

Ж.С. НУГМАНОВА, Н.О. НАКИСБЕКОВ, Г.М. АХМЕТОВА, Ш.М.НУРМОЛДИН, Н.Г. КОВТУНЕНКО,  
Г.С. КУРМАНГАЛИЕВА, Г.Р. КАЛЖАНБАЕВА, М.К. АБДУМАНАНОВА

КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, г. Алматы, РК

### ПОЛИМОРФИЗМ CCR5 ГЕНА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ Г. АЛМАТЫ

*Делеция 32 пар нуклеотидов CCR5 гена приводит к появлению кодируемого этим геном дефектного CCR5 – рецептора на поверхности CD4 – клеток. Это препятствует прикреплению и проникновению ВИЧ в клетку. 1% лиц белой расы являются гомозиготными носителями delta 32/delta 32 полиморфизма и устойчивы к ВИЧ-инфекции, 10 - 15% европейцев являются гетерозиготными носителями этой мутации, у них снижена восприимчивость к инфекции и отмечается более позднее начало СПИД.*

*Нами впервые в РК проведено изучение распространенности аллельного полиморфизма CCR5 delta 32 этой мутации среди ВИЧ – инфицированных лиц г. Алматы и его возможное протективное действие. Гетерозиготными носителями полиморфизма CCR5 гена были в основном лица славянского этноса, Гетерозиготные мутации выявлены у 12,7% пациентов.*

**Ключевые слова:** ВИЧ – инфекция, полиморфизм CCR5 гена, гетерозиготные носители delta 32 CCR5

#### Введение.

Несмотря на беспрецедентные усилия мирового сообщества и многомиллиардные инвестиции, эпидемия ВИЧ – инфекции с ее высоким уровнем заболеваемости и смертности, все еще остается глобальной проблемой [1]. Против ВИЧ нет вакцины, а антиретровирусная терапия, бесспорно, являясь одним из важных достижений здравоохранения конца 20 века, не уничтожает вирус и имеет другие ограничения, что побуждает исследователей искать альтернативные подходы уничтожения вируса в организме ВИЧ – инфицированных лиц.

Одним из механизмов, посредством которого ВИЧ ослабляет иммунную систему, является инфицирование и разрушение «главной» клетки иммунитета - CD4 Т-лимфоцитов хэлперов - путём проникновения в эти клетки и встраивания ВИЧ ДНК в ДНК клетки. Это также является «пусковым» моментом пожизненного инфицирования. Для проникновения в клетку необходимо прикрепление гликопротеина вируса gp 120 к мембранным CD4 - рецепторам и CCR5 –ко-рецепторам клетки человека. Обнаружение хемокиновых ко-рецепторов в качестве необходимых структур для проникновения ВИЧ позволило в значительной степени рационализировать основу клеточного тропизма и лучше понять процесс проникновения вируса в различные клетки.

Одновременная экспрессия рецепторов CD4 и CCR5 встречается на Т-лимфоцитах, моноцитах, макрофагах и дендритных клетках. Белок CCR5 кодируется геном CCR5, расположенным на коротком плече хромосомы 3 в позиции 21 (3p21). Существует полиморфизм CCR5 delta 32, представляющий из себя делецию 32 пар нуклеотидов в кодирующей области гена CCR5. В результате экспрессии мутантного гена в гомозиготном состоянии транслируется укороченный, функционально неактивный белок CCR5.

CCR5 delta32 мутация играет важную роль в устойчивости к ВИЧ, delta 32/delta 32 гомозиготные носители этого полиморфизма устойчивы к ВИЧ-инфекции, а у гетерозиготных носителей этой мутации снижена восприимчивость к инфекции и отмечается более позднее начало СПИД [2]. Мутация CCR5 delta32 является хорошим примером благоприятного аллеля и характеризуется определёнными особенностями географического распределения. Распространение благоприятных аллелей имеет крайне важное значение для процесса эволюции, включая территориальное распределение адаптивных признаков, связанность/сплоченность видов и пространственную динамику совместной эволюции патогенных микроорганизмов и их хозяев. Мутация CCR5 delta32 обнаруживается в основном в Европе и Западной Азии, где средняя частота составляет примерно 10%, хотя частота меняется в пределах этого географического региона.

Гомозиготными носителями делеционного аллеля являются около 1% [3, 4], гетерозиготными – около 15% лиц белой расы. На территории России делеция CCR5 delta 32 встречается у лиц европейской расы, а также у представителей финно-угорской этнической группы, проживающей в Западной Сибири [5]. В РК подобные исследования не проводились.

ВИЧ лишь недавно появился в человеческой популяции, в то же время возраст аллеля Δ32, по оценкам, составляет от 700 до 3500 лет. Считается, что мутантный аллель CCR5 гена хемокинового рецептора произошёл от единственной мутации в доисторические времена и быстро распространился в популяциях белого населения, благодаря наличию неизвестного селективного преимущества. Так, аллель CCR5-D32 обнаружен в останках людей Бронзового века (возраст - около 3000 лет) из разных захоронений в центральной Германии и южной Италии [6].

Среди других возможных причин указывается, что возбудитель чумы, *Yersinia pestis*, мог быть потенциальным источником сильного селективного давления на популяции европейцев во времена средневековья. В то же время S. Hummel с соавторами [6] показали, что частота аллеля CCR5 Δ32 у жертв пандемии чумы 14-го века в Любеке / Северная Германия не отличалась от таковой у европейцев доисторических времен. Эти результаты свидетельствуют против возможности того, что чума была основным селективным фактором, вызвавшим быстрый рост частоты гена CCR5-Δ32 в этих популяциях [6].

Повышенный интерес к делеции CCR5 гена в качестве стратегии для генной терапии ВИЧ-1 инфекции появился из-за так называемого "Берлинского пациента". Этот человек –единственный ВИЧ – инфицированный, который был полностью излечен от ВИЧ-1 инфекции после пересадки стволовых клеток костного мозга от гомозиготного донора по мутации Δ32 гена CCR5 [7].

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) периферической крови была проведена в 2007 году в Германии этому пациенту с острым миелоидным лейкозом от донора, гомозиготного носителя полиморфизма CCR5 delta 32 после химио – и лучевой терапии [8, 9]. Однако, несмотря на успешность проведенного лечения, это был лишь единичный случай, и в последующем ни одной ТГСК для лечения ВИЧ-инфекции не было проведено

вследствие редкой встречаемости полиморфизма CCR5 delta 32 и строгими условиями подбора образцов костного мозга и периферической крови по системе HLA. В то же время гемопоэтические стволовые клетки пуповинной крови с генотипом CCR5 delta 32/delta 32 могли бы со значительно большей вероятностью быть использованы для проведения трансплантации при ВИЧ-инфекции в связи со значительно менее строгими требованиями подбора образца по системе HLA [10].

**Цель данного исследования** заключалась в анализе полиморфизма CCR-5 гена у ВИЧ-1 – инфицированных лиц разной этнической принадлежности г. Алматы для оценки прогноза течения инфекции.

**Материалы и методы.**

Было проведено поперечное исследование среди пациентов с ВИЧ, состоящих на диспансерном учете в ГЦ СПИД г. Алматы с января по декабрь 2015 г. Возраст участников исследования – от 18 лет и старше. Гендерных ограничений не было, участники включались в исследование, независимо от национальной принадлежности.

Данные из амбулаторных карт включали демографические, клинические характеристики, историю течения ВИЧ-инфекции, ко-инфекций, получаемые препараты/АРТ и лабораторные показатели.

История течения ВИЧ-инфекции: год заражения, факторы рискованного поведения (ЛУИН, МСМ, перинатальная трансмиссия, заражение при получении медицинской помощи, гетеросексуальный путь заражения и др.), уровень CD4 клеток на момент включения в исследование и самый низкий уровень этих клеток, ВИЧ РНК при диагностике, пик ВИЧ РНК, ВГС РНК, оппортунистические инфекции в анамнезе и в настоящее время.

Обеспечение соблюдения принципов научной этики. До включения в протокол исследования от каждого участника было получено информированное согласие на участие.

Лабораторные исследования. Больным проводилось комплексное обследование, общеклинические анализы крови и мочи, определялись основные показатели функционального состояния печени по данным биохимического анализа крови, исследование крови на маркеры ВИЧ и ВГС в ИФА, подсчет абсолютного количества CD4, CD8, CD3 клеток и соотношение CD4:CD8, ПЦР для определения ВИЧ РНК, ВГС РНК.

Для определения аллельного полиморфизма CCR5 delta 32 использовались следующие праймеры: F: TGTGTTTGGCTCTCTCCCA и R: CTCTTCTTCTCATTTTCGACACCG. ПЦР выполняли по следующей программе: 1) при 94°C в течение 5 мин; 2) 40 циклов, каждый из которых состоял из 3-х этапов: 94°C - 30 с, 53°C - 40 с, 72°C - 40 с; 3) Последний отжиг при 72°C - 10 мин и на 4°C. Детекцию полиморфизма осуществляли в 3% агарозном геле с применением горизонтального электрофореза. Наличие специфических ДНК-фрагментов определяли после электрофоретического разделения ПЦР - смеси с помощью транс иллюминатора. Длина ПЦР фрагментов составляет 224 п.н. при нормальном варианте гена и 192 п.н. при аллельном полиморфизме CCR5 Δ32 [11].

**Результаты исследований.**

102 образца ДНК ВИЧ – инфицированных пациентов были проанализированы на выявление мутаций CCR5▲32. Гетерозиготные мутации выявлены у 13 пациентов, что составляет 12,7% от общего числа исследуемых. Эти результаты приведены на рисунке 1А, 1В, 1С, 1D (w–дикий тип, h– гетерозигота, g – гомозигота по данному аллелю).

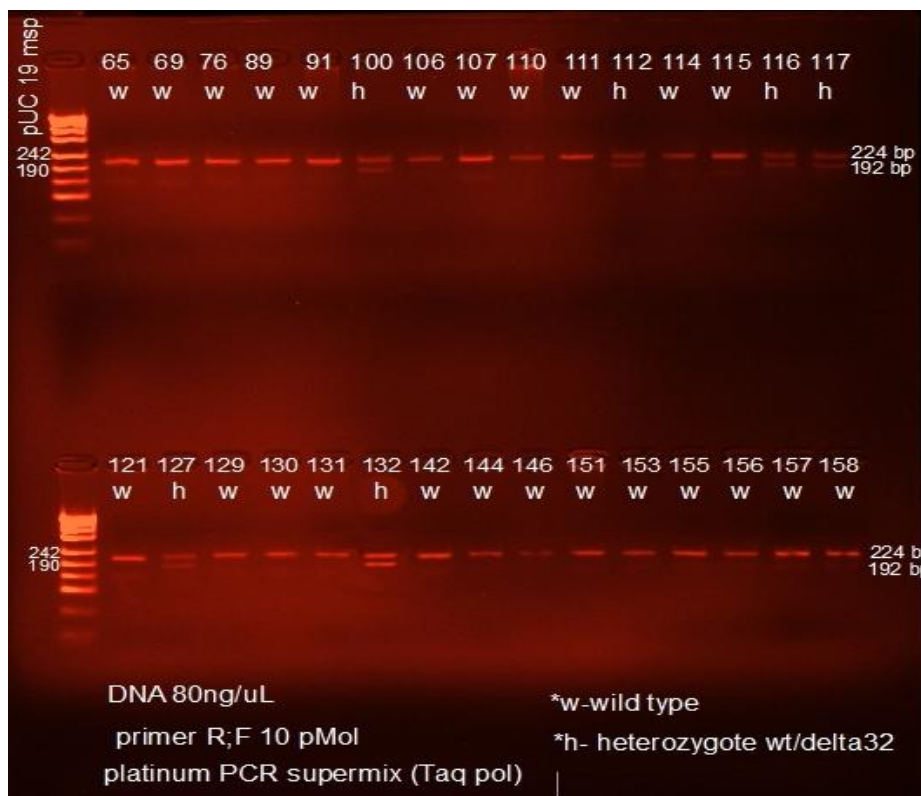


Рисунок 1 А

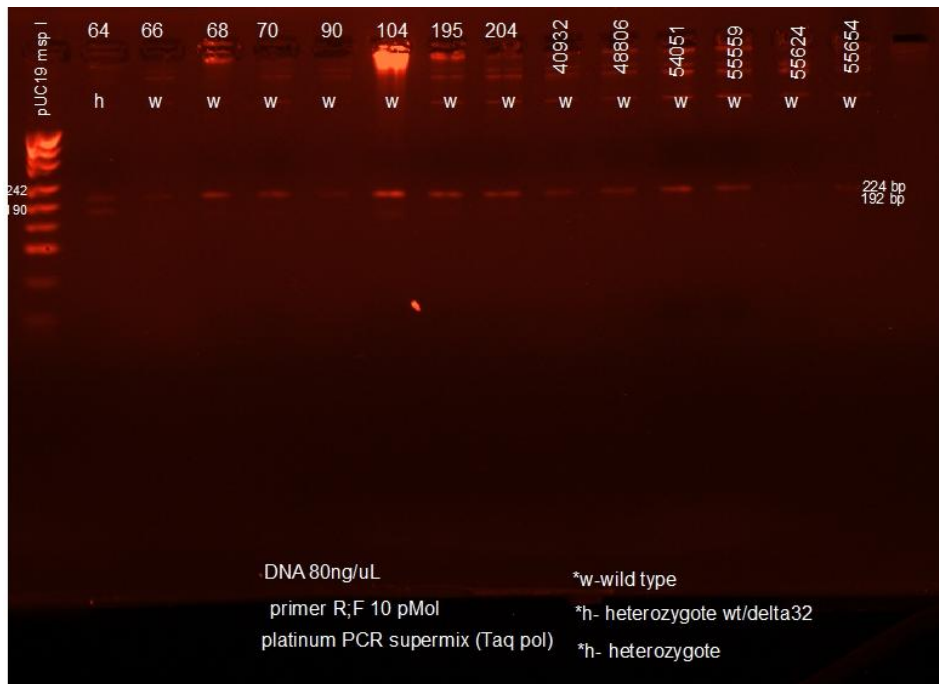


Рисунок 1B

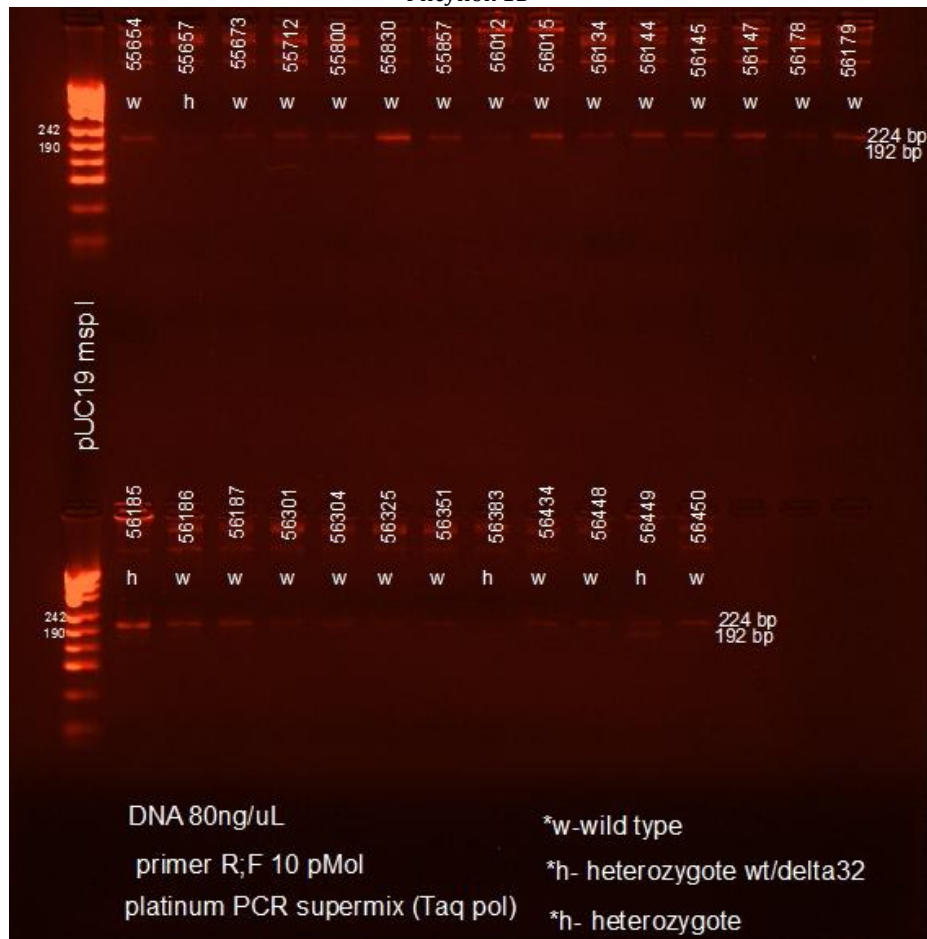


Рисунок 1C

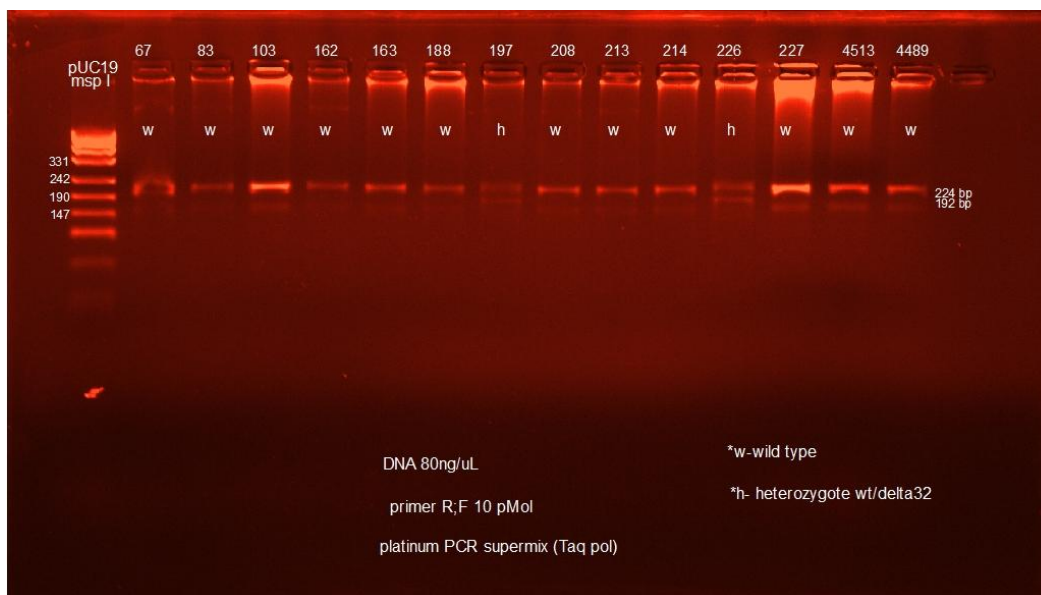


Рисунок 1D

Полученные результаты по выявлению носителей мутации CCR5 $\Delta$ 32 были подтверждены повторным исследованием всех мутантных образцов. Первые 5 образцов – контрольная группа, остальные – обнаруженные в процессе исследования гетерозиготные образцы (Рисунок 2).

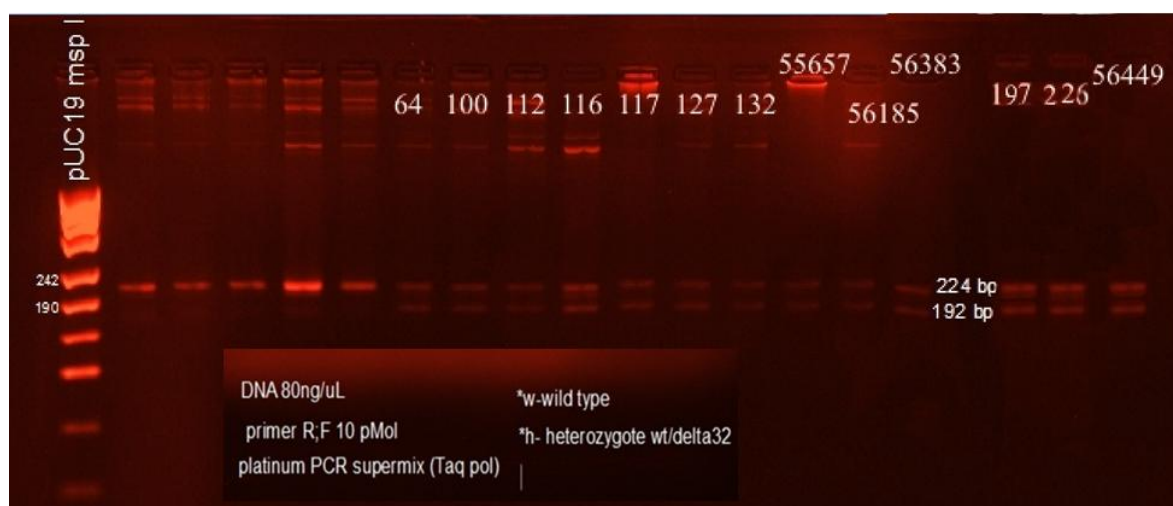


Рисунок 2 - Контрольные и мутантные образцы

Детальные данные по гетерозиготным пациентам представлены в таблице 1.

Таблица 1. Пациенты с гетерозиготной мутацией CCR5 $\Delta$ 32

№ №	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
код	55657	56383	53698	45023	54630	53213	50060	56185	51346	44838	54720	56449	42120
Пол	ж	ж	ж	м	м	м	м	ж	ж	ж	м	ж	м
Возраст	37	40	53	22	45	46	39	46	28	37	49	48	36
Нац-ть	КЗ*	РУ	РУ	РУ	РУ	РУ	РУ	РУ	РУ	Микс**	РУ	Микс****	РУ

ВГС	АРТ	Самооце к-важиз	CD4	ВН	Путь передачи	Год пост.- за
-	07.15	хорошее	338	1,2*10 <sup>5</sup>	Гетерос	07.15
отр	-	хорошее	414	3,7*10 <sup>4</sup>	Гетерос 109.1-бер	09.15
-	-	удовлет	-	-	Гетерос 124	01.15
+	-	плохое	520	-	МСМ 104??	08.12 2011***
+	-	плохое	242	3,0*10 <sup>4</sup>	п/энт 124	04.15 2010***
ВГС, ВГВ ЦМВ сиф	-	плохое	105 н. 67	9,0*10 <sup>4</sup>	ЛУИН	12.14 2005***
ВГС	-	плохое	596	-	ЛУИН	02.14 2010***
-	-	хорошее	432	-	Гетерос 113.4	08.15
-	-	хорошее	785	1,6*10 <sup>4</sup>	гетеросе	04.14
-	-	удовлет	441 325	-	Гетерос Донор кр	08.12 2010
+	+	удовл	333 227	1,7*10 <sup>5</sup>	ЛУИН	14.04.15
-	-	хорошее	644	-	гетеросекс	10.09.15
-	-	удовл	536 599	-	МСМ	06.10.11

\*Оба родителя – казахи

\*\*Мать – татарка, отец – русский

\*\*\*Считает себя инфицированным с ...

\*\*\*\* Мать – русская, отец - татарин

Как следует из таблицы 1, среди ВИЧ – инфицированных лиц, относившихся к русской этнической группе, гетерозиготными носителями Δ32 аллеля было 9 человек (11,8% из всех обследованных лиц)), среди лиц азиатского и смешанного этноса - 2 человека (по 1,3% из 76 обследованных).

60% пациентов с гетерозиготными мутациями инфицировались ВИЧ гетеросексуальным путем, 30% - парентеральным при инъекционном употреблении наркотиков, 10% - МСМ. Протективного эффекта мутации CCR5 Δ32 у гетерозиготных носителей ЛУИН (людей, употребляющих инъекционные наркотики) не отмечено. Течение ВИЧ – инфекции у них не отличалось от такового у остальных ЛУИН, что может подтверждать данные о том, что вирус у ЛУИН чаще имеет двойной тропизм CCR5 и CXCR4, что ассоциируется с более быстрым прогрессированием заболевания. При наличии дефектного CCR5 ко – рецептора вирус проникает в клетку, присоединяясь с CXCR4.

Лица с гетерозиготными аллелями, инфицированные гетеросексуальным путем (женщины), имели более благоприятное течение ВИЧ – инфекции с более низкой вирусной нагрузкой и более высоким числом CD4, чем контрольная группа без мутации этого гена.

**Заключение.** На основании полученных предварительных данных можно предположить, что среди ВИЧ – инфицированных лиц встречаются гетерозиготные носители аллеля CCR5 Δ32. Как ожидалось, ими, в основном, оказались лица славянской этнической группы. Вместе с тем, интересен факт обнаружения лиц не европейского этноса с гетерозиготными аллелями. Определенный защитный эффект данного аллеля проявлялся у ЛЖВ, инфицированных гетеросексуальным путем, но не ЛУИН. Количество наблюдений не позволяет сделать окончательные выводы, но научная значимость полученных результатов диктует необходимость продолжать исследования, тем более что на территории РК популяционная распространённость благоприятного CCR5 Δ32 аллеля, обладающего протективным действием в отношении ВИЧ, не изучалась. Планируется расширение популяционных исследований для изучения распространённости аллеля CCR5 Δ32 среди этносов, проживающих в Казахстане, в том числе ВИЧ –инфицированных лиц, также как изучение CCR5 и CXCR4 тропизма ВИЧ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Информационный бюллетень ЮНЭЙДС, 2014
- 2 Samson M. et al. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene // Nature. – 1996. - №382. – P. 722–725.
- 3 Deng H. et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 // Nature. – 1996. - Vol. 381. –P. 661-666.
- 4 Dragic T. et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5 // Nature. - 1996. - Vol. 381. – P. 667-673.
- 5 Yudin N.S., et al. Distribution of CCR5 delta 32 gene deletion across the Russian part of Eurasia // Hum Genet. – 1998. – 102. – P. 695-698.
- 6 Hummel S. et al. Detection of the CCR5-D32 HIV resistance gene in Bronze Age skeletons // Genes and Immunity. – 2005. - №6. – P. 371–374.
- 7 Hütter G. and Zaia J.A. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with human immunodeficiency virus: the experiences of more than 25 years // Clin. Exp. Immunol. – 2011. - №163. – P. 284–295
- 8 Hutter G. et al. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation // N. Engl. J. Med. - 2009. - Vol. 360. - P. 692-698.
- 9 Alters K. et al. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell // Blood. - 2011. - Vol. 117, №10. - P. 2791-2799.
- 10 Petz L.D. et al. Hematopoietic Cell Transplantation with Cord Blood for Cure of HIV Infections // Biol. Blood Marrow Transplant. - 2013. - Vol. 19. - №3. - P. 393-397.
- 11 Патент «Способ определения аллельного полиморфизма ccr5 delta 32» (RU 2563172)

**Ж.С. НУГМАНОВА, Н.О. НАКИСБЕКОВ, Г.М. АХМЕТОВА, Ш.М. НУРМОЛДИН, Н.Г. КОВТУНЕНКО,  
Г.С. КУРМАНГАЛИЕВА, Г.Р. КАЛЖАНБАЕВА, М.К. АБДУМАНАНОВА  
АЛМАТЫДАҒЫ АИТВ - ЖҰҚТЫРҒАН АДАМДАРДЫҢ CCR5 ГЕНІНІҢ ПОЛИМОРФИЗМІ**

**Түйін:** CCR5 генінің 32 н.ж. делециясы CD4 жасушаларының бетіндегі осы рецепторлардың ақауына әкеліп соғады. Бұл жасушаға АИТВ-ның бекінуін және кіруін болдырмайды. Ақ нәсілге жататын тұлғалардың 1% 32 Delta / Delta 32 гомозиготалы полиморфизміне ие және АИТВ-инфекциясы төзімді, ал еуропалықтардың 10-15% бұл мутацияның гетерозиготалы тасымалдаушылары болып табылады және оларда инфекцияға төзімділік пен ЖҚТБ кеш басталуы атап өтіледі.

Қазақстанда алғаш рет Алматы қаласы аумағында бұл CCR5 дельта 32 мутациясы аллел полиморфизмі таралуы мен оның АИТВ-ға қорғаныштық әсері зерттелді. CCR5 генінің гетерозиготалы тасымалдаушылары болып славян ұлт өкілдері табылды, науқастардың 12,7% гетерозиготалы ген полиморфизмі анықталды.

**Түйінді сөздер:** АИТВ - инфекция, CCR5 генінің полиморфизмі, CCR5 дельта 32 гетерозиготалы тасымалдаушылар.

**ZH.S. NUGMANOVA, N.O. NAKISBEKOV, G.M. AKHMETOVA, SH.M. NURMOLDIN, N.G. KOVTUNENKO,  
G.S. KURMANGALIYEVA, G.R. KALZHANBAEVA, M.K. ABDUMANANOVA  
CCR5 GENE POLYMORPHISM IN HIV – INFECTED PEOPLE IN ALMATY**

**Resume:** Deletion of 32 pairs of CCR5 gene leads to the appearance of this gene encoded a defective CCR5 - co-receptor on the surface of CD4 - cells. This prevents the attachment and entry of HIV into the cell. 1% of the individuals of the white race are homozygous carriers of 32 delta / delta 32 polymorphism and are resistant to HIV infection, 10 -15% are heterozygous carriers of this mutation and have reduced susceptibility to infection and AIDS appears later.

We were the first in Kazakhstan who studied the prevalence and possible protective effect of allelic polymorphism of CCR5 delta 32 mutation among HIV - infected persons in Almaty. Heterozygous CCR5 gene polymorphism carriers were mostly persons of Slavic ethnic group, heterozygous mutations were detected in 12.7% of patients.

**Keywords:** HIV - infection, CCR5 gene polymorphisms, heterozygous carriers of CCR5 delta 32