев до 20 лет. Часть пациентов на момент забора крови имела вирусную нагрузку <500 копий РНК/мл (120/592; 20,3%), что в клинической практике могут относить к успешному применению АРТ из-за явления вирусологических вспышек, при котором уровень вирусной нагрузки временно повышается и может варьировать от 50 до 499 копий РНК/мл [190]. Согласно действующим клиническим рекомендациям РФ по лечению ВИЧ-инфекции, вирусологическим критерием эффективности АРТ является снижение вирусной нагрузки ниже 50 копий РНК/мл [16], или не превышая порог определения вирусной нагрузки в используемой ЦСПИД тест-системой.

В Красноярском крае ВИЧ-инфицированным пациентам в качестве первого и второго компонентов схемы терапии чаще назначали препараты класса НИОТ: ЗТС (97,1%; $n=575$), TDF (86,3%; $n=511$), AZT (36,6%; $n=217$) и/или ABC (23,3%; $n=138$). Третьим компонентом в назначаемых схемах терапии являлись EFV (75,5%; $n=447$) и NVP (14,5%; $n=86$) из класса ННИОТ, а также LPV (29,4%; $n=174$), бустированный или небустированный RTV, или DTG (15,4%; $n=91$), являющиеся препаратами классов ИП и ИИ соответственно (Рисунок 28).

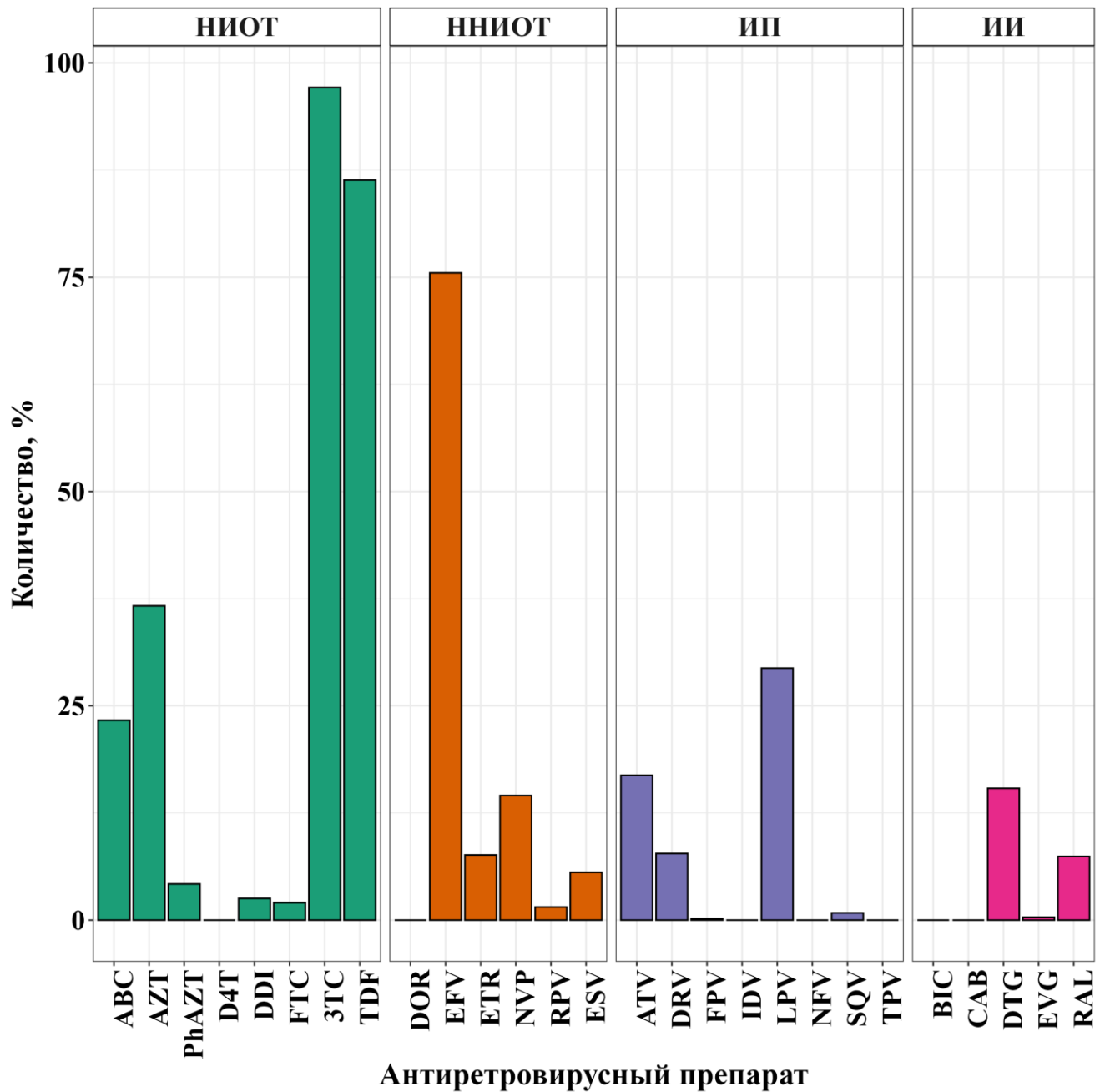


Рисунок 28 – Частота приема препаратов у пациентов, включенных в исследование, с момента начала лечения, N=592. По оси X указаны сокращенные наименования АРВП; по оси Y указано количество ВИЧ-инфицированных лиц (в %), которые имели опыт того или иного АРВП

Для оценки частоты встречаемости ВИЧ-1, несущих мутации, определяющих лекарственную устойчивость вируса к четырем классам АРВП (НИОТ, ННИОТ, ИП, ИИ), были проанализированы, как основные, так и надзорные мутации лекарственной устойчивости [245]. Анализ частоты возникновения

прогнозируемой лекарственной устойчивости разного уровня к назначаемым препаратам показал, что ее уровень к препаратам классов НИОТ и ННИОТ, которые являются препаратами с низким генетическим барьером [240], варьирует от 6,5% (14/217) к AZT до 68,6% (59/86) к NVP. Прогнозируемая лекарственная устойчивость к наиболее часто назначаемым препаратам, таким как ЗТС, TDF и EFV, составила 54,8% (315/575), 35,0% (179/511) и 61,3% (274/447) соответственно. Мутации, определяющие повышение лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к ИП, были выявлены всего у двух пациентов (2/100), принимавших ATV. К ИИ, в частности к RAL, препарату с низким генетическим барьером, и DTG, препарату с высоким генетическим барьером [37], прогнозируемая лекарственная устойчивость была зарегистрирована у 25,0% (11/44) и 8,8% (8/91) соответственно (Рисунок 29).

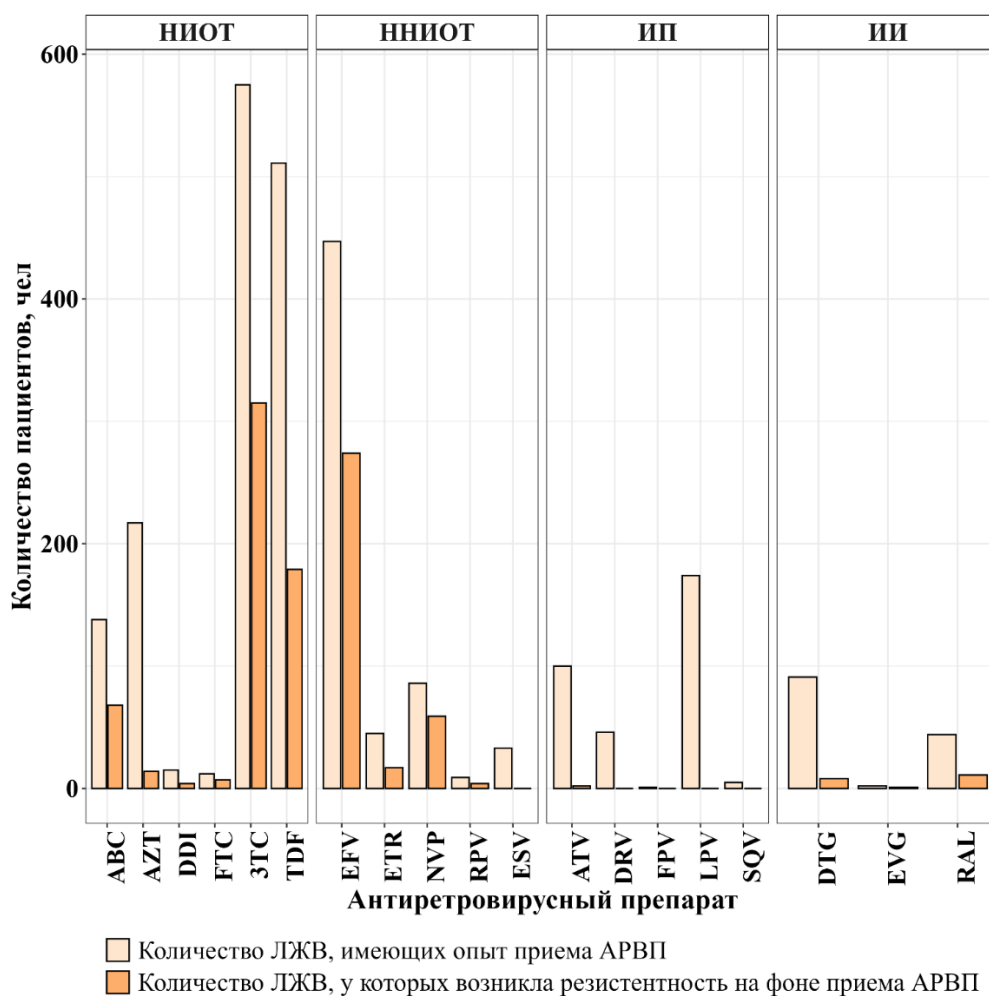


Рисунок 29 – Частота развития прогнозируемой лекарственной устойчивости к АРВИ у лиц, имеющих их опыт приема. По оси X указаны сокращенные

наименования АРВП; по оси Y указаны в абсолютное количество ЛЖВ. Цветовая кодировка столбцов расшифрована в легенде снизу

Далее был проведен анализ наличия мутаций резистентности к АРВП без учета данных об их приеме ВИЧ-инфицированным пациентом. Было показано, что уровень распространённости мутаций ВИЧ-1 к АРТ достигает 64,5% (382/592). При этом у 35,5% (210/592) ЛЖВ не было выявлено никаких мутаций резистентности к АРВП, но только у 37,6% (79/210) из них имели подавленную вирусную нагрузку (менее 500 копий РНК/мл).

Было показано, что у пациентов, принимающих АРТ, более чем в 90% случаях выявляются мутации резистентности к ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ и ННИОТ), как вместе, так и по отдельности. Мутации лекарственной устойчивости к ИП или к ИИ, включая их сочетания с другими классами препаратов суммарно не превысили 10% (Таблица 18). Важно отметить, что ВИЧ-1, несущих мутации, ассоциированных с развитием лекарственной устойчивости сразу ко всем четырем классам АРВП, обнаружено не было.

Таблица 18 – Частота развития мутаций резистентности к различным классам АРВП у ВИЧ-инфицированных лиц, имеющих опыт приема АРТ и мутации лекарственной устойчивости к ним, N=382

Классы АРВП	Количество вариантов ВИЧ-1	
	абс	%
НИОТ+ННИОТ	260	68,0
НИОТ	47	12,3
ННИОТ	39	10,2
НИОТ+ННИОТ+ИИ	9	2,4
НИОТ+ИИ	8	2,1
ИП	6	1,6
НИОТ+ИП	5	1,3
ИИ	4	1,0

Продолжение таблицы 18

Классы АРВП	Количество вариантов ВИЧ-1	
	абс	%
НИОТ+ННИОТ+ИП	3	0,8
ННИОТ+ИП	1	0,3

Среди мутаций резистентности к НИОТ чаще встречались мутации M184V/I (72,0%; n=275) и K65R (38,2%; n=146); к ННИОТ – G190S/A (39,5%; n=151), K103N/S (33,8%; n=129) и Y181C/I/V (29,1%; n=111). Мутации к ИП и ИИ встречались редко и не превышали 1,8% (M46I/V; n=7) и 5,1% (E138K, Y143R/S; n=6) соответственно (Рисунок 30).

Для анализа частоты встречаемости мутаций лекарственной устойчивости у пациентов с разными геновариантами ВИЧ-1 был применен критерий χ^2 . Результаты анализа показали, что у ВИЧ-1 под-субтипа А6 достоверно чаще, чем для других генетических вариантов вируса выявляются мутации G190S, Y181C и K101E, а у CRF63_02A6 ВИЧ-1 – K103N и P225H (p-value<0.05).

Анализ прогнозируемой лекарственной устойчивости вируса к АРВП показал, что ВИЧ-1 обладает наиболее высоким уровнем устойчивости к ингибиторам обратной транскриптазы. Так, ВИЧ-1 с мутациями резистентности, обуславливающими лекарственную устойчивость разного уровня к FTC и 3ТС, были выделены от 84,0% (n=321) пациентов, а к NVP, EFV и RPV от 88,5% (n=339), 85,34% (n=326) и 71,9% (n=275) пациентов соответственно. К препаратам класса ИИ чаще всего регистрировалась устойчивость разного уровней к RAL и к EVG в 21,4% (n=25). К препаратам класса ИП наиболее часто встречалась лекарственная устойчивость разного уровня к NFV в 5,5% (n=21). Следует подчеркнуть, что из-за перекрёстной резистентности внутри классов препаратов [114], реальная степень устойчивости к таким препаратам, как ABC, DDI, FTC и NVP выше, чем было показано ранее (Рисунок 31).

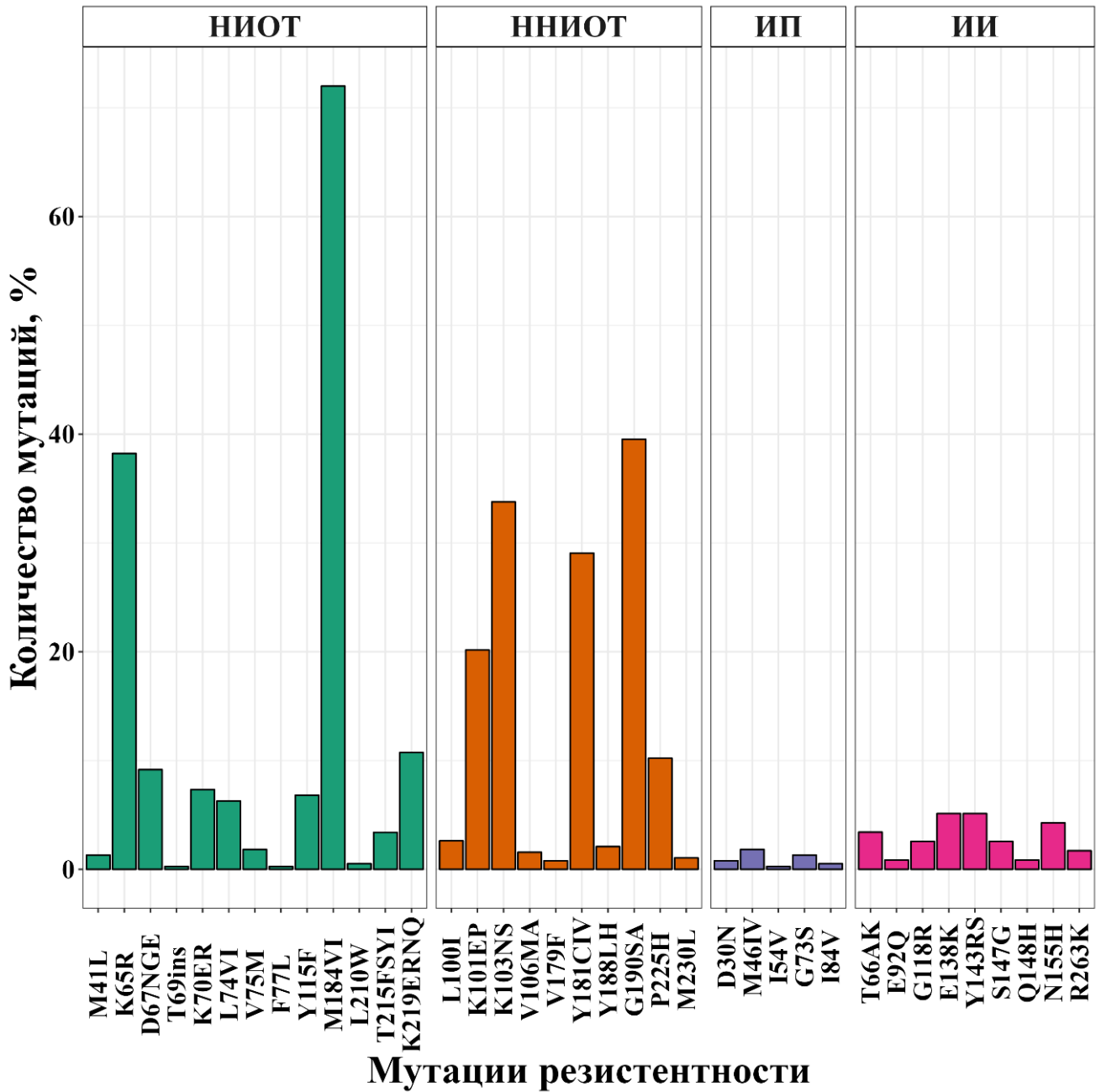


Рисунок 30 – Распространенность мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к АРВП у леченых ВИЧ-инфицированных пациентов ($N_{\text{pro-rev}}=382$; $N_{\text{int}}=117$). По оси X указаны мутации лекарственной устойчивости к соответствующим классам АРТ; по оси Y указано количество (в %) ВИЧ-инфицированных лиц, у которых были обнаружены эти мутации

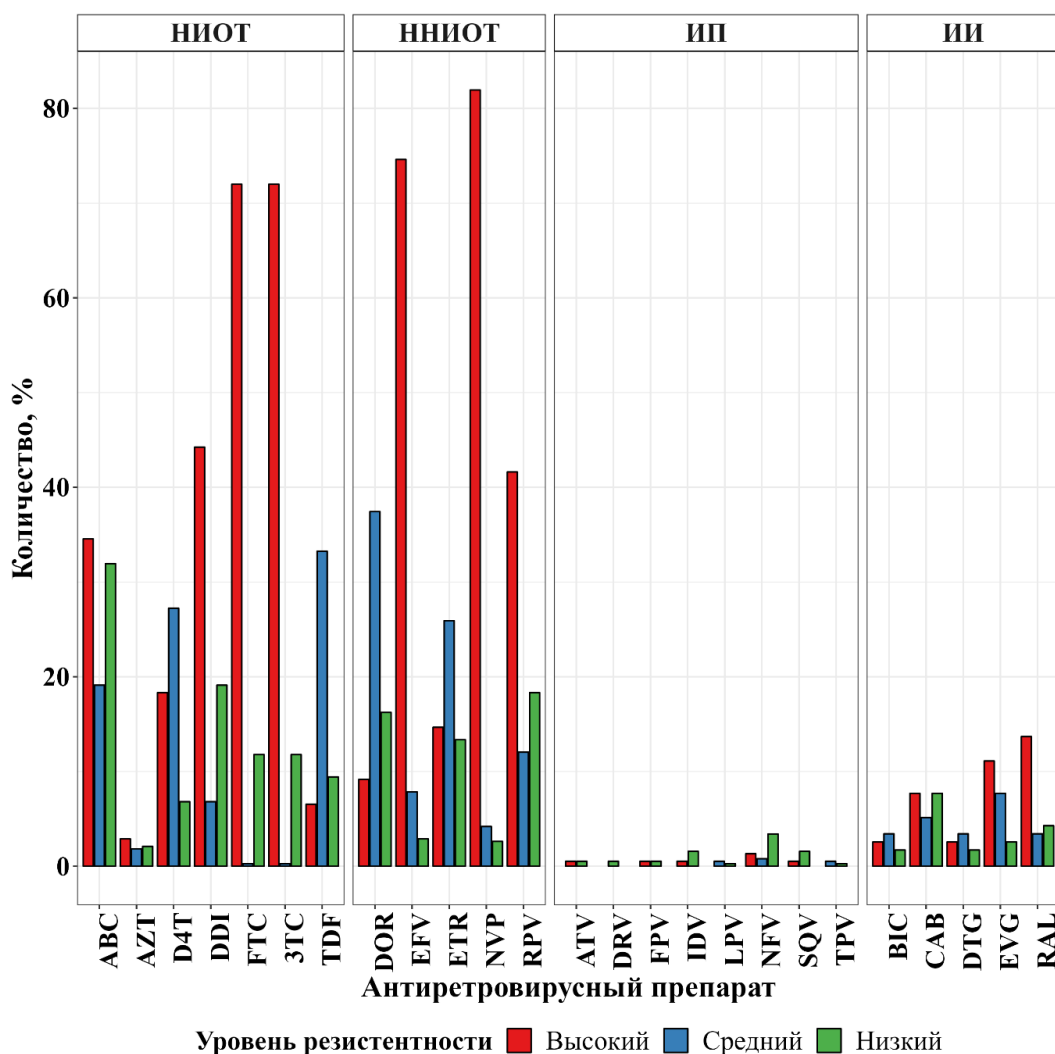


Рисунок 31 – Уровень прогнозируемой лекарственной устойчивости к АРВП среди пациентов ($N_{\text{pro-rev}}=382$; $N_{\text{int}}=117$) с приобретенными мутациями резистентности ВИЧ-1. По оси X указаны сокращенные наименования АРВП; по оси Y указано количество (в %) ВИЧ-инфицированных лиц, ВИЧ-1 которых обладают устойчивостью к АРВП. Цветовая кодировка столбцов описывает прогнозируемый уровень резистентности ВИЧ-1 к указанным препаратам в соответствии с легендой снизу, отсутствие столбца означает, что не было выделено вирусов, несущих мутации резистентности к АРВП

Для поиска возможных факторов развития мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к АРТ были проведены однофакторный и многофакторный регрессионные анализы в зависимости от различных клинико-эпидемиологических характеристик: пола (мужчины/женщины), возраста (младше 18, 18-40, 40-50,

старше 50), пути передачи (гетеросексуальный, бытовой, вертикальный, МСМ, парентеральный, неизвестный), продолжительности ВИЧ-инфекции (до года, 1-5, 5-10, 10 лет и более), продолжительности приема АРТ (до года, 1-3, 3-5, 5 лет и более), вирусной нагрузки (до 10^3 , 10^3 - 10^5 , от 10^5 и более) и уровня CD4+ (менее 350, 350 и более) и генетического варианта ВИЧ-1 (A6, CRF63_02A6 и другие) (Таблица 19). Регрессионный анализ выявил достоверную связь между двумя лабораторными показателями (вирусная нагрузка и уровень CD4+) и формированием резистентности. Было показано, что при вирусной нагрузке в диапазоне 10^3 - 10^5 копий/мл вероятность обнаружения мутаций резистентности ВИЧ-1 возрастала в 6,9 раз, а при вирусной нагрузке более 10^5 копий/мл – в 5,7 раз (p -value <0.05). Для уровня CD4+ клеток была показана обратная зависимость, так, если уровень CD4+ превышал 350 клеток/мл, то встречаемость мутаций лекарственной устойчивости снижалась в 3 раза (p -value <0.05). Дополнительно, для проверки взаимосвязи между продолжительностью приема АРТ и обнаружением мутаций резистентности был рассчитан коэффициент тау корреляции Кендалла, который составил 0,081, указывающий на то, что связь между этими двумя характеристиками почти отсутствует (Рисунок 32).

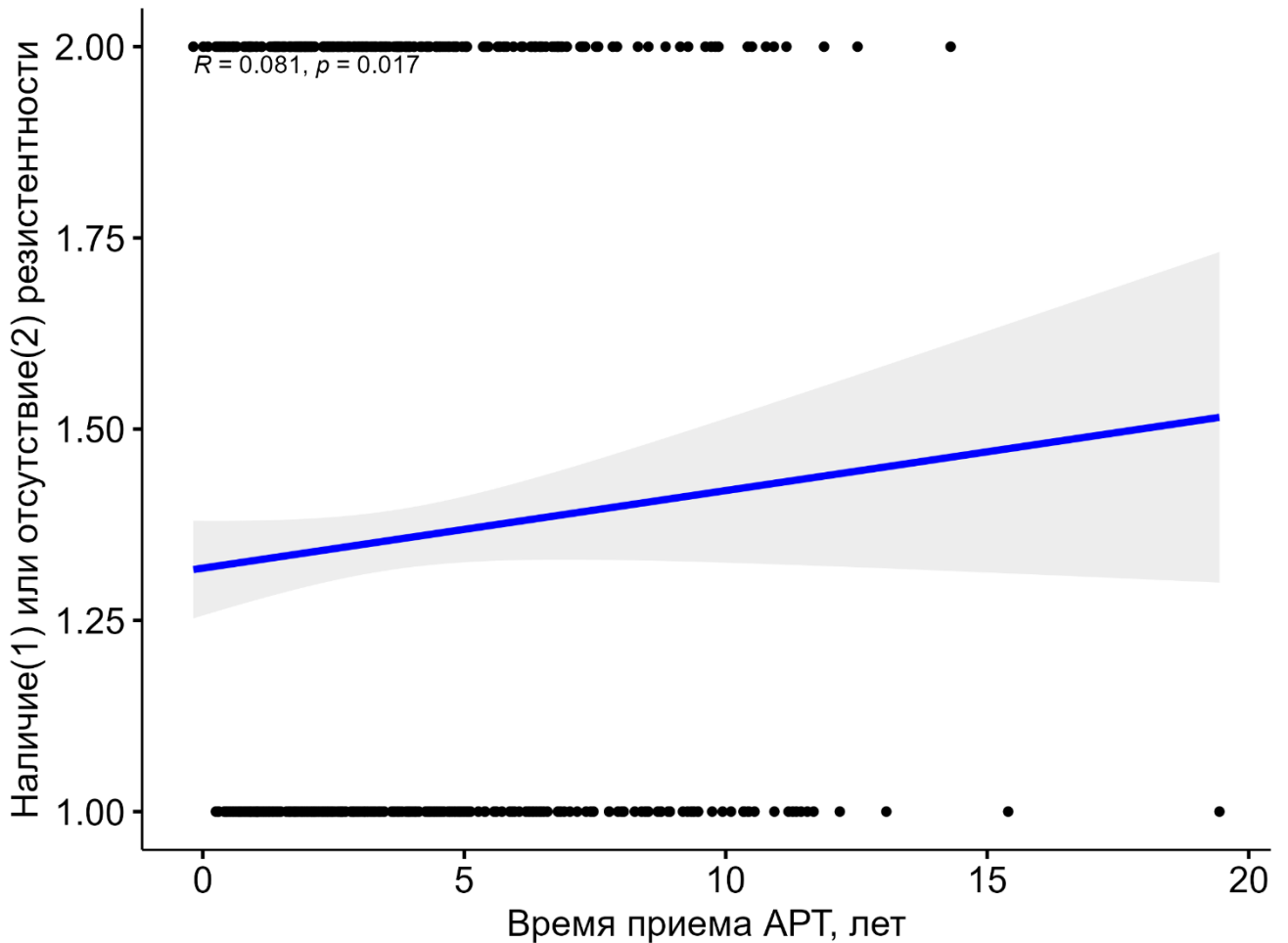


Рисунок 32 – Взаимосвязь между обнаружением мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 и продолжительностью приема АРВП, где R – коэффициент тау Кендалла, p – значение p – value. По оси X указана продолжительность приема АРТ в годах; по оси Y указаны группы ВИЧ-инфицированных лиц, где 1 – наличие резистентности, а 2 – отсутствие резистентности. Примечание: черные точки показывают каждое наблюдение, синяя линия – линия тренда, серая область – 95% доверительный интервал

Таблица 19 – Связь между клинико-эпидемиологическими характеристиками и развитием мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к АРВП у лиц, имеющих опыт приема АРТ, N = 592. Примечание: полужирным начертание выделены характеристики, для которых найдены статистически значимые различия (ГТСК – гетеросексуальный путь передачи ВИЧ-инфекции, парент – парентеральный путь передачи ВИЧ-инфекции, ОШ – отношение шансов, ДИ – доверительный интервал)

Характеристика		Мутации ЛУ		Логистическая регрессия			
				Однофакторная		Многофакторная	
		Наличие	Отсутствие	ОШ (95% ДИ)	p-value	ОШ (95% ДИ)	p-value
Пол	Женщины	138	88	ref			
	Мужчины	244	122	1,3 (0,9-1,8)	0,17	1,17 (0,77-1,8)	0,45
Возраст	< 18	12	9	ref			
	18-40	209	94	1,7 (0,7-4,1)	0,264	5,2 (3,38-7,9)	0,27
	40-50	142	90	1,2 (0,5-2,9)	0,715	4,1 (2,6-6,3)	0,35
	50 <	19	17	0,8 (0,3-2,5)	0,75	2,8 (1,8-4,3)	0,49
Путь передачи	ГТСК	170	104	ref			
	парент	187	86	1,3 (0,93-1,9)	0,113	1,2 (0,78-1,8)	0,39
	Бытовой	1	1	0,6 (0,02-15,6)	0,729	0,27 (0,13-0,52)	0,98
	Вертикальный	12	8	0,9 (0,37 -2,4)	0,856	0,3 (0,1-0,8)	0,46
	МСМ	4	6	0,4 (0,1-1,5)	0,172	0,42 (0,09-1,8)	0,26
	неизвестно	8	5	0,9 (0,3-3,3)	0,971	0,16 (0,04-0,7)	0,49

Продолжение таблицы 19

Характеристика		Мутации ЛУ		Логистическая регрессия			
				Однофакторная		Многофакторная	
		Наличие	Отсутствие	ОШ (95% ДИ)	p-value	ОШ (95% ДИ)	p-value
Продолжительность ВИЧ-инфекции	< 1	15	6	ref			
	1-5	125	58	0,8 (0,3-2,2)	0,7704	1,22 (0,77-1,9)	0,75
	5-10	148	92	0,6 (0,22-1,6)	0,3788	1,17 (0,74-1,8)	0,8
	10 <	94	53	0,7 (0,24-1,8)	0,5031	1,33 (0,84-2,04)	0,65
Срок приема АРТ	до года	65	25	ref			
	1-3	160	74	0,8 (0,5-1,4)	0,5012	1 (0,54-2,0)	0,86
	3-5	79	54	0,6 (0,3-0,9)	0,0506	0,73 (0,35-1,5)	0,39
	5 <	78	56	0,5 (0,3-0,9)	0,055	0,67 (0,31-1,4)	0,29
ВН	< 1000	58	115	ref			
	10³-10⁵	256	73	6,9 (4,6-10,5)	< 0,001	6,2 (3,9-9,6)	< 0,001
	10⁵ <	63	22	5,7 (3,2-10,3)	< 0,001	4,3 (2,3-8,4)	< 0,001
CD4+	< 350	251	85	ref			
	350 ≤	131	125	0,35 (0,25-0,5)	< 0,001	0,55 (0,36-0,84)	< 0,001
Генетический вариант	A6	283	153	ref			
	CRF63_02A6	56	23	1,3 (0,8-2,3)	0,304	1,4 (0,76-2,6)	0,28
	Другие	43	34	0,7 (0,4-1,1)	0,129	0,63 (0,35-1,14)	0,12

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе данного исследования были определены и проанализированы генетические последовательности ВИЧ-1, собранные в течение 6,6 лет (с сентября 2017 г. по апрель 2024 г.) от 800 ЛЖВ, проживающих на территории Красноярского края. Всего было расшифровано 800 нуклеотидных последовательностей гена *pol*, кодирующего PR-RT вируса, 343 нуклеотидных последовательностей гена *pol*, кодирующего IN вируса, а также 77 последовательностей полного генома ВИЧ-1.

Клинико-эпидемиологические показатели ВИЧ-инфицированных лиц, включенных в исследование, отражают основные тенденции, характерные по распространению ВИЧ-инфекции в Красноярском крае. Так, доля мужчин превышала долю женщин в 1,5 раза. Основными способами инфицирования ВИЧ-1 являлись гетеросексуальные контакты (48,5%) и парентеральный путь (43,5%) заражения, а основная доля лиц являлись лицами активного трудоспособного возраста, средний возраст которых составил 39 лет, в диапазоне от 1 года до 68 лет.

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *pol*, кодирующего PR-RT ВИЧ-1, показал, что в Красноярском крае преобладает под-субтип А6, доля которого составляет 71,1%. Вероятно, широкое распространение этого генетического варианта ВИЧ-1 связано с «эффектом основателя», при котором данный генетический вариант вируса попал в среду ЛУИН в г. Одесса (Украина) в 1990-х годах, откуда в дальнейшем произошло лавинообразное распространение вируса среди этой категории лиц по территории России и другим странам постсоветского пространства [53; 164; 180].

Вторым по частоте встречаемости в крае является ВИЧ-1 CRF63_02A6, доля которого составила 14,9%, высокая распространенность которого связана с его повсеместной циркуляцией на территории СФО [4; 96; 227].

ВИЧ-1 субтипа В, занимающий второе место по эпидемиологической значимости среди циркулирующих в России генетических вариантов, был выявлен лишь в 1,0% случаев. Интересно отметить, что передача ВИЧ-1 субтипа В в группе

МСМ была зарегистрирована всего лишь в одном случае, хотя распространение ВИЧ-1 субтипа В в России характерно именно для данной ключевой группы [2]. Низкая распространенность ВИЧ-1 субтипа В среди МСМ может быть связана со стигматизацией данной группы населения, что приводит к намеренному искажению эпидемиологических характеристик пациентами при анкетировании [42; 94].

Различные URFs ВИЧ-1, возникшие в результате рекомбинационных событий между основными генетическими вариантами вируса, циркулирующими на территории РФ (под-субтип А6, субтип В, CRF02_AG и CRF63_02A6) были выделены в 11,1% случаев. Рекомбинационный анализ этих URFs ВИЧ-1 показал, что преобладают URF_63/A6 (результат рекомбинации ВИЧ-1 под-субтипа А6 и CRF63_02A6), доля которых на территории Красноярского края составила 8,6%. Также, в 0,6% случаях были выделены URF_02A6, а в 0,3% случаях – URF_А6/В/63. Циркуляция различных генетических вариантов ВИЧ-1 на одной территории, а также их выраженное генетическое разнообразие приводят к коинфекции ВИЧ-1, что создает условия для вирусной рекомбинации [88; 207; 243], и может приводить к образованию и локальному распространению новых CRFs ВИЧ-1. Полученные результаты подтверждают и дополняют информацию об увеличении генетического разнообразия ВИЧ-1 как на территории РФ [2], так и во всем мире [49].

В ходе исследования были обнаружены четыре филогенетических кластера, два из которых были сформированы генетическими вариантами ВИЧ-1 под-субтипа А6 и CRF63_02A6, а другие два – различными рекомбинантными формами ВИЧ-1. Важно отметить, что кластеры, сформированные ВИЧ-1 под-субтипом А6 и CRF63_02A6 также включали в себя дополнительные последовательности из GenBank, выделенные от ЛЖВ, проживающих на территории Красноярского края, но полученные другими исследовательскими группами в более ранние периоды времени. Общими клинико-эпидемиологическими характеристиками пациентов, у которых были выделены ВИЧ-1, из первого и второго кластеров, являлись место проживания: Красноярск для первого кластера, и Ачинск – для второго, также в обоих кластерах доминировал парентеральный путь передачи ВИЧ-инфекции (64%

и 60% соответственно). В третьем кластере не было выявлено закономерностей передачи вирусов, так как число ВИЧ-1, формирующих данный кластер, было небольшим (4 н.п.). Филогенетический кластер №4 был сформирован 20 н.п. ВИЧ-1, которые являлись рекомбинантами между ВИЧ-1 под-субтипа А6 и субтипа В, при этом 8 н.п. и 3 н.п. из них имели идентичную структуру генома, и были выявлены у ВИЧ-инфицированных лиц, не имеющих эпидемиологической связи, что позволило их отнести к новым CRFs ВИЧ-1: CRF133_А6В и CRF147_А6В. Анализ эпидемиологических характеристик ВИЧ-инфицированных лиц показал, что новые CRF133_А6В и CRF147_А6В, а также другие CRFs, например, CRF157_А6С, и URFs, выявленные в России, распространяются среди группы лиц с поведением высокого риска (ЛУИН и их сексуальные партнеры, МСМ) [30; 108]. Сформировавшиеся филогенетические кластеры указывают на то, что в крае присутствуют внутренние эпидемиологические сети передачи ВИЧ-инфекции, поэтому выявление и мониторинг таких кластеров, а также отслеживание лиц, эпидемиологически связанных с ЛЖВ, у которых были выделены ВИЧ-1, формирующих кластеры, может снизить распространение вируса в крае.

Для части исследуемых образцов (9,6%; 79/800) были получены полногеномные последовательности ВИЧ-1, выделенных от ВИЧ-инфицированных лиц Красноярского края, анализ которых позволил показать, что стандартные клинические протоколы, включающие в себя секвенирование ограниченных участков генома методом Сэнгера для выявления мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к НИОТ, ННИОТ, ИП и ИИ, обладают существенным ограничением – не дают полного представления о реальной распространенности генетических вариантов ВИЧ-1 в популяции. Так, фрагментарное секвенирование генома позволяет обнаружить только те варианты вируса, доля которых в организме превышает 20% [155]. Например, в образце Kras_64 были обнаружены два варианта вируса, один из которых являлся истинным под-субтипом А6, который также был обнаружен с помощью секвенирования по Сэнгеру, а второй являлся ВИЧ-1 URF_А6В, который удалось обнаружить только с помощью метода NGS. Все это указывает на необходимость широкого внедрения

NGS в рутинную клиническую практику, которая поможет получить более полное представление о генетической изменчивости ВИЧ-1. Использование технологии NGS также способствует повышению выявляемости ВИЧ-1, несущих мутации резистентности, в случаях, если в организме человека присутствуют как чувствительные, так и устойчивые к АРВП варианты вируса, но доля последних не превышает 20% от общего количества вирусных частиц [45; 48; 173; 195].

Рекомбинационный анализ выделенных URFs ВИЧ-1, включая впервые выявленные CRF133_A6B и CRF147_A6B, показал, что в геноме вируса есть стабильные и неустойчивые к рекомбинации участки. К первым относится структурный ген *env*, ко вторым – структурные гены *gag-pol* и регуляторные гены *vif-vpr-vpu* и *nef*. Аналогичные результаты были получены и другими исследовательскими группами [39; 86; 226], которые сообщали, что ген *env* в большинстве случаев передается в «неповрежденном» состоянии, однако на 5' и 3'-концах гена *env*, на границе с регуляторными генами *vif-vpr-vpu* и *nef*, наоборот, наблюдается высокий уровень рекомбинации. На других участках генома ВИЧ-1 не наблюдалось кратного увеличения/уменьшения частоты рекомбинации, т.е. она была практически равновероятна. Важно отметить, что Simon-Loriere E. и др. обнаружили, что в гене *env* есть участки, в которых рекомбинация может происходить при определенных условиях, но они подвергают этот факт сомнению и сообщают, что подобные результаты могли получиться по причине того, что для анализа были использованы неполные структуры gp120 и gp41, или с тем, что использованные структуры отражали только одну конформацию этих двух белков, которая не учитывала конформационные изменения, необходимые для их функционирования [226]. Функциональная стабильность данных участков генома ВИЧ-1 является необходимой для осуществления эффективного процесса инфицирования клеток-мишеней, что вероятней всего и объясняет их стабильность к рекомбинационным изменениям. Кроме этого, рекомбинационный анализ полногеномных последовательностей RFs ВИЧ-1 показал, что основная доля исследуемых ВИЧ-1 являются уникальными по своей структуре генома, и только 11 из них являются идентичными, что позволило внести их в список существующих

CRFs Национальной лаборатории Лос Аламос. Так, в настоящей работе были впервые описаны генетические варианты CRF133_А6В и CRF147_А6В ВИЧ-1. Высокий процент выявления URFs ВИЧ-1, а также разнообразие их структур геномов указывает на то, что в Красноярском крае продолжается активный процесс эволюции вируса в сторону увеличения его генетического разнообразия. Но для того чтобы рекомбинантная форма вируса получила широкое распространение, она должна обладать биологическими преимуществами, например, иметь высокую инфекционность или репликационную способность перед другими генетическими вариантами ВИЧ-1. В целях снижения распространения существующих и предотвращения возникновения новых рекомбинантных форм ВИЧ-1 необходимо осуществлять систематический контроль за ВИЧ-инфекцией и совершенствовать меры профилактики.

В работе был проведен анализ мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 как среди наивных, так и среди леченых пациентов к основным группам препаратов, применяемым на территории РФ: НИОТ, ННИОТ, ИП и ИИ. Распространенность передаваемых мутаций лекарственной устойчивости в период исследования составила 14,4% (30/208), при этом в период до 2019 г. включительно встречаемость мутаций резистентности была на 1,9% выше, чем после 2020 г., что не являлось статистически значимым результатом. При этом важно отметить, что по предоставленным Красноярским краевым центром профилактики и борьбы со СПИД данным было показано, что охват АРТ существенно вырос. Так, доля лиц, состоящих под диспансерным наблюдением и получающих лечение, достигла 92% в 2023 г., хотя еще в 2017 г. данный показатель составлял всего 36,2%.

Несмотря на незначительную разницу частоты встречаемости мутаций лекарственной устойчивости в группах с датой постановки до 2019 г. и после 2020 г., было обнаружено значительное снижение в разнообразии выявленных мутаций. Так, во второй период времени были зарегистрированы 6 мутаций устойчивости, в то время как в период до 2019 г. их разнообразие было в 3,2 раза выше. Это может быть связано с тем, что в первой группе число ЛЖВ, инфицированных парентеральным путем, было выше в 5,5 раз по сравнению со второй группой. Из-

за особенностей образа жизни ЛУИН могут нарушать или даже прекращать прием АРТ, что в свою очередь может приводить к неоптимальной концентрации АРВП в крови, способствуя формированию лекарственно-устойчивых вариантов ВИЧ-1. Помимо этого, употребление различных психоактивных веществ оказывает двойное негативное воздействие: снижает клиническую эффективность АРТ и усиливает токсические эффекты АРВП [74; 142]. Так, у ЛУИН, продолжающих употреблять психоактивные вещества с парентеральным путем введения, формируются дополнительные эпидемиологические риски. Такие пациенты становятся потенциальными источниками передачи ВИЧ-1, несущих мутации, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, при совместном употреблении психоактивных веществ или половом акте [25; 271]. Для того чтобы предотвратить формирование мутаций резистентности к АРВП среди ЛУИН – необходимо начало АРТ совместить с изменением образа жизни, включая отказ от употребления психоактивных веществ [275].

Наиболее часто в обеих группах регистрировалась мутация K103N, но во второй группе распространенность данной мутации была в три раза выше. По данным литературы мутация K103N является наиболее часто встречающейся среди наивных ВИЧ-инфицированных лиц [213; 232], так как для ее возникновения достаточно замены одного нуклеотида в триплете [97], при этом она не снижает жизнеспособности вируса [100], а также является устойчивой, т.е. в течение длительного времени не происходит возврата к «дикому» типу при отсутствии давления АРВП [166]. Высокая распространенность данной мутаций может быть связана с ростом охвата АРТ, так как именно EFV, в ответ на прием которого происходит формирование мутации K103N, является одним из препаратов первого ряда в Красноярском крае. Таким образом, наблюдается следующая взаимосвязь: высокий процент назначения EFV приводит к высокой распространенности мутации K103N среди лиц, принимающих АРТ → рост вторичной резистентности влияет на рост распространенности данной мутации среди первичнорезистентных ВИЧ-1 → у наивных пациентов, инфицированных ВИЧ-1 с мутацией K103N,

эффективность первого ряда АРТ может снизиться, что приведет к еще большей распространенности вирусов с данной мутацией.

Высокая частота встречаемости мутаций резистентности к АРТ среди пациентов, не получавших терапию, требует особого внимания. Согласно рекомендациям ВОЗ, при достижении порогового значения данного показателя в 10% необходим пересмотр схемы лечения первого ряда [105]. Дополнительно к этому, высокий процент встречаемости мутации K103N среди этой категории лиц указывает на необходимость проведения анализа по выявлению мутаций резистентности вируса до начала лечения, а также изменения схемы лечения первого ряда. Данные меры профилактики позволят снизить распространение первичнорезистентных ВИЧ-1, а также повысят успех применения АРТ, что в свою очередь позволит снизить темпы распространения ВИЧ-инфекции в регионе.

Распространенность мутаций лекарственной устойчивости среди ВИЧ-инфицированных лиц, имеющих опыт приема АРТ, за весь период исследования составила 64,5%, но только у трети ЛЖВ с ВИЧ-1, не имеющих мутаций лекарственной устойчивости, была зарегистрирована недетектируемая вирусная нагрузка, являющаяся важным показателем успешного приема АРТ. Отсутствие мутаций резистентности у ВИЧ-инфицированных лиц с детектируемой вирусной нагрузкой, а также высокий уровень распространенности мутаций в ответ на прием АРТ, вероятно, связан с отсутствием или неоптимальной приверженностью к лечению, что приводит к снижению необходимой концентрации АРВП в крови. Помимо поведенческих факторов, влияющих на прием и как следствие на концентрацию АРВП в крови, на клиническую эффективность препаратов также могут влиять генетические факторы пациента, например, особенности работы изоферментов цитохрома P450 [59; 84], так и различные межлекарственные взаимодействия [64; 75; 127; 192]. И если генетические факторы и межлекарственные взаимодействия трудно спрогнозировать, то на отношение пациента к своевременному приему АРТ может повлиять профилактическая беседа с врачом-инфекционистом или психологом.

Наиболее часто назначаемыми АРВП в Красноярском крае являлись: ЗТС (НИОТ), TDF (НИОТ), AZT (НИОТ), EFV (ННИОТ) и LPV (ИП), данные препараты входят в предпочтительную схему первого ряда, а также в схемы применения в особых случаях. Также предпочтительными являются схемы на основе ESV (ННИОТ) и DTG (ИИ) [16], но поскольку применение ИИ на территории края ограничено, то врачи-инфекционисты вынуждены назначать другие препараты, рекомендованные Министерством здравоохранения Российской Федерации для лечения ВИЧ-инфекции. У пациентов с опытом приема хотя бы одного из следующих трех препаратов ЗТС, TDF и EFV более чем в 50% случаях были выявлены ВИЧ-1 с мутациями, определяющими высокий и средний уровень лекарственной устойчивости к этим препаратам, что указывает на необходимость контроля за развитием мутаций резистентности среди ЛЖВ, принимающих АРТ.

Анализ частоты развития мутаций лекарственной устойчивости показал, что почти 90% ЛЖВ, получающих АРТ, имеют как минимум одну мутацию резистентности, обуславливающих снижение чувствительности вируса как к НИОТ, так и к ННИОТ, причем абсолютное большинство из них имели мутации резистентности сразу к двум классам этих препаратов. Полученные данные являются следствием широкого применения АРВП классов НИОТ и ННИОТ, поскольку они входят в терапию первого ряда, а также обладают низким генетическим барьером и широкой перекрестной резистентностью. Согласно результатам анализа, мутации лекарственной устойчивости к НИОТ были выявлены в 12,3% случаев, к ННИОТ – в 10,2% случаев, совместно к НИОТ и ННИОТ – в 68,0% случаев.

Помимо этого, также были выявлены мутации резистентности к ИП и ИИ по отдельности, а также в различных сочетаниях с НИОТ и ННИОТ, суммарное число которых составило 9,5%. Важно отметить, что ВИЧ-инфицированных лиц с прогнозируемой лекарственной устойчивостью ко всем классам препаратов выявлено не было.

Среди мутаций резистентности к НИОТ наиболее часто встречалась мутация M184V/I, обуславливающая высокий уровень устойчивости ВИЧ-1 к ЗТС и FTC, а

также низкий и потенциально-низкий уровень к ABC и DDI соответственно. Наличие только данной мутации не является показанием для отмены ЗТС или ФТС, по причине того, что если в схеме присутствуют AZT и TDF, то у вируса, наоборот, повышается чувствительность к ним [55]. Помимо этого, M184V/I также снижает репликационную способность ВИЧ-1, влияя на процессивность работы ОТ [258], что также является благоприятным клиническим эффектом. В случаях, когда мутация M184V/I обнаруживается в сочетании с другими мутациями, например, с мутацией K65R, обуславливающей повышение устойчивости ВИЧ-1 от среднего до высокого уровня к D4T, DDI и TDF, то в таком случае необходим пересмотр схемы лечения, в связи с тем, что сочетание мутаций приводит к прогнозируемой лекарственной устойчивости практически ко всем препаратам класса НИОТ, кроме AZT (является запрещенным в некоторых странах из-за высокой токсичности[67]).

Среди мутаций резистентности к НИОТ наиболее часто встречалась неполиморфная мутация G190S/A, обуславливающая высокий уровень резистентности ВИЧ-1 к EFV и NVP, низкий уровень – к DOR и RPV и потенциально-низкий уровень – к ETR. Высокая частота встречаемости мутации в позиции 190 обратной транскриптазы ВИЧ-1, обусловлена доминированием и широким распространением ВИЧ-1 под-субтипа А6. Kolomeets A.N. и др. показали, что в преобладающем большинстве позиция 190 обратной транскриптазы ВИЧ-1 под-субтипа А6 (A_{FSU}) закодирована GGC, и для перехода Gly → Ser (GGC → AGC) или Gly → Ala (GGC → GCC) достаточно всего одной замены в триplete, в то время, как для вариантов ВИЧ-1 дикого типа необходимо две замены для перехода Gly → Ser (GGA → AGC) или одна замена для перехода Gly → Ala (GGA → GCA) [137]. В настоящем исследовании глицин в 190 позиции у ВИЧ-1 под-субтипа А6 был закодирован GGC в 94,8% случаях (399/421), в то время как у CRF63_02A6 ВИЧ-1, второго по распространенности генетического варианта вируса на территории Красноярского края, глицин в 89,8% был закодирован GGG. Всего было выявлено 141 ВИЧ-1 с мутацией G190S (135 – AGC, 6 – AGT) и 6 с мутацией G190A (5 – GCC, 1 – GCG), при этом в преобладающем большинстве серин (131 – AGC, 3 – AGT) и аланин (5 – GCC) в позиции 190 были выявлены у ВИЧ-1 под-субтипа А6 в 95,0%

и в 83,3% соответственно. Проведенное исследование дополняет результаты полученные Kolomeets A.N. и др. и подтверждает, что мутации G190S/A широко распространены именно среди ВИЧ-1 под-субтипа А6 (A_{FSU}).

Среди мутаций резистентности к ИП мутация M46I/V встречается чаще других. M46I определяет устойчивость среднего уровня ВИЧ-1 к NFV и потенциально-низкого – к ATV, FPV, IDV, LPV и SQV. M46V является второстепенной и недостаточно изученной мутацией, но известно, что она также обуславливает устойчивость низкого уровня ВИЧ-1 к NFV и потенциально-низкого – к FPV и IDV.

Среди мутаций, ассоциированных с устойчивостью к ИИ, наиболее часто регистрировались непалиморфные мутации E138K и Y143R/S. Мутация E138K связана с повышением устойчивости низкого уровня ВИЧ-1 к CAB, EVG и RAL и потенциально-низкого – к BIC и DTG, при этом она также способствует дополнительному повышению устойчивости вируса к ИИ в сочетании с другими мутациями, особенно в позиции 148 интегразы вируса [66]. Мутации Y143R/S обуславливают высокий уровень резистентности вируса к RAL и потенциально-низкий – к CAB и EVG.

Результаты текущего исследования по распространенности мутаций лекарственной устойчивости дополняют данные, полученные при изучении ВИЧ-1 на других территориях России [1; 8; 9; 14; 32] и в мире. Важно отметить, что из-за географических особенностей распространения различных генетических вариантов ВИЧ-1 в мире, представленность некоторых мутаций может варьировать. Например, в странах, в которых циркулируют ВИЧ-1 не-A_{FSU}, например, ВИЧ-1 субтипа В, субтипа С, CRF01_AE и др. наиболее распространенной мутацией резистентности к ННИОТ является K103N [107; 221; 224; 279].

Ранее было высказано предположение о повышенной частоте встречаемости G190S/A среди ВИЧ-1 под-субтипа А6. Для подтверждения этого высказывания, а также поиска других субтип-специфических различий встречаемости мутаций лекарственной устойчивости был проведен анализ с использованием

статистического критерия χ^2 . Было выявлено, что среди ВИЧ-1 под-субтипа А6 чаще выявляются мутации G190S, Y181C и K101E, а у CRF63_02A6 ВИЧ-1 – K103N и P225H (p -value<0.05). Подобные результаты были получены М.В. Сивай с соавторами [227] при анализе мутаций резистентности среди ЛЖВ с неэффективной АРТ, проживающих в различных субъектах СФО. Недавно коллектив авторов Nastri V. M. et al. в своем исследовании собрали открытые для общественного пользования данные о различных субтип-специфических мутациях [182], но так как исследований о характерных для CRF63_02A6 ВИЧ-1 мутаций не проводилось, что связано с его ограниченной циркуляцией на территории России, то предположение о повышенной частоте встречаемости мутаций K103N и P225H требует дальнейших исследований и подтверждений.

Для оценки возможных факторов, которые могут быть связаны с формированием мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 среди ЛЖВ, имеющих опыт приема АРВП, были проведены однофакторный и многофакторный регрессионные анализы. Проведенный однофакторный регрессионный анализ показал, что при уровне вирусной нагрузки от 10^3 до 10^5 копий/мл вероятность обнаружения мутаций резистентности в 6,9 раз выше, а при вирусной нагрузке более 10^5 копий/мл – в 5,7 раз. Также было обнаружено, что у пациентов с уровнем CD4+ клеток 350/мл и более выявляемость мутаций лекарственной устойчивости была ниже в три раза. Полученные результаты были подтверждены многофакторным регрессионным анализом. Обнаруженные закономерности по частоте выявляемости мутаций устойчивости ВИЧ-1 к АРВП в зависимости от уровней вирусной нагрузки и CD4+ клеток дополняют друг друга, так как низкий уровень вирусной нагрузки и высокий CD+ клеток являются важными прогностическими факторами успешного приема АРТ.

В настоящее время АРТ является единственным эффективным способом для снижения темпов распространения ВИЧ-инфекции, а также увеличения продолжительности и качества жизни ЛЖВ в долгосрочной перспективе. Так, в 2014 г. UNAIDS поставила цель 90-90-90, которая в 2021 г. была обновлена до 95-95-95, которая означает, что к 2030 г. 95% людей, живущих с ВИЧ, знали свой

диагноз → 95% из них получали АРТ → 95% людей, получающих АРТ, должны иметь подавленную вирусную нагрузку [249]. Но для успешного достижения этой цели необходим постоянный контроль за распространением лекарственной устойчивостью, как среди наивных, так и среди леченых пациентов, так как именно ВИЧ-инфицированные пациенты с ВИЧ-1, несущими мутации лекарственной устойчивости, являются основным препятствием на этом пути.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, дополняют страновые и мировые тенденции, связанные с увеличением вклада рекомбинантных форм вируса в эпидемию ВИЧ-инфекции. Было показано, что с 2010 г. произошли существенные изменения в составе вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в Красноярском крае: распространение ВИЧ-1 под-субтипа А6 снизилось с 92,5% до 71,1%, а доля рекомбинантных форм выросла, так, CRFs ВИЧ-1 были выявлены в 16,8%, а URFs – 11,1%. Впервые были выявлены и описаны CRF133_А6В и CRF147_А6В ВИЧ-1, возникшие в результате рекомбинационных событий между ВИЧ-1 под-субтипа А6 и субтипа В. Анализ точек рекомбинации в геномах рекомбинантных форм ВИЧ-1 дополнил существующие данные о наличии предпочтительных мест рекомбинации в геноме вируса.

Анализ лекарственной устойчивости показал, что на территории края уровень передаваемой лекарственной устойчивости составил 14,4%, а приобретенной – 64,5%. Высокий уровень распространения вариантов ВИЧ-1, несущих мутации лекарственной устойчивости, оказывает негативное влияние на снижение темпов эпидемии ВИЧ-инфекции в регионе. Кроме этого, была выявлена связь между определенными генетическими вариантами ВИЧ-1 и выявлением мутаций лекарственной устойчивости к АРТ, так, мутации G190S, Y181C и K101E чаще встречались у ВИЧ-1 под-субтипа А6, а K103N и P225H – у CRF63_02А6 ВИЧ-1.

Таким образом, результаты настоящего исследования показывают, что для стабилизации ситуации по ВИЧ-инфекции в Красноярском крае следует:

1. Проводить регулярный мониторинг за циркулирующими ВИЧ-1 с целью своевременного выявления эпидемических путей передачи ВИЧ-1 и разработки эффективных программ профилактики, а также для поиска новых возникающих генетических вариантов ВИЧ-1.

2. Проводить оценку уровня лекарственной устойчивости среди впервые выявленных ВИЧ-инфицированных лиц перед назначением АРТ.
3. Скорректировать рекомендации по терапии ВИЧ-инфекции: выбирать антиретровирусные препараты с высоким генетическим барьером для снижения возникновения резистентности.

ВЫВОДЫ

1. Молекулярно-генетический анализ ВИЧ-1, выполненный в Красноярском крае в период с 2017 по 2024 гг., показал, что в крае происходит снижение распространения ВИЧ-1 под-субтипа А6 и увеличение доли рекомбинантных форм ВИЧ-1. Суммарно распределение циркулирующих генетических вариантов ВИЧ-1 в регионе составило: А6 – 71,1%, В – 1%, CRF63_02А6 – 14,9%, CRF133_А6В – 1,1%, URF_63/А6 – 8,6%, URF_А6В – 1,6%, менее чем в 1% случаях были выявлены: CRF03_А6В, CRF07_ВС, CRF14_ВG, CRF147_А6В, URF_02А6, URF_А6/В/63.

2. Филогенетический анализ циркулирующих ВИЧ-1 выявил внутренние эпидемиологические сети передачи ВИЧ-инфекции, указывающие на распространение ВИЧ-1 среди лиц, практикующих рискованное поведение, а именно, потребители инъекционных наркотиков и их сексуальные партнеры, что привело к образованию новых генетических вариантов ВИЧ-1.

3. Анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей впервые выявленных рекомбинантных форм ВИЧ-1 показал, что 75,6% описанных вирусов имеют уникальную структуру генома, что указывает на происхождение этих ВИЧ-1 в результате независимых рекомбинационных событий. Оставшиеся ВИЧ-1 были описаны как новые циркулирующие рекомбинантные формы ВИЧ-1 (CRF133_А6В и CRF147_А6В), включенные в список существующих циркулирующих рекомбинантных форм Национальной лаборатории Лос Аламос.

4. Уровень прогнозируемой передаваемой лекарственной устойчивости ВИЧ-1 составляет 14,4%. Среди передаваемых мутаций резистентности преобладает мутация К103N, снижающая чувствительность вируса к EFV и NVP.

5. Уровень прогнозируемой приобретенной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 составляет 64,5%. Чаще всего мутации лекарственной устойчивости формируются в ответ на прием ингибиторов обратной транскриптазы: НИОТ (12,3%), ННИОТ (10,2%), НИОТ и ННИОТ (68,0%). Среди мутаций резистентности

к НИОТ с большей частотой выявляются мутации M184V/I (72,0%) и K65R (38,2%); к ННИОТ – G190S/A (39,5%), K103N/S (33,8%) и Y181C/I/V (29,1%). Показано, что частота встречаемости мутаций лекарственной устойчивости к антиретровирусным препаратам зависит от генетического варианта ВИЧ-1: среди ВИЧ-1 под-субтипа А6 чаще выявляются мутации K101E, Y181C и G190S, а среди CRF63_02A6 ВИЧ-1 – K103N и P225H.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ЗТС	ламивудин (lamivudine)
АРТ	антиретровирусная терапия
АРВП	антиретровирусные препараты
ВИЧ-1	вирус иммунодефицита человека 1 типа
ВИЧ-2	вирус иммунодефицита человека 2 типа
ГТСК	гетеросексуальные контакты
ДН	диспансерное наблюдение
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	дезоксинуклеозидтрифосфат
дТТФ	дезокситимидинтрифосфат
дУТФ	деоксиурацилтрифосфат
ИИ	ингибиторы интегразы
ИП	ингибиторы протеазы
кДНК	комплиментарная цепь ДНК
ЛЖВ	люди, живущие с ВИЧ
ЛУИН	лица, употребляющие инъекционные наркотики
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
МСМ	мужчины, практикующие секс с мужчинами
н. о.	нуклеотидные основания
н. п.	нуклеотидные последовательности
НИОТ	нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
ННИОТ	ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
НСО	Новосибирская область
ОТ	фермент обратная транскриптаза
п.н.	пара нуклеотидов
ПО	программное обеспечение
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота
РНКаза Н	фермент, катализирующий расщепление РНК

РФ	Российская Федерация
СанПин	Санитарные правила и нормы
СНГ	Содружество Независимых Государств
СПИД	синдром приобретенного иммунодефицита человека
СФО	Сибирский федеральный округ
США	Соединенные Штаты Америки
ТАТА-бокс	консенсусная последовательность ДНК, богатая А-Т парами
ЦКП	Центр коллективного пользования
ЦСПИД	Центр по профилактике и борьбе со СПИД
АВС	абакавир (abacavir)
ALV	вирус лейкоза птицы (avian leukosis virus)
АРОВЕС3В	каталитический полипептид типа 3В, корректирующий мРНК аполипопротеина В (apolipoprotein В mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3В)
АРОВЕС3С	каталитический полипептид типа 3С, корректирующий мРНК аполипопротеина В (apolipoprotein В mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3С)
АРОВЕС3DE	каталитический полипептид типа 3DE, корректирующий мРНК аполипопротеина В (apolipoprotein В mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3DE)
АРОВЕС3F	каталитический полипептид типа 3F, корректирующий мРНК аполипопротеина В (apolipoprotein В mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3F)
АРОВЕС3G	каталитический полипептид типа 3G, корректирующий мРНК аполипопротеина В (apolipoprotein В mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G)
АТV	атазанавир (atazanavir)
АЗТ	азидотимидин/зидовудин (azidotimidin/zidovudine)
ВАF	белок, препятствующий аутоинтеграции (barrier-to-autointegration factor)

BIC	Биктегравир (bictegravir)
CA	капсид (capsid)
CAB	каботегравир (cabotegravir)
CD	маркер клеточной дифференциации (cluster of differentiation)
CCR5	С-С рецептор хемокина 5-го типа (C-C chemokine receptor type 5)
COMET	программное обеспечение для быстрой идентификации ВИЧ на субтипы (COntext-based Modeling for Expeditious Typing)
CPSF6	субъединица фактора специфического расщепления и полиаденилирования 6 (cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6)
CRF	циркулирующая рекомбинантная форма ВИЧ (circulating recombinant form)
CXCR4	С-Х-С рецептор хемокина 4-го типа (C-X-C chemokine receptor type 4)
d4T	ставудин (stavudin)
DDI	диданозин (didanosine)
DNA-РКcs	каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic subunit)
DOR	доравирин (doravirine)
DRV	дарунавир (darunavir)
DTG	долутегравир (dolutegravir)
EFV	эфавиренз (efavirenz)
<i>env</i>	ген белков оболочки (envelope gene)
ESCRT	эндосомальные сортировочные комплексы для транспортного механизма (endosomal sorting complexes required for transport)
ESV	элсульфавирин (elsulfavirine)
ETR	этравирин (etravirine)
EVG	элвитегравир (elvitegravir)
FDA	Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (U.S. Food and Drug Administration)

FPV	фосампренавир (fosamprenavir)
FTC	эмтрицитабин (emtricitabine)
FSU	The Former Soviet Union (бывший Советский Союз)
<i>gag</i>	ген внутренних белков вириона (group antigen gene)
<i>gp</i>	гликопротеин (glycoprotein)
HIVdb	база данных Стэнфордского университета (HIV database)
HLA	человеческий лейкоцитарный антиген (human leukocyte antigens)
HMGs	белки группы высокой подвижности (high-mobility group)
HTLV-1	T-лимфотропный вирус человека 1 (Human T-lymphotropic virus 1)
HTLV-3	T-лимфотропный вирус человека 3 (Human T-lymphotropic virus 3)
HTLV-4	T-лимфотропный вирус человека 4 (Human T-lymphotropic virus 4)
ICTV	Международный комитет по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses)
IDV	индинавир (indinavir)
IN	фермент интегразы (integrase)
jpHMM	подход для сравнения последовательности с множественным выравниванием последовательностей
LAP2 α	ламиноассоциированный полипептид 2 α (lamina-associated polypeptide)
LEDGF	фактор роста, полученный из эпителия хрусталика (Lens Epithelium Derived Growth Factor)
LEN	ленакапавир (lenacavir)
LigIV	ДНК-лигаза (DNA ligase IV)
LPV	лопинавир (lopinavir)
LTR	«длинные концевые повторы» (long terminal repeats)
MA	матриксный белок (matrix)
MuLV	вирус мышинной лейкемии (Moloney Murine Leukemia Virus)
MVC	маравирук
NC	нуклеокапсид (nucleocapsid)
<i>nef</i>	ген негативного фактора экспрессии (negative regulator factor gene)

NF-κB	транскрипционный ядерный фактор (nuclear factor κB)
NFLG	полная длина генома (near-full length genome)
NFV	нелфинавир (nelfinavir)
NGS	секвенирование нового поколения (next-generation sequencing)
Nup153	нуклеопорин 153 (Nucleoporin 153)
Nups	нуклеопорины (nucleoporins)
NVP	невирапин (nevirapine)
ORF	открытые рамки считывания (Open Reading Frame)
p	вероятность (probability)
PhAZT	фосфазид (phosphazide)
PIC	прединтеграционный комплекс (pre-integration complex)
<i>pol</i>	ген полимеразы (polymerase gene)
PR	фермент протеаза (protease)
RAL	ралтегравир (raltegravir)
<i>rev</i>	ген белка, регулирующего экспрессию генов вирусных белков (regulator of expression of virus protein genes)
RF	рекомбинантная форма ВИЧ, включая CRF и URF (recombinant form)
RIP	программа идентификации рекомбинации (Recombinant Identification Program)
RPV	рилпивирин (rilpivirine)
RRE	элементы, взаимодействующие с белком Rev (Rev responsive element)
RT	фермент обратная транскриптаза (reverse transcriptase)
SP1	белок специфичности 1 (specificity protein 1)
SP2	белок специфичности 2 (specificity protein 2)
SQV	саквинавир (saquinavir)
SU	поверхностный гликопротеин (surface glycoprotein)
TAE	трис-ацетатный ЭДТА буфер (tris-acetate-EDTA)
TAMs	мутации к аналогам тимидина (thymidine analog mutation)

TAR	последовательность для вирусной трансактивации (Target sequence for viral transactivation)
<i>tat</i>	ген трансактивирующего фактора (transactivator gene)
TDF	тенофовир (tenofovir)
TM	трансмембранный гликопротеин (transmembrane glycoprotein)
TPV	типранавир (tipranavir)
URF	уникальная рекомбинантная форма ВИЧ (unique recombinant form)
<i>vif</i>	ген вирусного инфекционного фактора (virus infectivity factor gene)
<i>vpr</i>	ген вирусного белка R (viral protein R gene)
<i>vpu</i>	ген вирусного белка U (viral protein U gene)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонова, А. А. Генетический профиль и характеристика мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 на территории Краснодарского края в период 2014–2019 гг / А. А. Антонова, А. С. Туманов, А. В. Лебедев [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2022. – Т. 14, № 2. – С. 20-30.
2. Антонова, А. А. Генетическое разнообразие ВИЧ-1 на современном этапе эпидемии в Российской Федерации: увеличение распространенности рекомбинантных форм / А. А. Антонова, А. И. Кузнецова, Е. Н. Ожмегова [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2023. – Т. 15, № 3. – С. 61-72.
3. Гашникова, Н. М. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ распространения ВИЧ-инфекции в Новосибирской области с 2012 по 2016 годы / Н. М. Гашникова, В. Р. Муранкина, Е. В. Власов [и др.] // Журнал Инфектологии. – 2017. – Т. 9, № 4. – С. 42-45.
4. Зырянова, Д. П. CRF63_02A1 ВИЧ-1 определяет развитие современной эпидемии ВИЧ-инфекции в Томской области / Д. П. Зырянова, Е. М. Астахова, В. В. Ивлев [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2017. – № 5. – С. 682-682.
5. Казеннова, Е. В. Генетический анализ ВИЧ-1 в Алтайском крае: дальнейшее распространение варианта CRF63_02A1 по территории Западной Сибири / Е. В. Казеннова, А. А. Антонова, Е. Н. Ожмегова [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2020. – Т. 12, № 1. – С. 47-57.
6. Казеннова, Е. В. Молекулярно-эпидемиологический анализ ВИЧ-инфекции в северных портовых городах России / Е. В. Казеннова, В. Ю. Лага, К. Б. Громов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2017. – Т. 62, № 4. – С. 154-161.
7. Капустин, Д.В. Анализ распространенности первичной резистентности ВИЧ-1 к антиретровирусным препаратам в Новосибирской области / Д. В. Капустин, Е. И. Краснова, М. Р. Халиков [и др.] // Терапия. – 2022. – Т. 8, № 3 (55). – С. 35-41.
8. Кириченко, А. А. Лекарственная устойчивость ВИЧ-1 у пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ в России (2013-2021 гг.) / А. А. Кириченко, Д. Е. Киреев, А. В. Шлыкова [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2021. – Т. 11, № 3. – С. 53-62.

9. Котова, В. О. Анализ лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в регионах Дальневосточного федерального округа / Котова В. О., Балахонцева Л. А., Троценко О. Е. // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2016. – Т. 8, № 3. – С. 53-58.
10. Котова, В. О. Генетический профиль ВИЧ-1 на территории Республики Саха, Якутия / В. О. Котова, О. Е. Троценко, Л. А. Балахонцева [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2023. – Т. 15, № 3. – С. 73-83.
11. Лага, В. Ю. Молекулярно-генетический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в Республике Крым / В. Ю. Лага, А. В. Немыкин, Е. Н. Бегма [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2020. – Т. 11, № 4. – С. 91-97.
12. Лаповок, И. А. Молекулярно-эпидемиологический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в России в 1987-2015 гг / И. А. Лаповок, А. Э. Лопатухин, Д. Е. Киреев [и др.] // Терапевтический архив. – 2017. – Т. 89, № 11. – С. 44-49.
13. Максименко, Л.В. Молекулярно-эпидемиологические особенности распространения ВИЧ-1, выделенных от жителей Красноярского края / Максименко Л.В., Скударнов С.Е., Остапова Т.С. [и др.] // Журнал Инфектологии – 2023. – Т. 15, № 3. – С.100-101.
14. Максименко, Л.В. Молекулярно-генетический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории Забайкальского края / Максименко Л.В., Готфрид Л.Г., Тотменин А.В. [и др.] // Клиническая инфектология и паразитология. – 2024. – Т. 13, №3. – С. 315-325.
15. Миддван Д. Атлас по ВИЧ-инфекции и СПИДу / Д.Миддван: пер. с англ. – М., 2010. – 800с.
16. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации. ВИЧ-инфекция у взрослых: официальный сайт. — 2023. — URL: <https://hivvol.ru/images/docs/VICH/KR-vzr-2023.pdf> (дата обращения 18.07.2024).
17. Монахов, Н. Э. Молекулярно-генетический мониторинг циркулирующих вариантов ВИЧ-1 в Санкт-Петербурге / Н. Э. Монахов, А. И. Ермаков, Е. С. Обижаева [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2024. – Т. 16, № 2. – С. 106-117.

18. Мурзакова, А. В. Генетическая характеристика ВИЧ-1 субтипа G, вызвавшего внутрибольничную вспышку на юге России в 1988-1990 гг / А. В. Мурзакова, Д. Е. Киреев, А. Э. Лопатухин [и др.] // Молекулярная диагностика 2017. – 2017. – С. 465-466.
19. Нефедова, А. А. Развитие современной эпидемии вич-инфекции в Омске определяется распространением генетического варианта CRF63_02A1 ВИЧ-1 / А. А. Нефедова, И. П. Осипова, Е. М. Астахова [и др.] // Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции. – 2019. – С. 312-313.
20. Ожмегова, Е. Н. Генетический профиль ВИЧ-1 в Вологодской области: доминирование CRF03_AB и быстрое распространение URFs / Е. Н. Ожмегова, А. А. Антонова, А. В. Лебедев [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2020. – Т. 12, № 2. – С. 79-88.
21. Осипова, И. П. Актуальность использования методов молекулярной эпидемиологии ВИЧ для характеристики территориальных эпидемий: Сахалинская область / И. П. Осипова, А. В. Тотменин, П. Г. Берсенев [и др.] // Юг России: экология, развитие. – 2023. – Т. 180 № 3 (68). – С. 126-132.
22. Пирогова, И.А. Распространенность ВИЧ-инфекции в России / И. А. Пирогова // Вестник совета молодых ученых и специалистов Челябинской области. – 2017. – Т. 2, № 4. – С.45-49.
23. Попков, А. В. Молекулярно-генетическое изучение современной эпидемии ВИЧ-инфекции в Тюменской области / А. В. Попков, С. В. Петрова, О. А. Пунько [и др.] // Уральский медицинский журнал. – 2016. – Т. 142, № 9. – С. 110-115.
24. Рубинчик, С. М. Фермент, разрушивший "центральную догму" молекулярной биологии / С. М. Рубинчик // Биомедицина (Баку). – 2010. – № 1. – С. 27-28.
25. Чурина, М. А. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ-1 у пациентов с неэффективностью АРВТ в Великом Новгороде / М. А. Чурина, Ю. В. Останкова, А. В. Семенов [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 82-92.
26. ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора. Справка «ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31

декабря 2023 г.: официальный сайт. — 2023. — URL: <https://http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2024/09/spravka-vich-v-rossii-2023-god.pdf> (дата обращения 21.11.2024).

27. Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИД. Количество ВИЧ-инфицированных в России на 31.12.1995: официальный сайт. — 1995. — URL: <http://www.hivrussia.ru/stat/1995.shtml> (дата обращения 18.07.2024).

28. Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИД. Количество ВИЧ-инфицированных в России на 31.12.2004: официальный сайт. — 2004. — URL: <http://www.hivrussia.ru/stat/2004.shtml> (дата обращения 18.07.2024).

29. Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Информационный бюллетень №48. — 2024. — URL: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2024/11/hiv-infection-info-bulletin-48.pdf> (дата обращения 21.11.2024).

30. Халиков, М. Р. Вклад рекомбинационной изменчивости ВИЧ в формирование популяции ВИЧ-1, циркулирующих в Приморском крае / Халиков М. Р., Екушов В. Е., Тотменин А. В. [и др.] // Юг России: экология, развитие. — 2024. — Т. 18, № 4. — С. 125-133.

31. Щемелев, А. Н. Генетическое разнообразие вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в Калининградской области / А. Н. Щемелев, А. В. Семенов, Ю. В. Останкова [и др.] // Вопросы вирусологии. — 2022. — Т. 67, № 4. — С. 310-321.

32. Щемелев, А. Н. Генетическое разнообразие и мутации лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в Ленинградской области / А. Н. Щемелев, А. В. Семенов, Ю. В. Останкова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2022. — № 1. — С. 28-37.

33. Abram, M. E. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication / M. E. Abram, A. L. Ferris, W. Shao [et.al.] // Journal of virology. — 2010. — Vol. 84., № 19. — P. 9864-9878.

34. Aguilar, G. HIV drug resistance in persons initiating or reinitiating first-line antiretroviral therapy in Paraguay: Results of a National Patient Survey/ G. Aguilar, H. H. M. Truong, P. Ovelar [et.al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2022. – Vol. 94, № 10. – P. 5061-5065.
35. Altschul, S. F. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller [et.al.] // *Journal of molecular biology*. – 1990. – Vol. 215, № 3. – P. 403-410.
36. Anisenko, A. N., Gottikh M. B. Role of cellular DNA repair systems in HIV-1 replication / A. N. Anisenko, M. B. Gottikh // *Molecular Biology*. – 2019. – Vol. 53, № 3. – P. 313-322.
37. Anstett, K. HIV drug resistance against strand transfer integrase inhibitors / K. Anstett, B. Brenner, T. Mesplede [et.al.] // *Retrovirology*. – 2017. – Vol. 14. – P. 1-16.
38. Apetrei, C. H. B. HIV Sequence Compendium 2021 / C. H. B. Apetrei, A. Rambaut, B. J. R. Wolinsky [et.al.] // *HIV Sequence Database*. – 2021.
39. Archer, J. Identifying the important HIV-1 recombination breakpoints / J. Archer, J. W. Pinney, J. Fan [et.al.] // *PLoS computational biology*. – 2008. – Vol. 4, № 9. – e1000178.
40. Arts, E. J. HIV-1 antiretroviral drug therapy / E. J. Arts, D. J. Hazuda // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2012. – Vol. 2, № 4. – a007161.
41. Autran, B. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease / B. Autran, G. Carcelain, T. S. Li [et.al.] // *Science*. – 1997. – Vol. 277, № 5322. – P. 112-116.
42. Babel, R. A. Stigma, HIV risk, and access to HIV prevention and treatment services among men who have sex with men (MSM) in the United States: a scoping review / R. A. Babel, P. Wang, E. J. Alessi [et.al.] // *AIDS and Behavior*. – 2021. – P. 1-31.
43. Bacqué, J. Identification of CRF66_BF, a new HIV-1 circulating recombinant form of South American origin / J. Bacqué, E. Delgado, S. Benito [et.al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 774386.
44. Baird, H. A. Sequence determinants of breakpoint location during HIV-1 intersubtype recombination / H. A. Baird, R. Galetto, Y. Gao [et.al.] // *Nucleic acids research*. – 2006. – Vol. 34, № 18. – P. 5203-5216.

45. Balakrishna, S. Frequency matters: comparison of drug resistance mutation detection by Sanger and next-generation sequencing in HIV-1 / S. Balakrishna, T. Loosli, M. Zaheri [et.al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2023. – Vol. 78, № 3. – P. 656-664.
46. Balode, D. Phylogenetic analysis of the Latvian HIV-1 epidemic / D. Balode, H. Skar, M. Mild [et.al.] // *AIDS research and human retroviruses*. – 2012. – Vol. 28, № 8. – P. 928-932.
47. Baryshev, P.B. Genetic characterization of an isolate of HIV type 1 AG recombinant form circulating in Siberia, Russia / P.B. Baryshev, V.V. Bogachev, N.M. Gashnikova // *Archives of virology*. – 2012. – Vol. 157. –P. 2335-2341.
48. Baxter, J. D. Transmitted HIV-1 drug resistance in a large international cohort using next-generation sequencing: results from the Strategic Timing of Antiretroviral Treatment (START) study / J. D. Baxter, D. Dunn, A. Tostevin [et.al.] // *HIV medicine*. – 2021. – Vol. 22, № 5. – P. 360-371.
49. Bbosa, N., Kaleebu P., Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide / N. Bbosa, P. Kaleebu, D. Ssemwanga // *Current Opinion in HIV and AIDS*. – 2019. – Vol. 14, № 3. – P. 153-160.
50. Bester, S. M. Structural and mechanistic bases for a potent HIV-1 capsid inhibitor / S. M. Bester, G. Wei, H. Zhao [et.al.] // *Science*. – 2020. – Vol. 370, № 6514. – P. 360-364.
51. Bester, S. M. Structural and mechanistic bases of viral resistance to HIV-1 capsid inhibitor lenacapavir / S. M. Bester, D. Adu-Ampratwum, A. S. Annamalai [et.al.] // *Mbio*. – 2022. – Vol. 13, №. 5. – e01804-22.
52. Bishop, K. N. Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins / K. N. Bishop, R. K. Holmes, A. M. Sheehy [et.al.] // *Current biology*. – 2004. – Vol. 14, № 15. – P. 1392-1396.
53. Bobkov, A. An HIV type 1 epidemic among injecting drug users in the former Soviet Union caused by a homogeneous subtype A strain / A. Bobkov, R. Cheingsong-Popov, L. Selimova [et.al.] // *AIDS research and human retroviruses*. – 1997. – Vol. 13, № 14. – P. 1195-1201.

54. Bobkova M. Current status of HIV-1 diversity and drug resistance monitoring in the former USSR / Bobkova M. // *Aids Rev.* – 2013. – Vol. 15, № 4. – P. 204-12.
55. Borroto-Esoda, K. A comparison of the phenotypic susceptibility profiles of emtricitabine and lamivudine / K. Borroto-Esoda, N. Parkin, M. D. A Miller // *Antiviral Chemistry and Chemotherapy.* – 2007. – Vol. 18, № 5. – P. 297-300.
56. Brigati, C. HIV Tat, its TARgets and the control of viral gene expression / C. Brigati, M. Giacca, D. M. Noonan [et.al.] // *FEMS microbiology letters.* – 2003. – Vol. 220, № 1. – P. 57-65.
57. Brik A., Wong C. H. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery / A. Brik, C. H. Wong // *Organic & biomolecular chemistry.* – 2003. – Vol. 1, № 1. – P. 5-14.
58. Briggs J. A. G. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores / J. A. Briggs, T. Wilk, R. Welker [et.al.] // *The EMBO journal.* – 2003. – Vol. 22, № 7. – P. 1707–15.
59. Calcagno, A. Genetic polymorphisms affecting the pharmacokinetics of antiretroviral drugs / A. Calcagno, J. Cusato, A. D'Avolio [et.al.] // *Clinical pharmacokinetics.* – 2017. – Vol. 56. – P. 355-369.
60. Cassol, E. Monocyte-derived macrophages and myeloid cell lines as targets of HIV-1 replication and persistence / E. Cassol, M. Alfano, P. Biswas [et.al.] // *Journal of leukocyte biology.* – 2006. – Vol. 80, № 5. – P. 1018-1030.
61. Castley, A. et al. A national study of the molecular epidemiology of HIV-1 in Australia 2005–2012 / A. Castley, S. Sawleshwarkar, R. Varma [et.al.] // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, № 5. – e0170601.
62. Chen, Y. H. HIV risk behaviors in heterosexual partnerships: female knowledge and male behavior / Y. H. Chen, H. F. Raymond, W. McFarland [et.al.] // *AIDS and Behavior.* – 2010. – Vol. 14. – P. 87-91.
63. Chang, S. Y. Molecular Epidemiology of HIV Type 1 Subtypes in Taiwan: Outbreak of HIV Type 1 CRF07–BC Infection in Intravenous Drug Users / S. Y. Chang, W. H. Sheng, C. N. Lee [et.al.] // *AIDS Research & Human Retroviruses.* – 2006. – Vol. 22, № 11. – P. 1055-1066.

64. Chary, A. A review of drug-drug interactions in older HIV-infected patients / A. Chary, N. N. Nguyen, K. Maiton [et.al.] // *Expert Review of Clinical Pharmacology*. – 2017. – Vol. 10, № 12. – P. 1329-1352.
65. Chehadeh, W. Drug resistance-associated mutations in antiretroviral treatment-experienced patients in Kuwait / W. Chehadeh, O. Albaksami, S. E. John [et.al.] // *Medical Principles and Practice*. – 2018. – Vol. 27, № 2. – P. 152-157.
66. Cheung, P. K. Impact of combinations of clinically observed HIV integrase mutations on phenotypic resistance to integrase strand transfer inhibitors (INSTIs): a molecular study / P. K. Cheung, A. Shahid, W. Dong [et.al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2022. – Vol. 77, № 4. – P. 979-988.
67. Chiu, D. T. The toxicity of azidothymidine (AZT) on human and animal cells in culture at concentrations used for antiviral therapy / D. T. Chiu, P. H. Duesberg // *AIDS: Virus-or Drug Induced?*. – 1996. – P. 143-149.
68. Chiu, T. K. Structure and function of HIV-1 integrase / T. K. Chiu, D. R. Davies // *Current topics in medicinal chemistry*. – 2004. – Vol. 4, № 9. – P. 965-977.
69. Craigie, R. The molecular biology of HIV integrase / R. Craigie // *Future virology*. – 2012. – Vol. 7, № 7. – P. 679-686.
70. Cromer, D. Estimating the in-vivo HIV template switching and recombination rate / D. Cromer, A. J. Grimm, T. E. Schlub [et.al.] // *Aids*. – 2016. – Vol. 30, № 2. – P. 185-192.
71. Coffin, J. M. A brief chronicle of retrovirology / J. M. Coffin, S. H. Hughes, H. E. Varmus // *Retroviruses*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Woodbury, NY, USA. – 1997. – P. 6-16.
72. Collins, K. L. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes / K. L. Collins, B. K. Chen, S. A. Kalams [et.al.] // *Nature*. – 1998. – Vol. 391, № 6665. – P. 397-401.
73. Dang, Y. Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family/ Y. Dang, X. Wang, J. Esselman [et.al.] // *Journal of Virology*. – 2006. – Vol. 80, № 21. – P. 10522–10533.

74. Deren, S. Substance use among older people living with HIV: Challenges for health care providers / S. Deren, T. Cortes, V. V. Dickson [et.al.] // *Frontiers in public health.* – 2019. – V. 7. – P. 94.
75. Devanathan, A. S. Contemporary drug–drug interactions in HIV treatment / A. S. Devanathan, D. J. Anderson, M. L. Cottrell [et.al.] // *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* – 2019. – Vol. 105, № 6. – P. 1362-1377.
76. Dharan, A. Teaching old dogmas new tricks: recent insights into the nuclear import of HIV-1 / A. Dharan, E. M. Campbell // *Current opinion in virology.* – 2022. – Vol. 53. – P. 101203.
77. Di Giallonardo, F. Subtype-specific differences in transmission cluster dynamics of HIV-1 B and CRF01_AE in New South Wales, Australia / F. Di Giallonardo, A. N. Pinto, P. Keen [et.al.] // *Journal of the International AIDS Society.* – 2021. – Vol. 24, № 1. – e25655.
78. Didigu, C. A. Novel approaches to inhibit HIV entry / C. A. Didigu, R. W. Doms // *Viruses.* – 2012. – Vol. 4, № 2. – P. 309-324.
79. Díez-Fuertes, F. Bayesian phylogeographic analyses clarify the origin of the HIV-1 subtype A variant circulating in former Soviet Union’s countries / F. Díez-Fuertes, M. Cabello, M. M. Thomson // *Infection, Genetics and Evolution.* – 2015. – Vol. 33. – P. 197-205.
80. Ding, Y. Increase in HIV-1-transmitted drug resistance among ART-naïve youths at the China-Myanmar border during 2009-2017 / Y. Ding, M. Chen, J. Wang [et.al.] // *BMC infectious diseases.* – 2021. – Vol. 21. – P. 1-9.
81. Domaol, R. A. Structural and biochemical effects of human immunodeficiency virus mutants resistant to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors / R. A. Domaol, L. M. Demeter // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2004. – Vol. 36, № 9. – P. 1735-1751.
82. Dutilleul, A. Depicting HIV-1 transcriptional mechanisms: a summary of what we know / A. Dutilleul, A. Rodari, C. Van Lint // *Viruses.* – 2020. – Vol. 12, № 12. – P. 1385.

83. Dykes, C. Impact of clinical reverse transcriptase sequences on the replication capacity of HIV-1 drug-resistant mutants / C. Dykes, K. Fox, A. Lloyd [et.al.] // *Virology*. – 2001. – Vol. 285, № 2. – P. 193-203.
84. Elens, L. Influence of host genetic factors on efavirenz plasma and intracellular pharmacokinetics in HIV-1-infected patients / L. Elens, B. Vandercam, J. C. Yombi [et.al.] // *Pharmacogenomics*. – 2010. – Vol. 11, № 9. – P. 1223-1234.
85. Emery, A. HIV-1: to splice or not to splice, that is the question / A. Emery, R. Swanstrom // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, № 2. – P. 181.
86. Fan, J. The distribution of HIV-1 recombination breakpoints / J. Fan, M. Negroni, D. L. Robertson // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2007. – Vol. 7, № 6. – P. 717-723.
87. Fan, Q. Molecular genetics and epidemiological characteristics of HIV-1 epidemic strains in various sexual risk behaviour groups in developed Eastern China, 2017–2020 / Q. Fan, J. Zhang, M. Luo [et.al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2022. – Vol. 11, № 1. – P. 2326-2339
88. Fang, G. Recombination following superinfection by HIV-1 / G. Fang, B. Weiser, C. Kuiken [et.al.] // *Aids*. – 2004. – Vol. 18, № 2. – P. 153-159.
89. Faria, N. R. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations / N. R. Faria, A. Rambaut, M. A. Suchard [et.al.] // *Science*. – 2014. – Vol. 346, № 6205. – P. 56-61.
90. Fassati, A. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1 / A. Fassati, S. P. Goff // *Journal of virology*. – 2001. – Vol. 75, №. 8. – P. 3626-3635.
91. Faust, T. B. Making sense of multifunctional proteins: human immunodeficiency virus type 1 accessory and regulatory proteins and connections to transcription / T. B. Faust, J. M. Binning, J. D. Gross [et.al.] // *Annual review of virology*. – 2017. – Vol. 4. – P. 241-260.
92. Flieller, R. HIV Drug Resistance in Adults Initiating or Reinitiating Antiretroviral Therapy in Uruguay – Results of a Nationally Representative Survey, 2018–2019 / R. Flieller, S. Cabrera, D. Ruchansky [et.al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15, № 2. – P. 490.

93. Freng, Y. Suppression of APOBEC33-mediated restriction of HIV-1 by Vif / Y. Freng, T.T. Baig, R.P. Love [et.al.] // *Frontiers in microbiology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 450.
94. Fu, J. HIV-related stigma, depression and suicidal ideation among HIV-positive MSM in China: a moderated mediation model / J. Fu, X. Chen, Z. Dai [et.al.] // *BMC Public Health*. – 2023. – Vol. 23, № 1. – P. 2117.
95. Gashnikova, N. M. A rapid expansion of HIV-1 CRF63_02A1 among newly diagnosed HIV-infected individuals in the Tomsk Region, Russia / N. M. Gashnikova, V. V. Bogachev, P. B. Baryshev [et.al.] // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2015. – Vol. 31, № 4. – P. 456-460.
96. Gashnikova, N. M. Predominance of CRF63_02A1 and multiple patterns of unique recombinant forms of CRF63_A1 among individuals with newly diagnosed HIV-1 infection in Kemerovo Oblast, Russia / N. M. Gashnikova, D. P. Zyryanova, E. M. Astakhova [et.al.] // *Archives of virology*. – 2017. – Vol. 162. – P. 379-390.
97. Gatanaga, H. Mutations other than 103N in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT) emerge from K103R polymorphism under non-nucleoside RT inhibitor pressure / H. Gatanaga, A. Hachiya, S. Kimura [et.al.] // *Virology*. – 2006. – V. 344, № 2. – P. 354-362.
98. Gelderblom, H. R. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function / H. R. Gelderblom // *Aids*. – 1991. – Vol. 5, № 6. – P. 617-638.
99. Gelderblom, H. R. Zur Struktur und Funktion bei HIV: Gesichertes, neue Felder und offene Fragen / H. R. Gelderblom, M. Gentile, A. Scheidler [et.al.] // *AIDS-Forschung*. – 1993. – Vol. 8, № 5. – P. 231-242.
100. Gianotti, N. In vivo dynamics of the K103N mutation following the withdrawal of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in Human Immunodeficiency Virus-infected patients / N. Gianotti, L. Galli, E. Boeri [et.al.] // *The new Microbiologica*. – 2005. – Vol. 28, № 4. – P. 319-326.
101. Giovanetti, M. Molecular epidemiology of HIV-1 in African countries: a comprehensive overview / M. Giovanetti, M. Ciccozzi, C. Parolin [et.al.] // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9, № 12. – P. 1072.

102. Gounder, K. Complex Subtype Diversity of HIV-1 Among Drug Users in Major Kenyan Cities / K. Gounder, M. Oyaro, N. Padayachi [et.al.] // AIDS research and human retroviruses. – 2017. – Vol. 33, № 5. – P. 500-510.
103. Gräf, T. HIV-1 molecular diversity in Brazil unveiled by 10 years of sampling by the national genotyping network / T. Gräf, G. Bello, P. Andrade [et.al.] // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 15842.
104. Grobler, J. A. Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes / J. A. Grobler, K. Stillmock, B. Hu [et.al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – Vol. 99, № 10. – P. 6661-6666.
105. Guidelines on the public health response to pretreatment HIV drug resistance – World Health Organization. – 2017. – URL: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/255880/9789241550055-eng.pdf?sequence=1> (дата обращения 18.07.2024).
106. Gunn, J. K. L. Effectiveness of HIV stigma interventions for men who have sex with men (MSM) with and without HIV in the United States: a systematic review and meta-analyses / J. K. Gunn, C. Rooks-Peck, M. E. Wichser [et.al.] // AIDS and Behavior. – 2022. – P. 1-39.
107. Gupta-Wright, A. Virological failure, HIV-1 drug resistance, and early mortality in adults admitted to hospital in Malawi: an observational cohort study / A. Gupta-Wright, K. Fielding, J. J. van Oosterhout [et.al.] // The Lancet HIV. – 2020. – Vol. 7, № 9. – e620-e628.
108. Halikov, M. R. Identification of a novel HIV-1 circulating recombinant form CRF157_A6C in Primorsky Territory, Russia / M. R. Halikov, V. E. Ekushov, A. V. Totmenin // Journal of Infection. – 2024. – Vol. 88, №. 2. – P. 180-182.
109. Hanke, K. Reconstruction of the genetic history and the current spread of HIV-1 subtype A in Germany / K. Hanke, N. R. Faria, D. Kühnert [et.al.] // Journal of virology. – 2019. – Vol. 93, №. 12. – P. 10 – 1128.

110. Hare, S. Molecular mechanisms of retroviral integrase inhibition and the evolution of viral resistance / S. Hare, A. M. Vos, R. F. Clayton [et.al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – Vol. 107, № 46. – P. 20057-20062.
111. Harris, R. S. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection / R. S. Harris, K. N. Bishop, A. M. Sheehy [et.al.] // Cell. – 2003. – Vol. 113, № 6. – P. 803-809.
112. Hauser, A. National molecular surveillance of recently acquired HIV infections in Germany, 2013 to 2014 / A. Hauser, A. Hofmann, K. Hanke [et.al.] // Eurosurveillance. – 2017. – Vol. 22, № 2. – P. 30436.
113. Hayashida, T. Identification of new circulating recombinant form of HIV-1 CRF139_02B in Japan, and search for the origin / T. Hayashida, K. Tsuchiya, S. Oka [et.al.] // Global Health & Medicine. – 2024.
114. Heider D. Multilabel classification for exploiting cross-resistance information in HIV-1 drug resistance prediction / D. Heider, R. Senge, W. Cheng [et.al.] // Bioinformatics. – 2013. – Vol. 29, № 16. – P. 1946-1952.
115. Hemelaar, J. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004 / J. Hemelaar, E. Gouws, P. D. Ghys [et.al.] // Aids. – 2006. – Vol. 20, № 16. – W13-W23.
116. HIV Databases. – 2024. – URL: <https://www.hiv.lanl.gov> (дата обращения: 18.07.2024).
117. Hu, W. S. HIV-1 reverse transcription / W. S. Hu, S. H. Hughes // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2012. – Vol. 2, № 10. – a006882.
118. Hu, W. S. Retroviral recombination and reverse transcription / W. S. Hu, H. M. Temin // Science. – 1990. – T. 250, № 4985. – P. 1227-1233.
119. Hurley, J. H. Inside job: how the ESCRTs release HIV-1 from infected cells / J. H. Hurley, A. K. Cada // Biochemical Society Transactions. – 2018. – Vol. 46, № 5. – P. 1029-1036.
120. Ishizaki, A. Profile of HIV type 1 infection and genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naive HIV type 1-infected individuals in Hai Phong, Viet

- Nam / A. Ishizaki, N. H. Cuong, P. V. Thuc [et.al.] // AIDS research and human retroviruses. – 2009. – Vol. 25, № 2. – P. 175-182.
121. Jacques, D. A. HIV-1 uses dynamic capsid pores to import nucleotides and fuel encapsidated DNA synthesis / D. A. Jacques, W. A. McEwan, L. Hilditch [et.al.] // Nature. – 2016. – Vol. 536, № 7616. – P. 349-353.
122. Jern, P. Likely role of APOBEC3G-mediated G-to-A mutations in HIV-1 evolution and drug resistance / P. Jern, R. A. Russell, V. K. Pathak [et.al.] // PLoS pathogens. – 2009. – Vol. 5, № 4. – e1000367.
123. Jetzt, A. E. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome / A. E. Jetzt, H. Yu, G. J. Klarmann [et.al.] // Journal of virology. – 2000. – Vol. 74, № 3. – P. 1234-1240.
124. Ji, J. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase copying RNA in vitro / J. Ji, L. A. Loeb // Biochemistry. – 1992. – Vol. 31, № 4. – P. 954-958.
125. Jones, G. Regulation of neural cell survival by HIV-1 infection / G. Jones, C. Power // Neurobiology of disease. – 2006. – Vol. 21, № 1. – P. 1-17.
126. Johnson, V. A. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: March 2013 / V. A. Johnson, V. Calvez, H. F. Günthard [et.al.] // Topics in antiviral medicine. – 2013. – Vol. 21, № 1. – P. 6.
127. Josephson, F. Drug–drug interactions in the treatment of HIV infection: focus on pharmacokinetic enhancement through CYP3A inhibition / F. Josephson // Journal of internal medicine. – 2010. – Vol. 268, № 6. – P. 530-539.
128. Julias, J.G. Deoxyribonucleoside triphosphate pool imbalances in vivo are associated with an increased retroviral mutation rate / J.G. Julias, V.K. Pathak // Journal of Virology. –1998. – Vol.72, № 10. P. 7941–7949.
129. Katoh, K. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability / K. Katoh, D. M. Standley // Molecular biology and evolution. – 2013. – Vol. 30, № 4. – P. 772-780.
130. Khairunisa, S. Q. 2018–2019 Update on the Molecular Epidemiology of HIV-1 in Indonesia / S. Q. Khairunisa, N. L. A. Megasari, S. Ueda [et.al.] // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2020. – Vol. 36, № 11. – P. 957-963.

131. Kijak, G. H. HIV diversity, molecular epidemiology, and the role of recombination / G. H. Kijak, F. E. McCutchan // *Current infectious disease reports*. – 2005. – Vol. 7. – P. 480-488.
132. Kirchhoff, F. Absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection / F. Kirchhoff, T. C. Greenough, D. B. Brettler [et.al.] // *New England Journal of Medicine*. – 1995. – Vol. 332, № 4. – P. 228-232.
133. Kireev, D. E. Evaluating the accuracy and sensitivity of detecting minority HIV-1 populations by Illumina next-generation sequencing / D. E. Kireev, A. E. Lopatukhin, A. V. Murzakova [et.al.] // *Journal of virological methods*. – 2018. – Vol. 261. – P. 40-45.
134. Kirichenko, A. Prevalence of Pretreatment HIV-1 Drug Resistance in Armenia in 2017–2018 and 2020–2021 following a WHO Survey / A. Kirichenko, D. Kireev, I. Lapovok [et.al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, № 11. – P. 2320.
135. Kirichenko, A. Prevalence of HIV-1 drug resistance in Eastern European and Central Asian countries / A. Kirichenko, D. Kireev, I. Lapovok [et.al.] // *PLoS One*. – 2022. – Vol. 17, № 1. – e0257731.
136. Kline, R. L. Diversity and characterization of HIV-1 subtypes in the United States, 2008–2016 / R. L. Kline, N. Saduvala, T. Zhang [et.al.] // *Annals of Epidemiology*. – 2019. – Vol. 33. – P. 84-88.
137. Kolomeets, A. N. A uniquely prevalent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in Russian subtype A HIV-1 viruses / A. N. Kolomeets, V. Varghese, P. Lemey [et.al.] // *Aids*. – 2014. – Vol. 28, № 17. – F1-F8.
138. Kondru, R. Molecular interactions of CCR5 with major classes of small-molecule anti-HIV CCR5 antagonists / R. Kondru, J. Zhang, C. Ji [et.al.] // *Molecular pharmacology*. – 2008. – Vol. 73, № 3. – P. 789-800.
139. Korber, B. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation / B. Korber, B. Gaschen, K. Yusim [et.al.] // *British medical bulletin*. – 2001. – Vol. 58, № 1. – P. 19-42.
140. Kožíšek, M. Ninety-nine is not enough: molecular characterization of inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease mutants with insertions in the

- flap region / M. Kožíšek, K. G. Šašková, P. Řezáčová [et.al.] // Journal of virology. – 2008. – Vol. 82, № 12. – P. 5869-5878.
141. Krishnan, L. Retroviral integrase proteins and HIV-1 DNA integration / L. Krishnan, A. Engelman // Journal of Biological Chemistry. – 2012. – Vol. 287, № 49. – P. 40858-40866.
142. Kumar, S. Drug–drug interactions between anti-retroviral therapies and drugs of abuse in HIV systems / S. Kumar, P. S. S. Rao, R. Earla [et.al.] // Expert opinion on drug metabolism & toxicology. – 2015. – Vol. 11, № 3. – P. 343-355.
143. Kurbanov, F. Human immunodeficiency virus in Uzbekistan: epidemiological and genetic analyses / F. Kurbanov, M. Kondo, Y. Tanaka [et.al.] // AIDS research and human retroviruses. – 2003. – Vol. 19, № 9. – P. 731-738.
144. Kusejko, K. Similar but different: Integrated phylogenetic analysis of Austrian and Swiss HIV-1 sequences reveal differences in transmission patterns of the local HIV-1 epidemics / K. Kusejko, N. Tschumi, S. E. Chaudron [et.al.] // Journal of acquired immune deficiency syndromes. – 2022. – Vol. 90, № 4. – e4.
145. Laga, V. The genetic variability of HIV-1 in Kyrgyzstan: the spread of CRF02_AG and subtype A1 recombinants / V. Laga, I. Lapovok, E. Kazennova, // J. HIV AIDS. – 2015. – Vol. 1, № 2. – P. 5.
146. Lalezari, J. P. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America / J. P. Lalezari, K. Henry, M. O'Hearn [et.al.] // New England Journal of Medicine. – 2003. – Vol. 348, № 22. – P. 2175-2185.
147. Lapovok, I. A. Application of next generation sequencing in dual HIV infection studies / I. A. Lapovok, P. B. Baryshev, D. V. Saleeva [et.al.] // Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology. – 2021. – Vol. 98, № 6. – P. 627-638.
148. Lapovok, I. Molecular epidemiology of HIV Type 1 infection in Kazakhstan: CRF02_AG prevalence is increasing in the Southeastern Provinces / I. Lapovok, E. Kazennova, V. Laga [et.al.] // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2014. – Vol. 30, № 8. – P. 769-774.

149. Larder, B. A. Interactions between drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase / B. A. Larder // *Journal of General Virology*. – 1994. – Vol. 75, № 5. – P. 951-957.
150. Lau, K. A. Emerging trends of HIV epidemiology in Asia / K. A. Lau, B. Wang, N. K. Saksena // *AIDS Rev*. – 2007. – Vol. 9, № 4. – P. 218-29.
151. Lee, G. Q. Prevalence and clinical impacts of HIV-1 intersubtype recombinants in Uganda revealed by near-full-genome population and deep sequencing approaches / G. Q. Lee, D. R. Bangsberg, T. Mo [et.al.] // *Aids*. – 2017. – Vol. 31, № 17. – P. 2345-2354.
152. Letunic, I. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation / I. Letunic, P. Bork // *Nucleic acids research*. – 2021. – Vol. 49, № W1. – W293-W296.
153. Levintow, S. N. Prevalence and transmission dynamics of HIV-1 transmitted drug resistance in a southeastern cohort / S. N. Levintow, N. L. Okeke, S. Hué [et.al.] // *Open forum infectious diseases*. – US: Oxford University Press. – 2018. – Vol. 5, № 8. – ofy178.
154. Li, G. HIV genome-wide protein associations: a review of 30 years of research / G. Li, E. De Clercq // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2016. – Vol. 80, № 3. – P. 679-731.
155. Li, Q. HIV-1 genotypic resistance testing using sanger and next-generation sequencing in adults with low-level viremia in China / Q. Li, F. Yu, C. Song [et.al.] // *Infection and Drug Resistance*. – 2022. – P. 6711-6722.
156. Li, H. Characterization of a novel HIV-1 second-generation circulating recombinant form (CRF172_0755) among men who have sex with men in China / H. Li, Y. Feng, Y. Xu [et.al.] // *Journal of Infection*. – 2024.
157. Librelotto, C. S. HIV-1 epidemiology and circulating subtypes in the countryside of South Brazil / C. S. Librelotto, T. Gräf, D. Simon [et.al.] // *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. – 2015. – Vol. 48. – P. 249-257.
158. Lichterfeld, M. Immunodominance of HIV-1-specific CD8+ T-cell responses in acute HIV-1 infection: at the crossroads of viral and host genetics / M. Lichterfeld, G. Y. Xu, S. Le Gall [et.al.] // *Trends in immunology*. – 2005. – Vol. 26, № 3. – P. 166-171.

159. Lihana, R. W. Update on HIV-1 diversity in Africa: a decade in review / R. W. Lihana, D. Ssemwanga, A. L. Abimiku [et.al.] // *Aids Rev.* – 2012. – Vol. 14, № 2. – P. 83-100.
160. Liitsola, K. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad / K. Liitsola, I. Tashkinova, T. Laukkanen [et.al.] // *Aids.* – 1998. – Vol. 12, № 14. – P. 1907-1919.
161. Link, J. O. Clinical targeting of HIV capsid protein with a long-acting small molecule / J. O. Link, M. S. Rhee, W. C. Tse [et.al.] // *Nature.* – 2020. – Vol. 584, № 7822. – P. 614-618.
162. Liu, T. F. Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation / T. F. Liu, R. W. Shafer // *Clinical infectious diseases.* – 2006. – Vol. 42, № 11. – P. 1608-1618.
163. Lole, K. S. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination / K. S. Lole, R. C. Bollinger, R. S. Paranjape [et.al.] // *Journal of virology.* – 1999. – Vol. 73, № 1. – P. 152-160.
164. Lukashov, V. V. Sequence Note: Extreme Founder Effect in an HIV Type 1 Subtype A Epidemic among Drug Users in Svetlogorsk, Belarus / V. V. Lukashov, E. V. Karamov, V. F. Eremin [et.al.] // *AIDS research and human retroviruses.* – 1998. – Vol. 14, № 14. – P. 1299-1303
165. Maggiorella, M. T. Epidemiological and molecular characterization of HBV and HCV infections in HIV-1-infected inmate population in Italy: a 2017–2019 multicenter cross-sectional study / M. T. Maggiorella, L. Sernicola, O. Picconi [et.al.] // *Scientific Reports.* – 2023. – Vol. 13, № 1. – P. 14908.
166. Margot, N. A. Commonly transmitted HIV-1 drug resistance mutations in reverse-transcriptase and protease in antiretroviral treatment-naïve patients and response to regimens containing tenofovir disoproxil fumarate or tenofovir alafenamide / N. A. Margot, P. Wong, R. Kulkarni [et.al.] // *The Journal of infectious diseases.* – 2017. – Vol. 215, № 6. – P. 920-927.

167. Mariani, R. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif / R. Mariani, D. Chen, B. Schröfelbauer [et.al.] // *Cell*. – 2003. – Vol. 114, № 1. – P. 21-31.
168. Marinello, J. Comparison of raltegravir and elvitegravir on HIV-1 integrase catalytic reactions and on a series of drug-resistant integrase mutants / J. Marinello, C. Marchand, B. T. Mott [et.al.] // *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 47, № 36. – P. 9345-9354.
169. Marini, B. Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection / B. Marini, A. Kertesz-Farkas, H. Ali [et.al.] // *Nature*. – 2015. – Vol. 521, № 7551. – P. 227-231.
170. Meirong, X. I. E. Molecular epidemiological characteristics of newly diagnosed HIV-1 case in Fujian Province in 2020 / X. I. E. Meirong, L. I. N. Liying, W. A. N. G. Zhenghua [et.al.] // *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*. – 2023. – Vol. 35, № 6. – P. 583.
171. Mendes Da Silva, R. K. Genetic characterization of a new hiv-1 sub-subtype a in Cabo Verde, denominated a8 / R. K. Mendes Da Silva, I. I. Monteiro de Pina Araujo, K. Venegas Maciera [et.al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, № 6. – P. 1093.
172. Miller, R. H. HIV accessory proteins as therapeutic targets / R. H. Miller, N. Sarver // *Nature medicine*. – 1997. – Vol. 3, № 4. – P. 389-394.
173. Monaco, D. C. Resistance profile of HIV-1 quasispecies in patients under treatment failure using single molecule, real-time sequencing / D. C. Monaco, L. Zapata, E. Hunter [et.al.] // *Aids*. – 2020. – Vol. 34, № 15. – P. 2201-2210.
174. Mouhand, A. Overview of the nucleic-acid binding properties of the HIV-1 nucleocapsid protein in its different maturation states / A. Mouhand, M. Pasi, M. Catala [et.al.] // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12, № 10. – P. 1109.
175. Mourez, T. Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1 / T. Mourez, F. Simon, J. C. Plantier // *Clinical microbiology reviews*. – 2013. – Vol. 26, № 3. – P. 448-461.
176. Müller, T. G. Nuclear capsid uncoating and reverse transcription of HIV-1 / T. G. Müller, V. Zila, B. Müller [et.al.] // *Annual review of virology*. – 2022. – Vol. 9, № 1. – P. 261-284.

177. Murakami, T. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated membrane fusion by viral protease activity / T. Murakami, S. Ablan, E. O. Freed [et.al.] // *Journal of virology*. – 2004. – Vol. 78, № 2. – P. 1026-1031.
178. Murphy, R. E. Solution structure and membrane interaction of the cytoplasmic tail of HIV-1 gp41 protein / R. E. Murphy, A. B. Samal, J. Vlach [et.al.] // *Structure*. – 2017. – Vol. 25, № 11. – P. 1708-1718.
179. Murphy, R. E. The interplay between HIV-1 gag binding to the plasma membrane and env incorporation / R. E. Murphy, J. S. Saad // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12, № 5. – P. 548.
180. Nabatov, A. A. Simultaneous introduction of HIV type 1 subtype A and B viruses into injecting drug users in southern Ukraine at the beginning of the epidemic in the former Soviet Union / A. A. Nabatov, O. N. Kravchenko, M. G. Lyulchuk, [et.al.] // *AIDS research and human retroviruses*. – 2002. – Vol. 18, № 12. – P. 891-895.
181. Nalam, M. N. L. Evaluating the substrate-envelope hypothesis: structural analysis of novel HIV-1 protease inhibitors designed to be robust against drug resistance / M. N. Nalam, A. Ali, M. D. Altman [et.al.] // *Journal of virology*. – 2010. – Vol. 84, № 10. – P. 5368-5378.
182. Nastri, B. M. HIV and drug-resistant subtypes / B. M. Nastri, P. Pagliano, C. Zannella [et.al.] // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11, № 1. – P. 221.
183. Nawroth, I. Stable assembly of HIV-1 export complexes occurs cotranscriptionally / I. Nawroth, F. Mueller, E. Basyuk [et.al.] // *Rna*. – 2014. – Vol. 20, № 1. – P. 1-8.
184. Neil, S. J. D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu / S. J. D. Neil, T. Zang, P. D. Bieniasz // *Nature*. – 2008. – Vol. 451, № 7177. – P. 425-430.
185. Neogi, U. Molecular epidemiology of HIV-1 subtypes in India: origin and evolutionary history of the predominant subtype C / U. Neogi, I. Bontell, A. Shet [et.al.] // *PloS one*. – 2012. – Vol. 7, № 6. – e39819.
186. NeshumaeV, D. et al. Molecular surveillance of HIV-1 infection in Krasnoyarsk region, Russia: Epidemiology, phylodynamics and phylogeography / D. NeshumaeV, A.

- Lebedev, M. Malysheva [et.al.] // *Current HIV Research*. – 2019. – V. 17, № 2. – P. 114-125.
187. Nguyen, L. T. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies / L. T. Nguyen, H. A. Schmidt, A. Von Haeseler [et.al.] // *Molecular biology and evolution*. – 2015. – Vol. 32, № 1. – P. 268-274.
188. Nguyen, Q. N. Dynamic nanopore long-read sequencing analysis of HIV-1 splicing events during the early steps of infection / N. Nguyen Quang, S. Goudey, E. Ségéral [et.al.] // *Retrovirology*. – 2020. – Vol. 17, № 1. – P. 1-24.
189. Onafuwa-Nuga, A. The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination / A. Onafuwa-Nuga, A. Telesnitsky // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2009. – Vol. 73, № 3. – P. 451-480.
190. Oomen, P. G. A. Integrated analysis of viral blips, residual viremia, and associated factors in people with HIV: Results from a retrospective cohort study / P. G. Oomen, S. Dijkstra, L. M. Hofstra [et.al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2023. – Vol. 95, № 10. – e29178.
191. Palella, Jr F. J. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection / Jr. F. J. Palella, K. M. Delaney, A. C. Moorman [et.al.] // *New England Journal of Medicine*. – 1998. – Vol. 338, № 13. – P. 853-860.
192. Pandie, M. Drug–drug interactions between bedaquiline and the antiretrovirals lopinavir/ritonavir and nevirapine in HIV-infected patients with drug-resistant TB / M. Pandie, L. Wiesner, H. McIlleron [et.al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2016. – Vol. 71, № 4. – P. 1037-1040.
193. Panpradist, N. Near point-of-care, point-mutation test to detect drug resistance in HIV-1: a validation study in a Mexican cohort / N. Panpradist, I. A. Beck, P. S. Ruth [et.al.] // *AIDS*. – 2020. – Vol. 34, № 9. – P. 1331.
194. Paraskevis, D. Molecular epidemiology of HIV-1 infection / D. Paraskevis, A. Hatzakis // *AIDS Rev*. – 1999. – Vol. 1, № 4. – P. 238-249.

195. Parkin, N. T. Multi-laboratory comparison of next-generation to sanger-based sequencing for HIV-1 drug resistance genotyping / N. T. Parkin, S. Avila-Rios, D. F. Bibby [et.al.] // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12, № 7. – P. 694.
196. Pereira, L. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter / L. Pereira, K. Bentley, A. Peeters // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – Vol. 28. – P. 663–668.
197. Perrin, L. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants / L. Perrin, L. Kaiser, S. Yerly // *The Lancet infectious diseases*. – 2003. – Vol. 3, № 1. – P. 22-27.
198. Peter, F. HIV nef: the mother of all evil? / F. Peter // *Immunity*. – 1998. – Vol. 9, № 4. – P. 433-437.
199. Philpott, S. M. HIV-1 coreceptor usage, transmission, and disease progression / S. M. Philpott // *Current HIV research*. – 2003. – Vol. 1, № 2. – P. 217-227.
200. Pineda-Peña, A. C. Automated subtyping of HIV-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: performance evaluation of the new REGA version 3 and seven other tools / A. C. Pineda-Peña, N. R. Faria, S. Imbrechts [et.al.] // *Infection, genetics and evolution*. – 2013. – Vol. 19. – P. 337-348.
201. Pingarilho, M. Increasing prevalence of HIV-1 transmitted drug resistance in Portugal: implications for first line treatment recommendations / M. Pingarilho, V. Pimentel, I. Diogo [et.al.] // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12, № 11. – P. 1238.
202. Pion, M. APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection / M. Pion, A. Granelli-Piperno, B. Mangeat [et.al.] // *The Journal of experimental medicine*. – 2006. – Vol. 203, № 13. – P. 2887-2893.
203. Pornillos, O. Maturation of retroviruses / O. Pornillos, B. K. Ganser-Pornillos // *Current opinion in virology*. – 2019. – Vol. 36. – P. 47-55.
204. Preda, M. Romania, a Harbour of HIV-1 Subtype F1: Where Are We after 33 Years of HIV-1 Infection? / M. Preda, L. C. S. Manolescu // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, №. 9. – P. 2081.
205. Quinones-Mateu, M. E. Virus fitness: concept, quantification, and application to HIV population dynamics / M. E. Quinones-Mateu, E. J. Arts // *Quasispecies: Concept and Implications for Virology*. – 2006. – P. 83-140.

206. Rajaram, M. L. Hot and cold: Spatial fluctuation in HIV-1 recombination rates / M. L. Rajaram // 2007 IEEE 7th International Symposium on BioInformatics and BioEngineering. – 2007. – P. 707-714.
207. Ramos, A. Intersubtype human immunodeficiency virus type 1 superinfection following seroconversion to primary infection in two injection drug users / A. Ramos, D. J. Hu, L. Nguyen [et.al.] // Journal of Virology. – 2002. – Vol. 76, № 15. – P. 7444-7452.
208. Rasaiyaah, J. HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment / J. Rasaiyaah, C. P. Tan, A. J. Fletcher [et.al.] // Nature. – 2013. – Vol. 503, № 7476. – P. 402-405.
209. Ray, P. E. Fusion of HIV-1 envelope-expressing cells to human glomerular endothelial cells through an CXCR4-mediated mechanism / P. E. Ray, Á. A. Soler-García, L. Xu [et.al.] // Pediatric Nephrology. – 2005. – Vol. 20. – P. 1401-1409.
210. Reeves, J. D. Enfuvirtide resistance mutations: impact on human immunodeficiency virus envelope function, entry inhibitor sensitivity, and virus neutralization / J. D. Reeves, F. H. Lee, J. L. Miamidian [et.al.] // Journal of virology. – 2005. – Vol. 79, № 8. – P. 4991-4999.
211. Rittner, K. The human immunodeficiency virus long terminal repeat includes a specialised initiator element which is required for Tat-responsive transcription / K. Rittner, M. J. Churcher, M. J. Gait [et.al.] // Journal of molecular biology. – 1995. – Vol. 248, № 3. – P. 562-580.
212. Robertson, D. L. HIV-1 nomenclature proposal / D. L. Robertson, J. P. Anderson, J. A. Bradac [et.al.] // Science. – 2000. – Vol. 288, № 5463. – P. 55.
213. Ross, L. L. Changes from 2000 to 2009 in the prevalence of HIV-1 containing drug resistance-associated mutations from antiretroviral therapy-naive, HIV-1-infected patients in the United States / L. L. Ross, D. Shortino, M. S. Shaefer // AIDS research and human retroviruses. – 2018. – Vol. 34, № 8. – P. 672-679.
214. Rossetti, B. Evolution of transmitted HIV-1 drug resistance and viral subtypes circulation in Italy from 2006 to 2016 / B. Rossetti, S. Di Giambenedetto, C. Torti [et.al.] // HIV medicine. – 2018. – Vol. 19, № 9. – P. 619-628.

215. Ruchansky, D. Identification of a new HIV Type 1 circulating recombinant form (CRF38_BF1) in Uruguay / D. Ruchansky, C. Casado, J. C. Russi [et.al.] // AIDS research and human retroviruses. – 2009. – Vol. 25, № 3. – P. 351-356.
216. Sanaubarova, A. High-Level Drug-Resistant Mutations among HIV-1 Subtype A6 and CRF02_AG in Kazakhstan / A. Sanaubarova, E. Pujol-Hodge, N. Dzissyuk [et.al.] // Viruses. – 2023. – Vol. 15, № 7. – P. 1407.
217. Santos, A. F. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil / A. F. Santos, T. M. Sousa, E. A. Soares [et.al.] // Aids. – 2006. – Vol. 20, № 16. – P. 2011-2019.
218. Sapp, N. HIV-1 Preintegration Complex Preferentially Integrates the Viral DNA into Nucleosomes Containing Trimethylated Histone 3-Lysine 36 Modification and Flanking Linker DNA / N. Sapp, N. Burge, K. Cox [et.al.] // Journal of Virology. – 2022. – Vol. 96, № 18. – e01011-22.
219. Safina, K. R. Molecular epidemiology of HIV-1 in Oryol oblast, Russia / K. R. Safina, Y. Sidorina, N. Efendieva [et.al.] // Virus Evolution. – 2022. – Vol. 8, № 1. – veac044.
220. Schlösser, M. HIV-1 sub-subtype A6: settings for normalised identification and molecular epidemiology in the Southern Federal District, Russia / M. Schlösser, V. V. Kartashev, V. H. Mikkola [et.al.] // Viruses. – 2020. – Vol. 12, № 4. – P. 475.
221. Scriven, Y. A. Prevalence and factors associated with HIV-1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients in Nairobi, Kenya: A cross-sectional study / Y. A. Scriven, M. M. Mulinge, N. Saleri [et.al.] // Medicine. – 2021. – Vol. 100, № 40. – e27460.
222. Shafer, R. W. Rationale and uses of a public HIV drug-resistance database / R. W. Shafer // The Journal of infectious diseases. – 2006. – Vol. 194, № Supplement_1. – S51-S58.
223. Sharp, P. M. Origins of HIV and the AIDS pandemic / P. M. Sharp, B. H. Hahn // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2011. – Vol. 1, № 1. – a006841.

224. Siddiqui, D. Genetic and antiretroviral drug resistance mutations analysis of reverse transcriptase and protease gene from Pakistani people living with HIV-1 / D. Siddiqui, U. Badar, M. Javaid [et.al.] // *PLoS One*. – 2023. – Vol. 18, № 8. – e0290425.
225. Siepel, A. C. A computer program designed to screen rapidly for HIV type 1 intersubtype recombinant sequences / A. C. Siepel, A. L. Halpern, C. Macken, [et.al.] // *AIDS research and human retroviruses*. – 1995. – Vol. 11, № 11. – P. 1413-1416.
226. Simon-Loriere, E. Molecular mechanisms of recombination restriction in the envelope gene of the human immunodeficiency virus / E. Simon-Loriere, R. Galetto, M. Hamoudi [et.al.] // *PLoS Pathogens*. – 2009. – Vol. 5, № 5. – e1000418.
227. Sivay, M. V. HIV drug resistance among patients experiencing antiretroviral therapy failure in Russia, 2019–2021 / M. V. Sivay, L. V. Maksimenko, T. M. Nalimova [et.al.] // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2024. – Vol. 63, № 2. – P. 107074.
228. Sivay, M. V. Characterization of HIV-1 epidemic in Kyrgyzstan / M. V. Sivay, A. V. Totmenin, D. P. Zyryanova [et.al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 753675.
229. Sivay, M. V. Spatiotemporal dynamics of HIV-1 CRF63_02A6 sub-epidemic / M. V. Sivay, L. V. Maksimenko, I. P. Osipova [et.al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 946787.
230. Smyth, R. P. The origin of genetic diversity in HIV-1 / R. P. Smyth, M. P. Davenport, J. Mak // *Virus research*. – 2012. – Vol. 169, № 2. – P. 415-429.
231. Sosin, D. V., Tchurikov N. A. Molecular mechanisms of HIV-1 genetic diversity / D. V. Sosin, N. A. Tchurikov // *Molecular Biology*. – 2017. – Vol. 51. – P. 483-495.
232. Stecher, M. Drug Resistance Spread in 6 Metropolitan Regions, Germany, 2001–2018 / M. Stecher, A. Chaillon, C. Stephan [et.al.] // *Emerging infectious diseases*. – 2020. – Vol. 26, № 10. – P. 2439.
233. Struck, D. COMET: adaptive context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification / D. Struck, G. Lawyer, A. M. Ternes [et.al.] // *Nucleic acids research*. – 2014. – Vol. 42, № 18. – e144.

234. Su, L. Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China / L. Su, M. Graf, Y. Zhang [et.al.] // *Journal of virology*. – 2000. – Vol. 74, № 23. – P. 11367-11376.
235. Su, Y. Distribution of HIV-1 genotypes in China: a systematic review / Y. Su, H. Liu, J. Wu [et.al.] // *Zhonghua liuxingbingxue zazhi*. – 2014. – Vol. 35, № 10. – P. 1164-1168
236. Sundquist, W. I. HIV-1 assembly, budding, and maturation / W. I. Sundquist, H. G. Kräusslich // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2012. – a006924.
237. Suspene, R. Twin gradients in APOBEC3 edited HIV-1 DNA reflect the dynamics of lentiviral replication / R. Suspene, C. Rusniok, J. P. Vartanian [et.al.] // *Nucleic acids research*. – 2006. – Vol. 34, № 17. – P. 4677-4684.
238. Suzuki, Y. The road to chromatin—nuclear entry of retroviruses / Y. Suzuki, R. Craigie // *Nature Reviews Microbiology*. – 2007. – Vol. 5, № 3. – P. 187-196.
239. Svarovskaia, E. S. Structural determinants of murine leukemia virus reverse transcriptase that affect the frequency of template switching / E. S. Svarovskaia, K. A. Delviks, C. K. Hwang [et.al.] // *Journal of virology*. – 2000. – Vol. 74, № 15. – P. 7171-7178.
240. Tang, M. W. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications / M. W. Tang, R. W. Shafer // *Drugs*. – 2012. – Vol. 72. – e1-e25.
241. Tantillo, C. Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase: implications for mechanisms of drug inhibition and resistance / C. Tantillo, J. Ding, A. Jacobo-Molina [et.al.] // *Journal of molecular biology*. – 1994. – Vol. 243, № 3. – P. 369-387.
242. Tebit, D. M. Divergent evolution in reverse transcriptase (RT) of HIV-1 group O and M lineages: impact on structure, fitness, and sensitivity to nonnucleoside RT inhibitors / D. M. Tebit, M. Lobritz, M. Lalonde [et.al.] // *Journal of virology*. – 2010. – Vol. 84, № 19. – P. 9817-9830.
243. Templeton, A. R. Multiple-infection and recombination in HIV-1 within a longitudinal cohort of women / A. R. Templeton, M. G. Kramer, J. Jarvis [et.al.] // *Retrovirology*. – 2009. – Vol. 6. – P. 1-12.

244. Terai, C. Pyrimidine nucleotide and nucleic acid synthesis in human monocytes and macrophages / C. Terai, D. A. Carson // *Experimental cell research*. – 1991. – Vol. 193, № 2. – P. 375-381.
245. The World Health Organization 2009 list of mutations – HIV Drug Resistance Database. – 2009. – URL: <https://hivdb.stanford.edu/page/who-sdrm-list/> (дата обращения 18.07.2024).
246. Trifinopoulos, J. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis / J. Trifinopoulos, L. T. Nguyen, A. von Haeseler [et.al.] // *Nucleic acids research*. – 2016. – Vol. 44, № W1. – W232-W235.
247. Tsamis, F. 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, S. Gavrilov, F. Kajumo [et.al.] // *Journal of virology*. – 2003. – Vol. 77, № 9. – P. 5201-5208.
248. Tuan, J. Lenacapavir: a twice-yearly treatment for adults with multidrug-resistant HIV infection and limited treatment options / J. Tuan, O. Ogbuagu // *Expert review of anti-infective therapy*. – 2023. – Vol. 21, № 6. – P. 565-570.
249. UNAIDS. Understanding Fast-Track: accelerating action to end the AIDS epidemic by 2030. – 2015. URL: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/JC2686_WAD2014report_en.pdf (дата обращения 18.07.2024).
250. UNAIDS. Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet. – 2024. – URL: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf (дата обращения 21.11.2024).
251. van Heuvel, Y. Infectious RNA: Human Immunodeficiency Virus (HIV) Biology, Therapeutic Intervention, and the Quest for a Vaccine / Y. van Heuvel, S. Schatz, J. F. Rosengarten // *Toxins*. – 2022. – Vol. 14, № 2. – P. 138.
252. van Kooyk, Y. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens / Y., van Kooyk, T. B. H. Geijtenbeek // *Nature Reviews Immunology*. – 2003. – Vol. 3, № 9. – P. 697-709.
253. Vartanian, J. P. Sustained G→A hypermutation during reverse transcription of an entire human immunodeficiency virus type 1 strain Vau group O genome / J. P. Vartanian,

- M. Henry, S. Wain-Hobson // *Journal of general virology*. – 2002. – Vol. 83, № 4. – P. 801-805.
254. Vartanian, J. P. Selection, recombination, and G→A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes / J. P. Vartanian, A. Meyerhans, B. Asjö [et.al.] // *Journal of virology*. – 1991. – Vol. 65, № 4. – P. 1779-1788.
255. Vasudevan, A.A. Structural features of antiviral DNA cytidine deaminases / A.A. Vasudevan, S.H. Smits, A. Hoppner [et.al.] // *Biological Chemistry*, 2013. – Vol. 394. – P. 1357-1370.
256. Visseaux, B. HIV-2 molecular epidemiology / B. Visseaux, F. Damond, S. Matheron [et.al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2016. – Vol. 46. – P. 233-240.
257. Visseaux, B. Surveillance of HIV-1 primary infections in France from 2014 to 2016: toward stable resistance, but higher diversity, clustering and virulence? / B. Visseaux, L. Assoumou, N. Mahjoub [et.al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2020. – Vol. 75, №. 1. – P. 183-193.
258. Wainburg, M. A. The impact of the M184V substitution on drug resistance and viral fitness / M. A. Wainburg // *Expert review of anti-infective therapy*. – 2004. – Vol. 2, № 1. – P. 147-151.
259. Wang, H. Recombination in positive-strand RNA viruses / H. Wang, X. Cui, X. Cai [et.al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 870759.
260. Wei, P. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA / P. Wei, M. E. Garber, S. M. Fang [et.al.] // *Cell*. – 1998. – V. 92, №. 4 – P. 451-462.
261. Weinhardt, L. S. HIV transmission risk behavior among men and women living with HIV in 4 cities in the United States / L. S. Weinhardt, J. A. Kelly, M. J. Brondino [et.al.] // *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. – 2004. – Vol. 36, № 5. – P. 1057-1066.
262. Whitcomb, J. M. Hypersusceptibility to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in HIV-1: clinical, phenotypic and genotypic correlates / J. M. Whitcomb, W. Huang, K. Limoli [et.al.] // *Aids*. – 2002. – Vol. 16, № 15. – F41-F47.

263. Williams, A. Geographic and population distributions of HIV-1 and HIV-2 circulating subtypes: a systematic literature review and meta-analysis (2010-2021) / A. Williams, S. Menon, M. Crowe [et.al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2023. – jiad327.
264. Wong-Staal, F. The AIDS virus. What we know and what we can do about it / F. Wong-Staal // *Western Journal of Medicine*. – 1991. – Vol. 155, № 5. – P. 481.
265. Wu, W. Strand transfer mediated by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in vitro is promoted by pausing and results in misincorporation / W. Wu, B. M. Blumberg, P. J. Fay [et.al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – Vol. 270, № 1. – P. 325-332.
266. Xue, G. Discovery of a small molecule inhibitor of the interaction between HIV-1 proteins and cellular cofactors: a novel candidate anti-HIV-1 drug / G. Xue, Y. Aida // *Current Chemical Biology*. – 2010. – Vol. 4, № 3. – P. 188-199.
267. Yamaguchi, J. Brief report: complete genome sequence of CG-0018a-01 establishes HIV-1 subtype L / J. Yamaguchi, A. Vallari, C. McArthur [et.al.] // *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. – 2020. – Vol. 83, № 3. – P. 319.
268. Ye, M. Identification of two novel HIV-1 circulating recombinant forms of CRF111_01C and CRF116_0108 in southwestern Yunnan, China / M. Ye, X. Chen, L. Duo [et.al.] // *Virulence*. – 2022. – Vol. 13, № 1. – P. 19-29.
269. Yu, X. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex / X. Yu, Y. Yu, B. Liu [et.al.] // *Science*. – 2003. – Vol. 302. – P. 1056-1060.
270. Yuan, R. Prevalence of different HIV-1 subtypes in sexual transmission in China: a systematic review and meta-analysis / R. Yuan, H. Cheng, L. S. Chen [et.al.] // *Epidemiology & Infection*. – 2016. – Vol. 144, № 10. – P. 2144-2153.
271. Zaccarelli, M. Factors related to virologic failure among HIV-positive injecting drug users treated with combination antiretroviral therapy including two nucleoside reverse transcriptase inhibitors and nevirapine / M. Zaccarelli, A. Barracchini, P. De Longis [et.al.] // *AIDS patient care and STDs*. – 2002. – Vol. 16, № 2. – P. 67-73.

272. Zhang, H. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA / H. Zhang, B. Yang, R. J. Pomerantz [et.al.] // *Nature*. – 2003. – Vol. 424, № 6944. – P. 94-98.
273. Zhang, M. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic / M. Zhang, B. Foley, A. K. Schultz [et.al.] // *Retrovirology*. – 2010. – Vol. 7. – P. 1-15.
274. Zhao, J. Identification and genetic characterization of a novel CRF22_01A1 recombinant form of HIV type 1 in Cameroon / J. Zhao, S. Tang, V. Ragupathy, [et.al.] // *AIDS research and human retroviruses*. – 2010. – Vol. 26, №. 9. – P. 1033-1045.
275. Zhao, Y. Mortality and virological failure among HIV-infected people who inject drugs on antiretroviral treatment in China: An observational cohort study / Y. Zhao, M. Zhang, C. X. Shi [et.al.] // *Drug and alcohol dependence*. – 2017. – Vol. 170. – P. 189-197.
276. Zheng, S. Epidemiology and molecular transmission characteristics of HIV in the capital city of Anhui Province in China / S. Zheng, J. Wu, Z. Hu [et.al.] // *Pathogens*. – 2021. – Vol. 10, № 12. – P. 1554.
277. Zhong, X. Molecular network analysis of 308 newly diagnosed HIV infection and 210 ART failure patients from rural counties in Sichuan / S. Zheng, J. Wu, Z. Hu [et.al.] // *Plos one*. – 2024. – Vol. 19, №. 2. – e0298324.
278. Zila, V. HIV-1 capsid is the key orchestrator of early viral replication / V. Zila, T. G. Müller, B. Müller [et.al.] // *PLoS pathogens*. – 2021. – Vol. 17, № 12. – e1010109.
279. Zuo, L. Trend of HIV-1 drug resistance in China: a systematic review and meta-analysis of data accumulated over 17 years (2001–2017) / L. Zuo, K. Liu, H. Liu [et.al.] // *EClinicalMedicine*. – 2020. – Vol. 18.