



УДК 587.828

© 2009

Н. С. Пукіш, А. М. Щербінська, І. Г. Будзанівська, В. П. Поліщук

## Філогенетичний аналіз українських ізолятів ВІЛ-1

(Представлено академіком НАН України Я. Б. Блюмом)

*Проведено визначення нуклеотидної послідовності гена *pol* ВІЛ-1 для 64 зразків плазми крові ВІЛ-інфікованих осіб у регіонах з високим рівнем поширеності ВІЛ-інфекції в Україні. Показано, що субтип В поступово витісняється не-В субтипами ВІЛ-1. Хоч субтипова структура ВІЛ-1 в Україні змінилася в порівнянні з ізолятами 2000 р., але в межах одного субтипу ізоляти залишаються досить спорідненими. Найближчими до українських ізолятів субтипу А виявились штами ВІЛ-1 з Казахстану, Чехії, Естонії, Росії, що мають тісні історичні зв'язки з Україною. Аналіз нуклеотидної послідовності зразків субтипу В, що виявились найбільш спорідненими до ізолятів із США та країн Західної Європи, дозволяє припустити, що субтип В був занесений в Україну саме з цих країн і ми фіксуємо залишковий факт попередньої циркуляції його в Україні.*

Вивчення молекулярних характеристик ізолятів ВІЛ-1 на сьогодні стало пріоритетним у дослідженні особливостей розвитку, перебігу та еволюції епідемії ВІЛ-1 у світі.

Дані про нуклеотидні послідовності ізолятів ВІЛ-1 дають можливість дослідникам оцінювати особливості накопичення мутацій та виникнення рекомбінацій у межах геному вірусу, що, у свою чергу, призводить до появи нових субтипів, рекомбінантних форм [1]. Завдяки масиву здобутої інформації про нуклеотидні послідовності ВІЛ створено певну номенклатурну систему для вірусу імунодефіциту людини, якою на сьогодні користуються в усьому світі [1, 2]. Крім цього, молекулярні дані дозволили з'ясувати походження ВІЛ, еволюції вірусу як у межах одного організму, так і на рівні популяції [3]. Дані про глобальне поширення різних субтипів та рекомбінантних форм і їх характеристика дають можливість науковцям прогнозувати майбутній перебіг епідемії та застосовувати коректні методи для попередження пандемії [1, 4].

Метою дослідження було вивчити молекулярні особливості ВІЛ-ізолятів у регіонах України з високим рівнем поширеності ВІЛ-інфекції, встановити і простежити їх спорідненість з відомими референсними штамами ВІЛ-1 та з усіма відомими на сьогодні ізолятами ВІЛ-1, що циркулюють у світі, для розуміння ролі України у світовому поширенні епідемії, а також проаналізувати зміну з часом субтипової та молекулярної структури епідемії ВІЛ-інфекції в Україні у визначених регіонах.

**Матеріали та методи.** Нами проведено визначення нуклеотидних послідовностей ВІЛ-1 у гені *pol* у 64 зразках крові, відібраних у регіонах Києва та Одеської обл. у 2006 р., у яких рівень поширеності ВІЛ-інфекції один з найвищих в Україні [5].

Виділення РНК ВІЛ-1, проведення зворотної транскрипції РНК, ампліфікація цільового фрагмента гена *pol* ВІЛ-1 та очищення отриманого ампліфікованого продукту виконували за допомогою тест-системи ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v2.0, Celera Diagnostics, США. Визначення нуклеотидних послідовностей проводили на автоматичному генетичному аналізаторі ABI PRISM® 3100-Genetic Analyzers, Applied BioSystems, США.

Визначення субтипів та виявлення найбільш споріднених до досліджених ізолятів референсних штамів ВІЛ-1 здійснювали за допомогою програми BioAfrica Rega HIV-1 Subtyping tool.

Підбір та виявлення найближчих за коефіцієнтом спорідненості відомих ізолятів ВІЛ-1 у Банку генів проводили за допомогою програми BLAST.

Зміни субтипової та молекулярної структури ізолятів ВІЛ-1, що циркулюють на території України, аналізували, порівнюючи виділені нами ізоляти ВІЛ-1 з ізолятами, отриманими у 2000 р. групою вчених (Банк генів, номери DQ 055196-DQ 055220 та DQ 055221-DQ 055242 для Києва та Одеської обл. відповідно) [6].

Вирівнювання отриманих послідовностей та побудову філогенетичних дерев проводили методом neighbor-joining за допомогою програмного забезпечення ClustalW.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Аналіз субтипової структури показав, що серед досліджених зразків ВІЛ-1 як з Києва, так і з Одеської обл. домінує субтип А. Серед 64 зразків тільки 4 зразки з Києва належать до В субтипу ВІЛ-1. Загалом найближчими до досліджуваних ізолятів виявились референсні штами субтипу А — A1\_UG85U455 та A1\_UG9292UG037, і субтипу В — В\_NL0067100T36 та В\_US90WEAU160. Проте, за даними аналізу отриманих філогенетичних дерев та визначення коефіцієнтів спорідненості між ізолятами та референсними штамми, коефіцієнт спорідненості до референсних штамів субтипу А для зразків з Києва становить в середньому 92–93%, тоді як для ізолятів з Одеської обл. — 89–91%. Зразки, що належать до субтипу В, мають коефіцієнт спорідненості з референтними штамми субтипу В 93–94%. Проте між собою досліджувані зразки виявляють менше відмінностей (коефіцієнт спорідненості становив в середньому 95–98%) та розташовуються двома основними кластерами на філогенетичному дереві для субтипу А та субтипу В для Києва та одним кластером для Одеської обл. (рис. 1).

Отримані результати дозволили нам припустити, що, можливо, у Банку генів наявні ізоляти ВІЛ-1, що є більш споріднені до українських ізолятів, ніж визначені референсні штами.

Тому наступним нашим кроком було виявлення ізолятів ВІЛ-1, що мають високі показники спорідненості до українських ізолятів. Встановлено, що досліджені нами зразки субтипу А мають найвищі коефіцієнти спорідненості до ізолятів ВІЛ-1 з Чеської республіки, Казахстану, Грузії, Росії та ізолятів з України, що були вивчені у попередніх дослідженнях (табл. 1). Для зразків субтипу В найбільш спорідненими є ізоляти з Бельгії (97%), США, Іспанії, Китаю, Австралії (95%).

Далі було проведено порівняння субтипової структури досліджених нами ізолятів ВІЛ-1 на території даних регіонів у 2006 р. із попередніми дослідженнями 2000 р. [6, 7]. Стає зрозумілим, що за цей період часу у визначених регіонах відбулась кардинальна зміна циркулюючих субтипів. Так, у дослідженнях 2000 р. до субтипу В належало більше 50% зразків (14 із 25 зразків) з Києва, тоді як серед зразків, виділених у 2006 р., — тільки 4 із 32 зразків

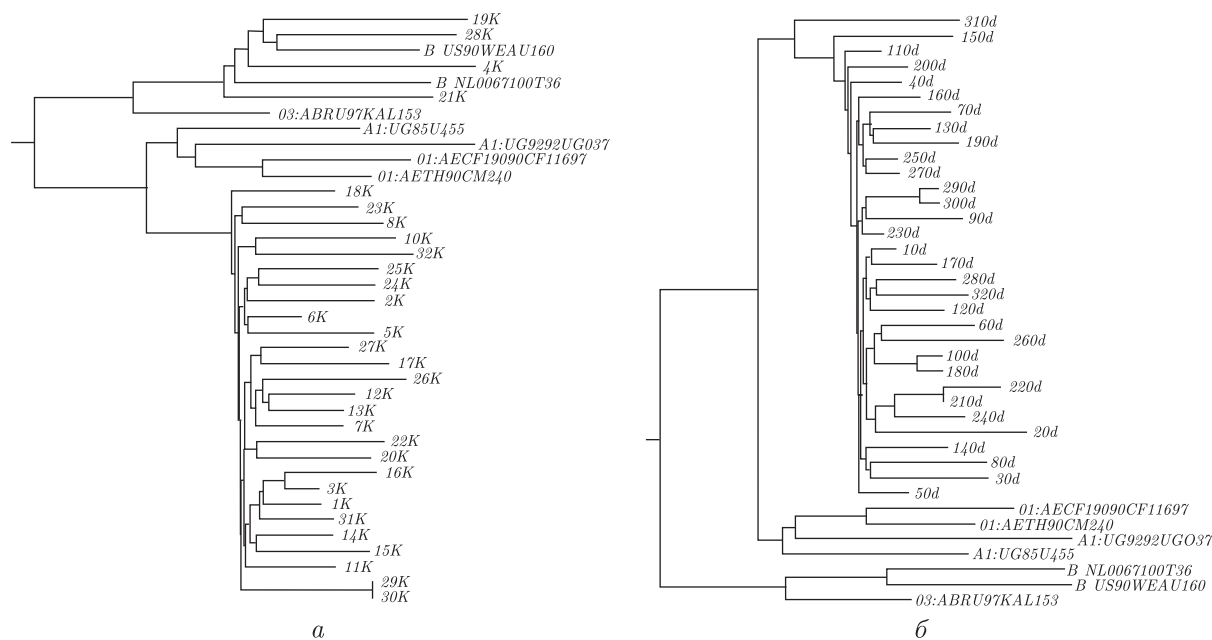


Рис. 1. Філогенетичний аналіз ізолятів з Києва (а) та Одеської обл. (б) за 2006 р.

(12,5%). В Одеській обл. у 2000 р. з 21 зразка виявлено 3 ізоляти, що належали до субтипу В, а при дослідженні ізолятів 2006 р. — жодного. Тому становило інтерес оцінити, наскільки споріднені між собою зразки, що циркулювали в різний час на території України. Зразки субтипу А і субтипу В з Києва, виділені у 2000 та 2006 рр., виявились досить спорідненими між собою та розташовувались у тих же кластерах субтипу А та субтипу В філогенетичного дерева (рис. 2, а), за винятком зразків 2000 р., що належали до субтипів С та D. Зразки ВІЛ-1 з Одеської обл. також виявились близькими за молекулярною структурою гена *pol* та розташовувались у межах одного кластера субтипу А філогенетичного дерева. Окремо розташовувались тільки зразки 2000 р. субтипу В (див. рис. 2, б).

Таблиця 1. Ізоляти ВІЛ-1 з Банку генів, що мають високі показники спорідненості до українських ізолятів

Номер доступу	Опис	Коефіцієнт спорідненості, %
EF589044.1	HIV-1 isolate 02KZPAV300502 from Kazakhstan nonfunctional gag protein (gag) gene, partial sequence; pol protein (pol) gene	97
DQ167216.1	HIV-1 isolate EST2002-394 from Estonia truncated gag protein (gag) gene, complete cds; pol protein (pol) gene, partial cds; vif	97
EF589043.1	HIV-1 isolate 02KZPAV300480 from Kazakhstan gag protein (gag)	97
DQ823365.1	HIV-1 strain 01UAOD10 from Ukraine, partial genome	97
DQ823359.1	HIV-1 strain 01UAPol293 from Ukraine, partial genome	97
AY694336.1	HIV-1 isolate 71264PL11 from Czech Republic pol protein (pol)	97
EU672610.1	HIV-1 isolate 72193PL19 from Czech Republic pol protein (pol) gene, partial cds	97
DQ823357.1	HIV-1 strain 01UADN139 from Ukraine, partial genome	97
AY829210.1	HIV-1 isolate 02UZ0663 from Uzbekistan gag protein (gag) and	97
DQ823367.1	HIV-1 strain 01UAOD89 from Ukraine, partial genome	97
EU345885.1	HIV-1 isolate RUJA31 from Russia pol protein (pol) gene	96
EU345744.1	HIV-1 isolate RU01037 from Russia pol protein (pol) gene	96



Рис. 2. Філогенетичний аналіз ізолятів з Києва (а) та Одеської обл. (б) за 2000 та 2006 рр.

У результаті проведеного нами молекулярного аналізу показано, що в регіонах України з високим рівнем поширеності ВІЛ-інфекції домінуючим субтипом ВІЛ-1 є субтип А. Порівнюючи отримані нами дані з результатами досліджень ізолятів 2000 р., можна припустити, що відбулась зміна субтипової структури ВІЛ-1 у визначених регіонах, субтип В поступово витісняється не-В субтипами ВІЛ-1. За даними УкрЦентру СНІДу [5], з кожним роком зростає частка населення України, інфікованих статевим шляхом, у порівнянні з інфікованими парентерально (38,2 та 40,5% відповідно за 6 міс. 2008 р.), що свідчить про поступовий перехід епідемії від концентрованої фази її розвитку до генералізованої. Відомо, що зміна даних фаз епідемії характеризується зміною субтипу В на не-В субтипи ВІЛ-1 [8], як це і було показано в наших порівняльних дослідженнях. Хоч субтипова структура ВІЛ-1 в Україні змінилася, проте в межах одного субтипу ізоляти залишаються досить спорідненими між собою. Цей висновок дозволяє припустити, що в межах України циркулює певна досить стабільна група ізолятів, близьких за молекулярними характеристиками. Крім цього, пошук споріднених ізолятів до досліджених нами показав, що найближчими до українських ізолятів субтипу А є штами з країн, що мають тісні історичні зв'язки з Україною та пов'язані з інтенсифікацією міграційних процесів. Оскільки субтип В був найбільш поширений у 1980–90-х рр. у США та країнах Західної Європи, можна припустити, що він був занесений в країну саме з цих країн і ми зараз фіксуємо залишковий факт попередньої циркуляції субтипу В в Україні.

1. Lal R. B., Charcabarti S. Ch. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy and vaccine development // Indian. J. Med. Res. – 2005. – **121**. – P. 287–314.
2. Leitner T., Korber B., Daniels M. et al. HIV-1 Subtype and Circulating Recombinant Form (CRF) Reference sequences // Theoretical biology and biophysics, Los Alamos national laboratory. – 2005. – P. 41–48.
3. Rambaut A., Posada D., Crandall K. A., Holmes E. C. The causes and consequences of HIV evolution // Nature Reviews. Genetics. – 2004. – **5**. – P. 52–61.
4. Pilcher C. D., Wong J. K., Pillai S. K. Inferring HIV transmission dynamics from phylogenetic sequence relationships // PLoS Medicine. – 2008. – **5**. – P. 350–352.
5. ВІЛ-інфекція в Україні. Інформаційний бюлетень № 29 / Міністерство охорони здоров'я України. – Київ, 2008.
6. Saad M., Shcherbinskaya A. et al. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Ukraine: birthplace of an epidemic // AIDS research and human retroviruses. – 2006. – **22**, No 8. – P. 709–714.
7. Nabatov A., Kravchenko O., Lyulchuk M., Shcherbinskaya A., Lukashov V. 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 // Ibid. – 2002. – **18**, No 12. – P. 891–895.
8. Subbarao H., Vanichseni S. et al. Frequency of HIV-1 dual subtype infections, including intersubtype infections, among injection drug users in Bangkok, Thailand // AIDS. – 2001. – **19**, No 3. – P. 570–575.

Київський національний університет  
ім. Тараса Шевченка  
Український центр профілактики  
та боротьби зі СНІДом, Київ

Надійшло до редакції 20.01.2009

**N. S. Pukish, A. M. Scherbynska, I. G. Budzanivs'ka, V. P. Polischuk**

### **A phyllogenetic analysis of the Ukrainian isolates HIV-1**

*The nucleotide sequence determination of pol gene was performed for 64 blood plasma samples from HIV infected persons in the high-level spreading of HIV infection regions in Ukraine. It was shown that subtype B of HIV is replaced step-by-step with non-B one. Though the subtype structure of HIV-1 has changed in comparison to the isolates of 2000 in Ukraine but, within one subtype, isolates remain affined enough. Suspected, there is one stable enough group of isolates circulating within Ukraine that have similar molecular characteristics. The most similar to Ukrainian subtype A isolates of HIV-1 are the ones from Kazakhstan, Czech Republic, Estonia, Russia which have close historical linkage with Ukraine. Analysis of subtype B isolates which is revealed to be the most close to the ones from USA and West Europe has shown that subtype B was transferred to Ukraine exactly from these countries, and we now just fix some residual effects of its previous circulation.*