

8. Batoool Kazmi, PhD; Christopher J. Inglefield, FRCS (Plast); Mark P. Lewis, PhD Autologous Cell Therapy: Current Treatments and Future Prospects //Wounds. 2009 VOLUME: 21 PUBLICATION DATE: Sep 15 2009 pp234-242
9. Prockop S.J., Gregory C.A., Spees J.L. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues //Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 2003. - vol. 100. - p. 11917-23.
10. Seshi B., Kumar S., King D. et al. Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells a evidenced by single-cell microarray analysis //Blood Cells Mol. Dis. - 2003. - vol. 31. p. 268-85.
11. Spees J.L., Olson S.D., Ylostalo J. Et al. Differentiation. cell fusion and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma //Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 2003. - vol. 100. - p. 2397-402.
12. Wang G., Bunnell B., Painter R.G. et al. Potential of BM-MSC for cystic fibrosis therapy //Mol. Therapy - 2004. - vol. 9. - Suppl. 1. - p. 195-205.
13. Wang G., Bunnell B., Painter R.G. et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis //Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 2005. - vol. 102. - p. 188-91.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ИЗОЛЯТА ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА К АНТИРЕТРОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Зорников Д. Л.

Научный руководитель - д.м.н., профессор Сергеев А. Г.

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии ГОУ ВПО УГМА Росздрава

Актуальность проблемы развития устойчивости вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) к антиретровирусным препаратам обусловлена постоянно возрастающим количеством ВИЧ-инфицированных пациентов, нуждающихся в лекарственной помощи. Особую группу составляют ВИЧ-инфицированные беременные женщины, которым антиретровирусная терапия (АРТ) показана для снижения риска внутриутробного инфицирования плода.

В настоящее время для лечения ВИЧ-инфекции используются препараты, которые подавляют репликацию ВИЧ в организме, ингибируя различные стадии цикла репродукции. В зависимости от точки приложения, данные препараты делятся на четыре класса: ингибиторы слияния вируса и клетки, ингибиторы обратной транскриптазы (ОТ), ингибиторы интегразы и ингибиторы протеазы. Наиболее широкое применение в практике получили два класса препаратов – ингибиторы ОТ и ингибиторы протеазы. Для эффективного подавления репродукции ВИЧ используют схемы лечения, включающие 2-3 препарата, как правило, из разных классов. В Свердловской области наиболее часто назначаются стандартные схемы из двух нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы и ингибитора протеазы или из двух нуклеозидных и одного ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы. Показателями эффективности лечения являются снижение «вирусной нагрузки» и стабилизация концентрации CD4 лимфоцитов в крови которая определяется через 6 месяцев после начала терапии.

Одной из особенностей ВИЧ, снижающей эффективность антивирусной терапии, является его высокая изменчивость. В настоящее время обнаружены многочисленные мутации в генах обратной транскриптазы и протеазы, приводящие к аминокислотным заменам, и изменяющие чувствительность вируса к антиретровирусным препаратам (табл. 1).

Таблица 1

Аминокислотные замены, ассоциированные с устойчивостью ВИЧ к антиретровирусным препаратам [3]

Препарат/комбинация	Мутация в гене	Аминокислотные замены
Zidovudine	ОТ	T21Y/F, Q151M, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V
Zidovudine	ОТ	Комбинация 3-х и более из перечисленных мутаций: M41L, D676N, K70R, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V, K219Q/E
Didanosine	ОТ	Q151M; L74V без любой из перечисленных далее мутаций: M41L, T69D, K70R, M184V/I, T215Y/F, K219Q/E; Вставка в 69 кодоне; K65R
Stavudine	ОТ	Q151M; V75M/S/A/T, T215Y/F; T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V; комбинация 3-х и более из перечисленных замен: M41L, D67N, K70R, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V, K219Q/E; Вставка в 69 кодоне

Abacavir	OT	Q151M, K65R; комбинация из 4-х замен: K65R+L74V+Y115F+M184V/I; комбинация 5 и более из перечисленных замен: M41L, D67N, L74V, M184V/I, L210W, T215Y/F; комбинация из 4-х перечисленных замен: M41L, D67N, L74V, M184V/I, L210W, T215Y/F; Вставка в 69 кодоне
Tenofovir	OT	K65R, K70E; комбинация из 6 и более замен: M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V, L210W, T215Y/F; вставка в 69 кодоне
Efavirenz	OT	L100I, K101E, K103H/N/S/T, V106M, Y181C/L, Y188C/L G190A/C/E/Q/S/T/V, P225H, M230L
Nevirapine	OT	L100I, K101E, K103H/N/S/T V106A/M, Y181C/I, Y188C/H/L G190A/C/E/Q/S/T/V, M230L
Etravirin	OT	Y181C
Lamivudine/Emtricitabine,	OT	K65R, Q151M, M184V/I; вставка в 69 кодоне
Indinavir	Протеазы	M46I/L, V82A/F/M/S/T, I84A/V, L90M; L90M и комбинация из 2-х перечисленных замен: K20M/R, L24I, V32I, M36I, I54V/L/M/T, A71V/T, G73S/A, V77I
Saquinavir/Ritonavir	Протеазы	G48V; комбинация из 4-х и более замен: L10F/I/M/R/V, I15A/V, K20I/M/R/T, L24I, I62V, G73S/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M; комбинация из 3-х перечисленных замен: L10F/I/M/R/V, I15A/V, K20I/M/R/T, L24I, I62V, G73S/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M
Nelfinavir	Протеазы	D30N, I84A/V, N88S/D, L90M; V82A/F/S/T и комбинация из 2-х и более перечисленных замен: L10I, M36I, M46I/L, I54V/L/M/T, A71V/T, V77I
Lopinavir	Протеазы	I47A; комбинация из 8 перечисленных замен: L10F/I/M/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M; комбинация из 6 или 7 замен: L10F/I/M/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M
Fosamprenavir/Ritonavir	Протеазы	I50V; комбинация из 2-х замен: V32I+I47A/V; комбинация из 4-х и более замен: L10F/I/V, L33F, M36I, I54A/L/M/S/T/V, I62V, V82A/C/F/G, I84V, L90M
Atazanavir/Ritonavir	Протеазы	I50L; комбинация из 3-х и более замен: L10F/I/V, G16E, L33F/I/V, M46I/L, D60E, I84V, I85V, L90M
Tipranavir /Ritonavir	Протеазы	Комбинация из 8 и более замен: L10V, I13V, K20M/R/V, L33F, E35G, M36I, K43T, M46L, I47V, I54A/M/V, Q58E, H69K, T74P, V82L/T, N83D, I84V; Комбинация из 4-х и более замен: L10V, I13V, K20M/R/V, L33F, E35G, M36I, K43T, M46L, I47V, I54A/M/V, Q58E, H69K, T74P, V82L/T, N83D, I84V
Darunavir/Ritonavir	Протеазы	Комбинация из 4-х и более замен: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, G73S, L76V, I84V, L89V; Комбинация из 3-х перечисленных замен: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, G73S, L76V, I84V, L89V

Данные, приведенные в таблице 1, свидетельствуют о необходимости определения лекарственной устойчивости к антиретровирусным препаратам штамма ВИЧ перед назначением АРТ конкретному пациенту [1, 2]. Современный уровень молекулярной диагностики позволяет осуществить эту задачу.

Цель исследования – отработка методики выявления мутаций в генах обратной транскриптазы и протеазы ВИЧ, ответственных за развитие устойчивости вируса к антиретровирусным препаратам, на модели вирусного изолята, выделенного от пациента, проживающего на территории Свердловской области.

Материалы и методы исследования

Для исследования был взят образец венозной крови от носителя ВИЧ, проходившего лечение в инфекционным отделении ГКБ №40 города Екатеринбург.

Вирусную РНК выделяли из 100 мl плазмы методом сорбции на силикагелевом носителе с помощью набора реагентов "РИБО-сорб" (ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), согласно инструкции производителя.

Для проведения реакции обратной транскрипции использовали ревертазу M-MLV и гексануклеотидные праймеры со случайной последовательностью нуклеотидов ("РЕВЕРТА-L-100" того же производителя).

Аmplификацию части вирусного генома (1500 оснований, кодирующих белки протеазу и обратную транскриптазу) проводили методом «вложенной» полимеразной цепной реакции (ПЦР). Синтез праймеров выполнен в ЗАО "Синтол" (Москва).

Для проведения первого раунда ПЦР готовили 25 мl реакционной смеси, включающей: 2 ед. ДНК-полимеразы, 0,2 mM смесь dNTP, по 5 pmol праймеров V1F и V1R, реакционный буфер (67 mM Трис-НСl (рН 8,3), 2,0 mM MgCl₂), 10 мl κДНК. ПЦР проводили по следующей схеме: 1 цикл - 95°C – 5 минут; 42 цикла - 95°C – 20 секунд, 55°C – 1,5 минуты, 72°C – 40 секунд; и заключительный цикл - 72°C – 5 минут.

Праймеры для «вложенной» ПЦР (1-й раунд)

V1F 5' TTAGGGAAAAATCTGGCCTTC 3'

V1R 5' AAGGGAGGGGTATTGACAAA 3'

Во втором раунде ПЦР использовали аналогичную реакционную смесь с праймерами V2F, V2R и 1 мl амплификата, полученного в предыдущей реакции. Схема проведения второго раунда: 1 цикл - 95°C – 5 минут; 30 циклов - 95°C – 20 секунд, 58°C – 1 минута, 72°C – 40 секунд; 1 цикл - 72°C – 5 минут.

Праймеры для «вложенной» ПЦР (2-й раунд)

V2F 5' AACAGCCCCACCAGAAGAGA 3'

V2R 5' TCCAGGTGGCTTGCCAATA 3'

Для анализа продуктов амплификации использовали электрофорез в 2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе.

Секвенирование κДНК проводили в автоматическом режиме с использованием генетического анализатора ABI Prism 310 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, U.S.A.) с использованием набора реагентов ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.0 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, U.S.A.) по прямой и обратной последовательностям в соответствии с рекомендациями производителя. Для определения прямой последовательности использовали праймеры V2F, S2F, S3F, для обратной последовательности – праймеры V2R, S2R, S3R.

Праймеры для секвенирования прямой последовательности:

V2F 5' AACAGCCCCACCAGAAGAGA 3'

S2F 5' TGGCCATTGACAGAAGAAAA 3'

S3F 5' ATCTATCAATACATGGATGA 3'

Праймеры для секвенирования обратной последовательности:

V2R 5' TCCAGGTGGCTTGCCAATA 3'

S2R 5' TATGTCATTGACAGTCCAGC 3'

S3R 5' CGGGATGTGGTATTCCTAA 3'

Для разработки праймеров, сопоставления сегментов, выравнивания и сравнения последовательностей нуклеотидов и аминокислот использовали компьютерную программу MEGA v.3.1 (Kumar et al., 2004).

В качестве прототипного («дикого») штамма ВИЧ для сравнения с клиническим изолятом был использован штамм HIV-1 из коллекции GenBank K03455 – один из первых выделенных штаммов ВИЧ, чувствительный ко всем антиретровирусным препаратам.

Результаты исследования и их обсуждение

После амплификации и секвенирования участка генома клинического изолята ВИЧ (с 2220 по 3728 нуклеотид) при сравнении с «диким» штаммом было выявлено 170 нуклеотидных замен, 46 из которых оказались значимыми – приводящими к аминокислотным заменам (табл.2).

Таблица 2

Аминокислотные замены в гене ОТ и протеазы, выявленные в клиническом изоляте ВИЧ при сравнении с прототипным штаммом ВИЧ K03455.

Ген	Аминокислотные замены
ОТ	K11T, V35M, E36D, T39K, K65R, D123N, A158S, S162A, K173S, Q174K, D177E, E203D, Q207N, R211K, L214F, E248D, R277K, T286A, E291D, V292I, I293V, P294T, I326V, G335D, R356K, M357N, R358G, G359S, E370A, A371L, I375V, T376A, K390R
Протеазы	V3I, L10I, I13V, K14R, G16E, E35D, M36I, S37N, R41K, H69K, I72V, V77I, L89M

Сравнительный анализ аминокислотных замен в генах ОТ и протеазы исследуемого штамма ВИЧ с имеющимися данными литературы о мутациях, ассоциированных с резистентностью к антиретровирусным препаратам [3] позволяет сделать заключение о лекарственной устойчивости исследованного клинического изолята (табл.3).

Таблица 3

Аминокислотные замены в генах обратной транскриптазы и протеазы, ассоциированные с устойчивостью к антиретровирусным препаратам, обнаруженные в клиническом изоляте ВИЧ

Ген	Аминокислотная замена/комбинация замен	Лекарственная устойчивость к препарату/комбинации препаратов	
		Абсолютная	Умеренная
ОТ	K65R	Tenofovir	Didanosine, Abacavir, Lamivudine/Emtricitabine
Протеазы	L10I+I13V+M36I+H69K		Tipranavir/Ritonavir

Проведенные молекулярно-генетические исследования показали, что в генах ОТ и протеазы клинического изолята ВИЧ от пациента Б. присутствуют 170 мутаций. Однако, вследствие вырожденности генетического кода, количество значимых мутаций, приводящих к изменению аминокислотной последовательности белка оказалось почти в 4 раза меньше: 33 в гене ОТ и 13 в гене протеазы.

Сравнение полученных аминокислотных последовательностей исследованного штамма ВИЧ с данными литературы о мутациях, ассоциированных с резистентностью ВИЧ к антиретровирусным препаратам позволило сделать вывод о нецелесообразности включения в схему АРТ пациента Б. следующих препаратов: Tenofovir, Didanosine, Abacavir, Lamivudine, Emtricitabine, Tipranavir, Ritonavir.

Выводы

1. В генах протеазы и обратной транскриптазы штамма ВИЧ от инфицированного пациента Б. выявлено большое количество мутаций (170), что свидетельствует о высокой изменчивости вируса.

2. Обнаружено 46 мутаций, приводящих к аминокислотным заменам в белках ОТ и протеазы.

3. Пять из выявленных аминокислотных замен определяют устойчивость исследованного штамма ВИЧ к антиретровирусным препаратам: одна замена в гене ОТ (K65R) ассоциирована с абсолютной устойчивостью к препарату Tenofovir и умеренной устойчивостью к комбинации Lamivudine/Emtricitabine, а также препаратам Didanosine и Abacavir. Сочетание четырех мутаций в гене протеазы (L10I+I13V+M36I+H69K) является маркером умеренной устойчивости изолята к комбинации препаратов Tipranavir / Ritonavir.

ЛИТЕРАТУРА

1. Выявление мутаций в геноме ВИЧ-1, связанных с резистентностью к антиретровирусным препаратам, при лечении ВИЧ-инфекции у детей// Г. И. Коровина, Ю. А. Фомин, М. В. Галкина, Е. Е. Воронин, Ф. Е. Райзе, И. М. Улюкин //Terra Medica Nova: Всероссийский журнал для врачей всех специальностей http://www.terramedica.spb.ru/1_2002/korovina.htm
2. Оптимизация схем лечения ВИЧ-инфекции с учетом данных по лекарственной устойчивости ВИЧ/ Г. И. Коровина, Ю. А. Фомин, К. Н. Додонов, Е. Е. Воронин, Ф. Е. Райзе, И. М. Улюкин, А. Н. Ясинская//Terra Medica Nova: Всероссийский журнал для врачей всех специальностей http://www.terramedica.spb.ru/ld2_2003/korovina.htm
3. HIV-1 genotypic drug resistance interpretation's algorithms// <http://www.hivfrenchresistance.org/2009/Algo-2009.pdf>

СИСТЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ КУЛЬТУР МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Зубанов П.С., Зверева А.Е., Васильева М. С., Улыбин А.И., Медведева С.Ю.

Научный руководитель – д.м.н., профессор Макеев О.Г.

ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Росздрава
ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Одним из наиболее перспективных исследовательских направлений в области клеточных технологий считается изучение мезенхимальных клеток-предшественников – клеточной популяции, которая присутствует в организме взрослого человека и способна давать начало всем клеткам, составляющим основу соединительной, хрящевой, костной, жировой и мышечной тканей. Также в литературе имеются сведения, указывающие на причастность мезенхимальных стволовых клеток к формированию кровеносных сосудов, нервной и глиальной тканей [3].