

# Проблеми мінливості вірусу імунодефіциту людини

Н. В. Іванська, Т. Ю. Трохимчук

Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського АМН України  
Вул. Академіка Амосова, 5, Київ, 03038, Україна

*Огляд присвячено проблемі мінливості вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) та її епідеміологічному значенню. ВІЛ характеризується дуже високим рівнем мінливості. Мутаційна мінливість у самому лише гені env ВІЛ-1 десятикратно перевищує частоту мутацій, характерну для збудників грипу, який до останнього часу вважався наймінливішим. Знання з цієї проблеми допоможуть у подальшій роботі, пов'язаній з епідеміологічним контролем ВІЛ-інфекції і направленої на створення лікувальних і профілактичних вакцин та надійних діагностичних тест-систем, а також для підбору стратегії боротьби зі СНІДом.*

Вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) характеризується дуже високим рівнем мінливості. Мутаційна мінливість у самому лише гені env ВІЛ-1 десятикратно перевищує частоту мутацій, характерну для збудників грипу. За наявними підрахунками, у геномі ВІЛ за один цикл реплікації виникає 8—10 мутацій; при цьому виявлено, що частота мутацій у геномі ВІЛ-1 на один нуклеотид становить  $3 \cdot 10^{-5}$  [1, 2].

Явище мінливості мікроорганізмів відоме ще з часів Луї Пастера. Відтоді ця проблема широко вивчається і в теоретичній, і в практичній площині. Від моменту відкриття вірусів імунодефіциту людини наприкінці минулого століття їхня мінливість відразу ж стала об'єктом прискіпливої уваги фахівців у багатьох галузях — як теоретиків, так і клініцистів.

ВІЛ входить до окремої підродини лентівірусів, яка належить до родини ретровірусів, і йому притаманні структурні та репродуктивні особливості цих збудників. Отже, для ВІЛ характерний дуже досконалий апарат генетичного паразитизму та складна регуляція реплікативного циклу.

При вивченні мінливості ВІЛ застосовують ряд вірусологічних, генетичних, серологічних, біохімічних та молекулярно-біологічних підходів.

Нині повсякденними стали методи секвенування вірусних білків-антигенів (і окремих їхніх епітопів) та нуклеїнових кислот, тобто визначення послідовностей амінокислот і нуклеотидів. Знаючи

первинну структуру вірусоспецифічних білків та віріонних нуклеїнових кислот, можна прямо порівнювати гомологічні ділянки штамів та ізолятів вірусу, виявлених у осіб з груп ризику в різних країнах [3]. При відсутності достатньої для аналізу кількості нуклеїнового матеріалу (кДНК), особливо коли йдеться про старі зразки, які не завжди отримували та зберігали належним чином, вдаються до розмноження (ампліфікації) кДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції [4, 5].

Серед непрямих підходів, що застосовуються для визначення генотипів ВІЛ, найперспективнішим вважають метод порівняльної оцінки електрофоретичної рухливості фрагментів, утворених при гібридизації кДНК певних секвенованих ділянок нуклеотидних послідовностей, взятих від різних штамів чи різних ізолятів ВІЛ [6—10]. Цей підхід стає можливим після того, як у модельних дослідах встановлюють рухливість гетеродуплексів, що утворюються відповідними відомими фрагментами кДНК певних субтипів. Серед сучасних понять, які характеризують вірусні (та й бактеріальні) штами чи ізоляти, вже закріпилися поняття про субтип та серотип. При цьому субтипи будь-якого вірусу — це більші таксономічні одиниці, які містять ряд дрібніших одиниць — серотипів; різниця між серотипами досить незначна (часом вона виникає через появу однієї—двох точкових мутацій), тоді як субтипи одного вірусу відрізняються значно помітніше. Даний метод дає змогу визначити субтип ВІЛ-1 у 91—98 % випадків, коли зміна нуклеотидної послідовності геному ВІЛ збігається (корельює)

зі зміною його певного епітопа (чи епітопів) і, значить, його серотипу. Вивчення і порівняння послідовностей РНК (кДНК) різних штамів та ізолятів ВІЛ поглиблюються із застосуванням філогенетичних та кладистичних підходів [4]. Кладистичні підходи — це ряд теоретичних (обчислювальних і статистичних) методів, за допомогою яких встановлюється міра спорідненості геномів різних видів, підвидів, субтипів, серотипів тощо, а також міра спорідненості (гомології) різних білків, що виконують ту саму функцію (наприклад, гемоглобінів чи, скажімо, білків *Env* або *Gag* ВІЛ-1). Вони допомагають ретроспективно прослідкувати «родовід» (тобто виникнення, становлення та розвиток) епідемічно актуальних та епідемічно «другорядних, неважливих» штамів ВІЛ, простежити хід кладогенезу ВІЛ — такої його еволюції, коли у ході адаптивної реакції з даного відомого таксона утворюється вже декілька таксономічних груп, які лежать, однак, у межах одного певного рівня організації [11]. Для філогенетичного аналізу геномних та білкових послідовностей використано три підходи, а саме: метод мінімальної еволюції (*minimal evolution-neighbor joining approach*), метод найбільшої схожості (*maximum likelihood*) та метод зваженої парсимонії (*weighted parsimony*). Йдеться про теоретичні пошуки найкоротшого еволюційного шляху, що призводить до утворення нових форм з раніше наявних варіантів.

Суттєвий внесок у вивчення мінливості роблять також різноманітні серологічні методи дослідження, без яких неможливими були б розпізнавання вірусних серотипів і дослідження імунологічних властивостей аутологічних сироваток [12]. Першоосновою розвитку підходів, за допомогою яких визначають серотипи ВІЛ, став той факт, що навіть варіабельна ділянка петлі V3 антигену gp120 досить консервативна в межах одного серотипу. У різних же серотипів консенсусні амінокислотні послідовності відрізняються, а тому можна використовувати як реагенти відповідні «маркерні» пептиди при встановленні серотипу виділених ізолятів. Доступність синтезованих і секвенованих фрагментів геному ВІЛ-1 з петлі V3, наприклад, 17-членних полінуклеотидів P1 та P2 дає також змогу прямо визначати субтип ВІЛ за допомогою імуноферментного аналізу [10].

Встановлення серотипу на основі пептидів з петлі V3 антигену gp120 стало основним підходом при проведенні широкомасштабних сероепідеміологічних досліджень поширеності ВІЛ. Як відомо, петля V3 багато в чому визначає серологічні властивості (особливості нейтралізації) та біологічні риси ВІЛ. Наприклад, для встановлення серотипів

досліджуваних штамів ВІЛ Карамов і співавт. [13] використали 11 синтетичних пептидів; серед них структури p108, p109 і p110 імітують послідовності американо-європейських штамів, а пептиди p168, p169 і p170 — послідовності африканських варіантів з верхньої області петлі V3 антигену gp120 ВІЛ-1; пептиди pVII і pXII характерні для диких варіантів ВІЛ з клінічного осередку ВІЛ-1 субтипу G на півдні Росії; два пептиди — p108 і p1837 — відтворюють фрагменти консенсусу B-типу; пептиди p1838 і p1839 імітують послідовності з верхньої області петлі V3 антигену gp120 ВІЛ-1 субтипів E та B відповідно.

Пізніше виявилось, що через величезну мінливість ВІЛ при визначенні його серотипів не можна обмежуватися порівнянням лише антигенних детермінант, кодованих геном *env*. Доведено, що завдяки різноманітним механізмам, причетним до цієї мінливості, при встановленні серотипу слід використовувати також пептиди, кодовані геном *gag*, оскільки виявлено ізоляти змішаних серотипів. Щоб більше таких послідовностей використано, то повніше можна охарактеризувати новий ізолят, встановити його «предкові форми», найближчих його попередників, зрозуміти його походження та можливу роль в епідемічному процесі. На відміну від вивчення генотипів дослідження серотипів дозволяє швидко здійснювати широкомасштабний скринінг.

Слід зауважити, що зміна епітопів та втрата ними здатності до взаємодії з відповідними специфічними антитілами, виробленими проти «первинного», «початкового» вірусу, можуть бути обумовлені навіть поодиноким мутацією у гені даного вірусного білка. Ці зміни не обов'язково супроводжуються саме змінами первинної структури даного епітопа: вони можуть визначатися і мутацією, що виникла в достатньо віддаленій області, але вплинула на гнучкість та на укладку білкової молекули, тобто на її конформацію [14]. Зрозуміло, що зміна укладки білкової молекули може призводити до «випинання» (експонування) якогось досі закритого («потайного») епітопа або ж, навпаки, до приховування (прикриття) наявної антигенної детермінанти. Тому трапляється, що навіть досить значні серологічні відмінності між деякими штамми та ізолятами (втрата/приховування якогось епітопа або поява/випинання іншого, нового епітопа) не обов'язково обумовлені дуже серйозними мутаційними змінами в геномі. У такому випадку незначні мутації в геномі, які іноді виявляють при застосуванні саме серологічних підходів, можуть не визначатися за допомогою інших методів.

Вивчення здатності різних ізолятів і штамів до

розмноження у чутливих до ВІЛ перещеплюваних клітинах (клітинних лініях, established cell lines) та характер взаємодії їх із зараженими клітинами (цитопатична дія, тобто, по суті, фенотип ВІЛ, взаємодія вірусних часточок з рецепторами) теж мають істотне значення при дослідженні мінливості ВІЛ, бо це дає можливість паралельно з біохімічними, генетичними та молекулярно-біологічними даними отримати відомості про біологічні властивості штамів за різних умов їхнього вирощування. Завдяки підборіві та використанню чутливих ліній клітин [15] і певним прийомам, які призводять до активації персистентних ізолятів ВІЛ-1 [16—18], добиваються розмноження багатьох з них у культурі клітин та порівнюють інфекційну активність ізолятів, що належать до різних серотипів, особливості їхнього розмноження тощо. Останнім часом [19] з'явилися цікаві дані про мінливість такої ознаки, як «ставлення» вірусних часточок до клітинних корецепторів, що причетні до зараження клітинних ліній людини (U87.CD4 і GHOST(3)); ці лінії пов'язані з рецепторами CD4 і CCR1, CCR2b, CCR3, CCR5, CXCR4, CXCR6 або BOB. Як виявилось, часточки, виділені від хворих з різними клінічним станом та прогресуванням хвороби, неоднаково приєднуються *in vitro* до штучних химерних корецепторів, які містять певні ділянки CXCR4 і CCR5. Таким чином, наочно доведено мінливість ознаки, яку неможливо було виявити за допомогою описаних раніше підходів.

Зрозуміло, що через всебічну мінливість ВІЛ робота з перещеплюваними клітинами не завжди виправдовує надії інфекціоніста та епідеміолога.

Те ж зауваження справедливе для підходів, що передбачають визначення чутливості різних ізолятів ВІЛ до лікувальних препаратів, яке можна провести *in vitro*. Слід, однак, пам'ятати, що штам чи штами, виділені завдяки культивуванню їх поза організмом, можуть бути лише частиною (і, ймовірно, лише мізерною частиною) вірусної популяції; тоді випробування їхньої чутливості дуже мало допоможе при виборі хіміопрепарату та не гарантуватиме навіть тимчасового успіху терапії [20].

Все ж опрацьовані методичні підходи дозволили отримати цікаві дані щодо мінливості ВІЛ при розмноженні його в умовах організму та в культивованих клітинах, а також щодо змін генотипу і фенотипу (а, отже, і серотипу) ВІЛ під дією певних факторів.

Першоосновою спадкової мінливості організму є точкові мутації геному (у даному випадку — вірусної нуклеїнової кислоти), тобто заміни поодиноких нуклеотидів; деякі з них призводять потім до

заміни амінокислот у послідовностях вірусних білків. ВІЛ належать до РНК-вмісних вірусів. Давно відомо, що частота мутацій у РНК-геномних організмах вища в 100000 разів за таку в ДНК-геномах [21]. Основна обставина, що обумовлює дуже високу мінливість ВІЛ, як і мінливість інших відомих ретровірусів, — це відсутність у їхніх геномах механізмів корекції. Через це при функціонуванні вірусних ферментів (зворотної транскриптази, ендонуклеази) з'являються помилки, що спричиняють виникнення мутацій. У життєвому циклі ВІЛ є принаймні три стадії, на яких можуть відбуватися точкові мутації: зворотне зчитування інформації з геномної РНК на мінус-ланцюжок ДНК, синтез на ньому плюс-ланцюжка ДНК при утворенні провірусу і, нарешті, транскрипція РНК з провірусної ДНК. Точкові мутації не відбуваються рівномірно у всьому геномі ВІЛ, представленому характерною для ретровірусів лінійною цілісною (нефрагментованою) РНК. Беззастережно доведено прискорене виникнення точкових мутацій саме в генах, які кодують поверхневі вірусні антигени, особливо у гені *env*. Виникнення генетичних і, значить, серологічних варіантів ВІЛ обумовлюється, як уже згадувалося, головним чином, високою мінливістю його оболонкового гена *env* та регуляторних генів. Звідси випливає і величезна мінливість кодованих ними білків, що обумовлена дуже інтенсивним глікозилуванням та широкою варіабельністю деяких відрізків амінокислотних послідовностей, які чергуються з консервативними (принаймні, більш консервативними) послідовностями. Значення та роль обох цих типів послідовностей детально проаналізовано у багатьох оглядах [22—23]. У складі третьої варіабельної області знаходиться одна з найголовніших антигенних детермінант ВІЛ, яка взаємодіє з антитілами, що нейтралізують вірус (АНВ) [24]. При цьому найчастіше реєструється саме заміна гуаніну на аденін, так звана «гіпермутація GA27», характерна для представників підроду *Lentivirinae* [25]. Структура генів *gag* і *pol* значно більш консервативна та менш мінлива, хоча й тут не обходиться без мутаційних змін [26—28].

Мінливість ВІЛ не зводиться до самих лише точкових мутацій, що її започатковують, а додатково обумовлена низкою інших механізмів, давно і детально описаних для багатьох систем вірус-клітина. До таких механізмів належать рекомбінації, змішування фенотипів, модифікації вірусного геному, обумовлені клітиною-хазяїном [29].

Як доведено при детальному аналізі нуклеотидних послідовностей багатьох ізолятів, ВІЛ-1 та ВІЛ-2 теж виникли завдяки мінливості своїх прапопередників — інфекційних агентів, що викликають

імунодефіцит у шимпанзе та в нижчих мавп — мангабеїв і мандрилів [29]. ВІЛ-1 походить від шимпанзе, тобто від  $SIV_{CPZ}$ , а ВІЛ-2, менш вірулентний щодо розвитку спричинюваної хвороби, — від нижчих мавп. Штами ВІЛ-1 вперше потрапили до людських популяцій десь у 1920—1930 роках. Вважається, що три окремі групи ВІЛ-1 — О, М та N виникли від трьох початкових штамів  $SIV_{CPZ}$ , кожен з яких незалежно інфікував людину. До групи О (outlier, тобто «сторонніх», «осібних», «віддалених») входять штами ВІЛ-1, дивергентно віддалені від основної маси філогенетично споріднених штамів з групи М (major group, основної групи), до якої віднесено на сьогодні 10 субтипів (генотипів/серотипів А—К) (<http://id.medscape.com/Medscape/HIV/ClinicalMgmt/CM.v02/CM.v02-05.html>; <http://www.google.com.ua/search?q=cache:fdEheYAJ:www.retroconference.org/20>). Дуже правдоподібно [4], що М-штами, яким притаманна особливо висока частота еволюційної мінливості, ведуть своє походження від штаму ZR59, виявленого у пробі крові жителя Заїру, отриманій 1959 р. Знайдено велику спорідненість даного штаму з референтними варіантами субтипів В, D і F. Дивергенція вірусних штамів цих трьох субтипів у результаті їхньої репродуктивної ізоляції та, як наслідок, еволюційна мінливість ВІЛ-1 відбувалися у швидкому темпі протягом приблизно 40 років. Філогенетичний та кладистичний аналіз названих субтипів групи М доводить їхнє загальне походження та практично одночасний початок їхнього еволюційного розходження (так званого розгалуження, або кладогенезу) під дією поки ще невідомих чинників [30].

Повніший молекулярно-епідеміологічний і серологічний аналіз дозволяє встановити, наскільки широко представлені згадані гено- і серотипи в певних регіонах; у багатьох випадках чітко виявлено географічні кластери (скупчення) певних серотипів. Наприклад, до 1993 р. всі досліджені ізоляти Північної Америки та Європи належали до серотипу В, який знайшли також у Бразилії, Таїланді, Єгипті і Уганді. В деяких країнах Східної Європи виявлено ізоляти субтипів F, G, H та I, а в США — донедавна невідомі ізоляти субтипів А, D та E; подібні дані є й щодо низки західноєвропейських країн [30], де переважає субтип А. Проте обстеження, проведені серед інфікованих французьких донорів, свідчать, що 16 % ізолятів ВІЛ-1 належать до субтипу В. При дослідженнях, здійснених у Санкт-Петербурзі, де проклонували численні фрагменти варіантів ВІЛ-1, які циркулювали в колишньому Радянському Союзі, знайдено варіанти, що належать до серотипів А, В та G [5]. За нашими

даними, в Україні на сьогодні поширені, головним чином, субтипи А та С. Крім того, ізоляти субтипу С виявляють переважно на півдні та сході Африки, в центрі цього континенту і на західному узбережжі Індії, що узгоджується з даними про подібність штамів зі сходу Африки та індійських штамів. Взагалі ж африканські штами належать принаймні до чотирьох субтипів ([31], <http://www.google.com.ua/search?q=cache:aa0GKe0o2YMJ:www.cdc.gov/ncidod/eid/v>). Останнім часом (<http://www.google.com.ua/search?q=cache:aa0GKe0o2YMJ:www.cdc.gov/ncidod/eid/v>) в Африці їх описано ще більше, принаймні, у центральній частині цього материка. Тут спостерігається велике розмаїття серотипів (принаймні, виявлено серотипи групи М від А до Е та інфекції, спричинені вірусом групи О), що вказує на гетерогенну природу епідемії, тобто початкове її виникнення з багатьох витоків. Крім того, знайдено сироватки, що реагують з пептидами не лише якогось одного субтипу.

Цікаво, що дані, отримані при секвенуванні наймінливішої ділянки вірусного геному — петлі V3, доводять, що ця ділянка найбільше змінюється у варіантів серотипу D, трохи менше — у серотипів А та В, а найменше варіює у серотипу С. Наприклад, бразильські штами серотипу С [32] дуже близькі між собою (утворюють монофілетичну групу), хоча й відрізняються від штамів цього серотипу з інших країн.

Слід зауважити, що подолання міжвидових бар'єрів та здатність окремих мутантних форм, присутніх у початковій гетерогенній вірусній популяції, виживати за умов різко відмінного біотопу, в клітинах «невластивого» хазяїна і, отже, розширювати коло хазяїв притаманні також іншим представникам ретровірусів. Можна навести ще один приклад передачі та адаптації ретровірусу від мавп до людини — появу Т-клітинного лімфотропного вірусу людини HTLV-1 [33]. Подібні випадки відомі і для птахів; чітко встановлено формування нових вірусів саркоми птахів при трансдукції протоонкогену *src* та адаптації до неспецифічного хазяїна; зокрема, без особливих труднощів вдалося адаптувати патогенний для курей вірус саркоми Рауса до качиних клітин [34, 35].

Як вказує Цілінський [21], «у вірусів генетична структура виду... визначається дією двох факторів — репродуктивною ізоляцією окремих клонів та популяцій і час від часу — генетичним обміном між ними... Генетичний обмін у вірусів здійснюється за допомогою різних механізмів, неоднакових як за своєю природою, так і за своєю ефективністю». До таких загальних механізмів належать рекомбінації вірусних РНК шляхом вибір-

кового копіювання зі зміною матриці, перерозподіл фрагментів геному, рекомбінації між молекулами (провірусних) ДНК (кросинговер).

Через своєрідний механізм розмноження ретровірусів та особливості їхньої взаємодії з інфікованими клітинами, зокрема, завдяки інтеграції вірусного та клітинного геномів протягом латентного періоду ВІЛ-інфекції мутантні провіруси накопичуються в різних клітинах ураженого організму.

Таким чином, створюється величезний запас різноманітних провірусів, які «переховуються» в клітинах від знищення під дією різноманітних оборонних механізмів хазяїна. У такий спосіб деякі варіанти ВІЛ виживають, незважаючи на тиск численних факторів відбору, направлених на їхню елімінацію. Вивчення процесів взаємодії ВІЛ з клітинами різного походження виявило значну здатність цього збудника до персистенції за умов *in vitro* та *in vivo* [36—38].

Найновіші дослідження доводять, що в одній ВІЛ-інфікованої особи (а це особливо стосується людей з груп підвищеного ризику зараження) можуть переживати два чи більше варіантів групи М (і не самої тільки групи М) (<http://www.google.com.ua/search?q=cache:fdEheYAJ:w.retroconference.org/20>), які належать до різних серотипів і, можливо, потрапили до однієї особи завдяки більш як одному інфікуванню. Звичайно ж, внаслідок співіснування декількох варіантів в одній інфікованій клітині там виникають численні рекомбінантні форми. Високу частоту рекомбінацій у ретровірусів виявлено в багатьох дослідженнях.

Вже досить давно Робертсон і співавт. [39], детально проаналізувавши геноми різних штамів ВІЛ-1, наявних у Міжнародній базі даних, довели, що приблизно 10 % усіх вірусних геномів, для яких відомі нуклеотидні послідовності, мають так звану мозаїчну структуру. Ці дані, надзвичайно важливі для розуміння патогенезу ВІЛ-інфекції та для опрацювання профілактичних і лікувальних вакцин, свідчать, що одночасне зараження клітин дивергентними штамми ВІЛ-1 — не таке вже й рідкісне явище (див., наприклад, <http://www.google.com.ua/search?q=cache:fdEheYAJ:www.retroconference.org/20>, [40]). Мозаїчні послідовності містять фрагменти, які належать до різних субтипів ВІЛ-1. Вони виявляються у геномі ВІЛ-1 все частіше й частіше; отже, частота рекомбінацій серед штамів ВІЛ-1 — це ще один суттєвий чинник мінливості збудника, притаманної йому як представникові ретровірусів. Наприклад, філогенетичний аналіз повних нуклеотидних послідовностей гена *env* для штамів ВІЛ-1, поширених у Бразилії, не лише доводить присутність там усіх відомих субтипів

групи М, але й виявляє міжсеротипні варіанти рекомбінантних вірусів типу F/B. У результаті повного секвенування нуклеотидних послідовностей багатьох варіантів, які, згідно з даними аналізу петель V3—V5 гена *env*, віднесено до серотипу E, та трьох варіантів, які увійшли до серотипу G, виявлено, що 3'-кінцеві нуклеотиди згаданих варіантів (ці нуклеотиди відповідають за послідовності білка gp41) належать до субтипу A. Філогенетичний аналіз свідчить, що варіанти субтипу E, які несуть послідовності Agag, можна й доцільно об'єднати у підсубтип АВ, який істотно відрізняється від «звичного» А-серотипу [30].

Останнім часом [32] у Бразилії описано рекомбінантні штами субтипів С та В. Серед ізолятів, отриманих у Таїланді, донедавна переважав серотип E та подекуди траплявся серотип В (точніше, тайландський варіант цього субтипу — ВВ). Але внаслідок рекомбінацій, які відбуваються між послідовностями нуклеотидів, що кодують ділянки p24Gag і p17Gag, давно виникли субтипові варіанти EnvB/GagC, EnvA/CGag, EnvD/GagA і EnvE/GagA [6]. Пізніше (2003 р.) у Таїланді знаходили форми — нащадки трьох початкових предкових штамів ВІЛ-1 — CRF01\_AE, ВВ та С [40], причому 15,3 % з них являли собою дуже різноманітні комбінації трьох наявних субтипів.

Нові форми вірусу з невідомими властивостями можуть виникнути також при подвійній інфекції внаслідок взаємодії штамів, які належать до груп М та О; такі випадки вже описано, наприклад, у північно-західній частині Камеруну (<http://www.google.com.ua/search?q=cache:fdEheYAJ:www.retroconference.org/20>). Йдеться, таким чином, про міжсубтипні рекомбінанти, що за певних умов матимуть селективні переваги над батьківськими штамми; дослідники [40] вважають, що такі вірусні часточки — це «псевдотипні структури» (*pseudotype virion structures*).

Цікаво, що останнім часом при кладистичних дослідженнях та визначенні серотипів ВІЛ за епідеміологічним маркером править також ген *nef*; аналіз молекулярної структури із застосуванням цього маркера підтвердив, що більшість ВІЛ-інфікованих у Південній Кореї несуть віруси субтипу В, хоча там зустрічаються також субтипи А та D; більшість вивчених послідовностей субтипу В об'єднується у монофілетичний клад [41, 42]. Інші, дещо «новіші» епідеміологічні маркери — послідовності зворотної транскриптази та гена *pol* [43, 44].

Дослідження сироваток 1993—2000 рр. із застосуванням цих маркерів показало, що у Люксембурзі, починаючи з 1990 р., зростає відсоток осіб, уражених не-В-субтипами ВІЛ. У 2000 р. вони

складала 20,1 % усіх ВІЛ-інфікованих, що дев'ятиразово перевищує долю таких осіб десять років тому.

Підсумовуючи наявні літературні дані та результати власних досліджень, Бобков і співавт. [46—49] роблять висновок, що в основі рекомбінації у ВІЛ лежить процес зміни матриці при зворотній транскрипції; такий процес відбувається з дуже високою частотою завдяки наявності не однієї, а двох РНК-копій вірусного геному в кожній клітині.

Як чітко й обірунтовано доводять Гао і співавт. [8], цілком можливим є утворення нових штамів та підтипів завдяки рекомбінаціям між різними мутантами при співіснуванні їх в одній зараженій клітині; беззаперечно, що такі умови сприяють виникненню нових варіантів ВІЛ. Яскравий тому приклад, який підтверджує цю думку, — молекулярна характеристика штамів, що обумовили в 1996 р. епідемію ВІЛ-інфекції у Калінінградській області РФ [3, 47—48]. Виявилось, що епідемію викликав вірус, який є рекомбінантною формою між представниками двох генетичних підтипів — А та В (GagA/EnvB). У даному випадку ген *gag* виявився гомологічним даному гену субтипу А з Одеси, тоді як ген *env* — гомологічним однойменному гену ВІЛ-1 субтипу В, знайденому в Миколаєві.

Отже, молекулярно-епідеміологічні дані свідчать про те, що предкові форми калінінградського штаму походять з півдня України, а саме — з Одеси і Миколаєва; на цей штам припадає 25 % усіх випадків ВІЛ-інфекції в Росії. Дані Бобкова і співавт. [43, 45] переконливо доводять, що нині половина всіх випадків ВІЛ-інфекції в Росії спричинена генетично близькими варіантами субтипу А. Разом з тим у трьох досліджених осередках інфекції на території РФ (у Твері, Ростові-на-Дону і Краснодарському краї) виявлено високий рівень субтипної гомогенності: всі 433 досліджених ізоляти належали до субтипу EnvA [10].

Цікаво розглянути деякі аспекти мінливості ВІЛ на різних етапах ВІЛ-інфекції. Численні літературні дані (зокрема, [15]) свідчать, що близькі, споріднені варіанти одного серотипу виділяються звичайно від епідемічно пов'язаних між собою осіб. Найбільша подібність спостерігається, як правило, між ВІЛ-ізолятами, отриманими від однієї особи на різних стадіях розвитку хвороби. Більшу різницю виявляють, порівнюючи ізоляти, одержані від конкретної зараженої особи та від її сексуальних партнерів (або ж від декількох осіб, що заразилися, користуючись тим самим шприцом при введенні наркотиків) [49].

Потрапивши у людські клітини різних типів, один і той самий генетичний варіант ВІЛ еволюціонує по-різному. Наприклад, ізоляти ВІЛ-1, виділені з крові та із спинномозкової рідини на різних етапах інфекції, проявляють значно вираженішу генетичну схожість; на пізніх же стадіях вони більше відрізняються один від одного навіть у того самого хворого [15, 50]. Порівнюючи біологічні та антигенні особливості ізолятів ВІЛ-1, виділених з тканин центральної нервової системи, з ізолятами, отриманими з периферичної крові та лімфатичних вузлів, дослідники виявили значні розбіжності щодо їхніх властивостей. Зокрема, спостерігалася відносна нездатність варіантів, виділених з мозкової тканини, інфікувати перещеплювані Т-клітини, а також знижена патогенність цих варіантів, їхня неспроможність модулювати експресію молекул CD4 на поверхні заражених клітин, їхнє активне розмноження в макрофагах та нечутливість до нейтралізації сироватками крові [51].

При високій подібності ізолятів, виділених від різних осіб в одній географічній зоні, є підстави говорити про недавнє та швидке поширення хвороби з одного джерела [31]. Як правило, високий рівень віремії та порівняно незначний ступінь генетичної мінливості призводять до розповсюдження консервативних вірусних генотипів на перших етапах поширення ВІЛ [48]. Вивчення вірусних ізолятів, виділених на стадії первинної віремії до того, як настає сероконверсія, доводить, що в цей час вірусна популяція генетично гомогенна в традиційно мінливих ділянках вірусного геному, а саме — у доменах V3 та V4 гена *env*, і гетерогенна — в традиційно консервативному гені *gag* [52]. Сероконверсія, яка виникає після віремії, супроводжується тим, що вірус набуває здатності «ухилитися» від зв'язування з антитілами; цьому сприяє мінливість наймутабельніших, особливо варіабельних ділянок вірусного геному, тобто доменів V3—V5 у гені *env* [31, 53—55].

Що довше триває ВІЛ-інфекція в одному організмі та в різних організмах, то різноманітнішою стає вірусна популяція та наявні в ній вірусні варіанти завдяки прискоренню еволюційних подій та втручанню різноманітних, не завжди ще вивчених механізмів [4]. Звертає на себе увагу цікавий факт, що відносно низька мінливість початкового варіанта ВІЛ-1 спостерігається у тих хворих, у яких розвиток інфекції прискорений. У цих випадках кінцеві ізоляти за своїми серологічними особливостями дуже нагадують початковий штам, що викликав інфекцію (<http://id.medscape.com/Medscape/HIV/ClinicalMgmt/CM.v02/CM.v02-05.html>) і

виявився, очевидно, високовірулентним для інфікованих осіб. При прискореному розвитку хвороби такі ізоляти «не мають часу» для мінливості; уражений організм виснажується та гине швидше, ніж еволюціонує збудник. При більш звичному та уповільненому розвитку хвороби безперервно наростає гетерогенність вірусної популяції в ураженому організмі; таке явище спостерігають вже в перші роки після зараження. Мутації та наступний відбір нових варіантів проходять в організмі конкретного хворого; вірус, виділений від носія через тривалий час після зараження, має вже значно змінену антигенну структуру [56]. Частота виникнення мутацій залежить, напевне, від серотипної належності та від особливостей штаму, що викликав зараження, а також від селективного тиску, обумовленого особливостями імунної системи кожної людини.

Вже йшлося про те, що зараження іншого хазяїна так само супроводжується змінами антигенної структури білків, особливо оболонкових; тому в багатьох випадках ізоляти ВІЛ, отримані від різних носіїв, дуже відрізняються між собою за антигенними властивостями, зберігаючи лише незначну гомологію в гені *env*. Для клінічної діагностики важливо враховувати ту обставину, що при перенесенні якогось ізоляту ВІЛ до клітин іншого типу (для вірусу це означає зміну біотопу) може статися, що наявні умови спричинять селективну перевагу не основного вірусного компонента, присутнього у вірусній популяції, що вразила клітини (в інокулюмі), а якогось менш численого (мінорного) компонента, так званого мінорного квазівиду [57].

Завдяки своїй непересічній генетичній варіабельності ВІЛ знаходить для себе найрізноманітніші можливості забезпечення життєздатності в ураженому організмі людини. Цьому сприяють широкий набір клітин-мішеней у різних органах та тканинах, що можуть служити джерелом вірусу, наявність метаболітів і біологічно активних речовин, які впливають на активність експресії ВІЛ, синергізм з іншими вірусами і бактеріями при змішаних інфекціях [17, 58, 59]. Висока еволюційна мінливість штамів ВІЛ, а також велика швидкість їхнього розмноження — це два базових чинники, які обумовлюють постійну присутність вірусних варіантів одного субтипу в кожному інфікованому організмі. В результаті виникають нові вірусні субпопуляції з різними антигенними властивостями та великою здатністю пристосовуватися до існування в нових популяціях клітин.

Висока генетична мінливість і здатність ВІЛ розмножуватися чи не в усіх органах та тканинах

організму (так звана пантропність ВІЛ) призводять до величезної різноманітності його біологічних властивостей та клінічних проявів спричинюваної хвороби.

Виявлено, що для різних молекулярних клонів ВІЛ-1, які відрізняються за областю V3, а також для природних ізолятів ВІЛ-1 субтипу В, перещеплюваних на клітинах моноцито-макрофагального типу або на Т-клітинних культурах, спостерігається кореляція між клітинним тропізмом, швидкістю репродукції, рівнем цитопатогенності, здатністю викликати утворення синцитіїв та кількістю позитивно заряджених амінокислотних залишків у межах V3-петлі антигену gp120 ВІЛ-1. Аналогічний корелятивний взаємозв'язок між амінокислотою послідовністю в області V3 та здатністю утворювати синцитії при зараженні культивованих клітин знайдено на ранній, ще доклінічній стадії ВІЛ-інфекції, викликаній субтипами А-Е. Як показано, більшість досліджених варіантів, що належать до субтипів А, В, С та Е, ще неспроможні відразу ж після сероконверсії утворювати синцитії. Більшість ізолятів субтипу D синцитії утворюють. Наявні дані про особливості ВІЛ-ізолятів, які отримано від безсимптомних хворих та від осіб з тяжкими клінічними проявами СНІДу, доводять, що в першому випадку найчастіше вдається виділити низькоінфекційні ізоляти ВІЛ, а в другому — ізоляти з високою інфекційною активністю [18, 60—61]. Ще не з'ясовано, які саме чинники визначають такі закономірності виділення ізолятів ВІЛ на різних стадіях інфекції. Виявлено, однак, що в різних органах і системах інфікованого організму (імунній системі, центральній нервовій системі, шлунково-кишковому тракті) відбувається формування гетерогенної популяції ВІЛ; до неї входять часточки вірусу, які розмножуються швидко і повільно, утворюють чи не утворюють синцитіїв, розмножуються переважно в моноцитах чи в лімфоцитах, є або не є цитопатогенними; при цьому, як правило, переважає один із субтипів ВІЛ.

Як показала Барбашева [18], для 15 % ізолятів ВІЛ, виділених в Україні протягом 1991—1994 рр., властива висока інфекційність; при зараженні клітин вони спричиняють швидкий розвиток інфекції (фенотип *rapid/high* за узгодженою міжнародною термінологією). У той же час 85 % виділених тут же ізолятів були мало заразними (тобто належать до фенотипу *low/slow*) і викликали уповільнену інфекцію, яка не супроводжувалася утворенням синцитіїв (фенотип *NSI*). За даними експертів ВОЗ [12], ізоляти з фенотипом *low/slow* належать до генетичного субтипу В.

Отже, будь-який клінічний ізолят ВІЛ являє

собою суміш квазівидів [57, 61—66]. Після виділення ВІЛ з організму та перенесення його в культуру чутливих клітин там також відбувається інтенсивна рекомбінація між різноманітними геномами. Дослідження, в яких визначали послідовності нуклеотидів у геномах отриманих вірусних варіантів та початкового вірусу, продемонстрували виражену різницю між ними. Як показано, відмінності щодо складу та послідовності нуклеотидів у геномі вірусних часточок даного ізоляту ВІЛ-1 можуть доходити до 25 %. У численних публікаціях стверджується, що квазівиди, наявні у будь-якому ізоляті ВІЛ, відрізняються за своїм клітинним тропізмом і за реплікативною активністю в умовах *in vitro* [67—69].

Відомо, що накопичення мутацій у геномі ВІЛ в інфікованому організмі проходить значно швидше, ніж у заражених вірусом клітинах, культивованих поза організмом [25], оскільки в організмі умови розвитку інфекції значно різноманітніші. Вірусні часточки потрапляють у відмінні між собою біотопи (різні типи органів і клітин), де за неоднакових умов клітинного оточення отримують селективні переваги різні квазівиди. Тому трапляється, що при культивуванні клінічних ізолятів ВІЛ-1 генетичний субтип вірусу, який був в організмі якогось хворого мінорним компонентом, тобто лише незначною домішкою на тлі іншого чи інших типів часточок, стає *in vitro* доміантним і беззастережно витісняє початковий варіант [70].

Деякі наявні літературні дані свідчать про певний взаємозв'язок між характером розвитку вірусної інфекції («мірою її злоякісності») та серотипом ВІЛ-1. Виявлено взагалі близьку кореляцію між фенотипом ВІЛ-1 (а вірулентність вірусу є одним з маркерів його фенотипу) та молекулярною структурою третього варіабельного домену (петлі V3) [74]. Наприклад, показано, що при ураженні вірусом серотипу С, D чи G хвороба прогресує значно повільніше, ніж при інфікуванні вірусом, який належить до серотипів А чи Е. Проаналізувавши численні експериментальні дані, Полянова [30] дійшла висновку про зв'язок серотипу із здатністю ВІЛ-1 розпізнавати певні рецептори на певних типах клітин в інфікованому організмі. Вірусні штами, які не викликають утворення синцитіїв, менш активні та менш заразні, ніж штами, що призводять до злиття інфікованих клітин. Поява вірусних ізолятів, які викликають утворення синцитіїв після інфікування субтипом В, свідчить про те, що хвороба наблизилася до кінцевої стадії. При зараженні ВІЛ-1 субтипу Е виявлено появу синцитіїв на ранній, ще доклінічній стадії інфекції. Для субтипу С не описано варіантів, які виклика-

ють появу синцитіїв. Однак деякі авторитетні клініцисти [20] взагалі заперечують якийсь очевидний, добре помітний взаємозв'язок між серотипом вірусу, яким інфіковано хворого, та клінічними проявами хвороби, хоча є докази існування дефектних штамів, що нібито не викликають розвитку хвороби.

Дослідження, які стосуються вертикальної передачі ВІЛ-інфекції від матері до плоду, так само доводять важливість серотипних особливостей ВІЛ. Є дані [30], що клітини Лангерганса значно чутливіші до ВІЛ-1 субтипу Е порівняно з варіантами субтипів D чи В і ця обставина підвищує ймовірність їхньої вертикальної передачі та частоту зараження при гетеросексуальних контактах. Проте більшість дослідників вважають, що перехід вірусу через плаценту залежить не так від субтипу ВІЛ, як від дуже багатьох інших чинників — типу імунної системи, основних видів хемо- та циторецепторів, антитіл материнського організму тощо.

Окремо слід згадати про прискорену мінливість ВІЛ у зв'язку з впливом на розмноження вірусу штучних, неприродних чинників — застосуванням хімотерапевтичних препаратів у клініці. Як завжди в таких випадках, відбувається відбір вірусних мутантів (ізолятів, квазівидів), стійких до відповідних застосовуваних сполук [20, 42, 44, 72]. Тому фахівці-клініцисти наголошують на необхідності раннього застосування комбінацій різних протівірусних препаратів, щоб запобігти появі нових, уже стійких мутантів ВІЛ. Поруч з монотерапією, поширеною до 1994 р., коли застосовували лише якийсь один з аномальних нуклеозидних аналогів, нині використовують також нові, менш токсичні препарати ненуклеозидної природи — інгібітори зворотної транскриптази та інгібітори протеаз; звичайно при лікуванні використовують не менш як два аналоги нуклеозидів та один інгібітор [73]. На жаль, однак, завдяки вже згаданій дуже високій мінливості ВІЛ цей підхід теж призводить (з незначним лише запізненням) до відбору стійких варіантів та до появи вірусу з новими біологічними властивостями, якому вже не шкодять застосовувані речовини. Отже, вдається лиш дещо уповільнити цей процес, але не остаточно його зупинити.

З точки зору клініцистів, мінливість ВІЛ і встановлення вірусних серотипів мають першорядне значення з огляду на створення протівірусних вакцин, зокрема, вакцин на основі ДНК. Зрозуміло, що застосування лікувальних вакцин проти ВІЛ стає доцільним лише після визначення серотипу вірусу, яким інфіковано хворого [74—77].

Таким чином, розглянувши основні літературні відомості щодо мінливості ВІЛ та її епідеміоло-

гічного значення, можна сказати, що значні труднощі при розпізнаванні вірусів, які викликають у людини стан імунодефіциту і в кінцевому підсумку призводять до СНІД-асоційованого комплексу та до СНІДу, пов'язані з біологічно обумовленою стратегією вірусного геному. Цю стратегію спрямовано на те, щоб перебороти механізми, еволюційно набуті макроорганізмом для захисту від різних патогенів, у тому числі й вірусів. Через постійну дію «антихазайських» вірусних механізмів змінюються, перш за все, вірусні епітопи на поверхні віріонів. Молекулярно-біологічні та генетичні дослідження [8, 78—80] доводять існування величезної кількості субтип-специфічних відмінностей, які проявляються в клінічних особливостях хвороби, викликаній окремими ізолятами ВІЛ-1 та ВІЛ-2; звісно ж, ці відмінності беззастережно впливають і на антигенні особливості збудників СНІД.

Коротко підсумовуючи викладені вище дані з проблеми мінливості ВІЛ, можна стверджувати, що отримані результати досліджень допоможуть у подальшій роботі, пов'язаній з епідеміологічним контролем ВІЛ-інфекції і направленої на створення лікувальних і профілактичних засобів та надійних діагностичних тест-систем.

N. V. Ivans'ka, T. Yu. Trokhimchuk

The problems of variability of the human immunodeficiency virus

#### Summary

This review deals with variability of the human immunodeficiency virus (HIV) and the epidemiological consequences of such variability. The level of the HIV variability is extremely high. For example, the mutation frequency determined for the HIV gene *env* is ten times higher comparing to the variability of the influenza virus which had been thought to be the most variable before investigations carried on the HIV variability. The information concerning the HIV variability problem is useful for studies on epidemiological control of the HIV-infection and the choice of anti-AIDS strategy; the data obtained are also necessary to construct therapeutic and preventive vaccines as well as reliable diagnostic test-systems.

H. B. Иванская, Т. Ю. Трохимчук

Проблемы изменчивости вируса иммунодефицита человека

#### Резюме

Обзор посвящен проблемам изменчивости вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и ее эпидемиологическому значению. ВИЧ характеризуется очень высоким уровнем изменчивости. Мутационная изменчивость в самом только гене *env* ВИЧ-1 в десятки раз выше частоты мутаций, характерных для возбудителя гриппа, считавшегося до последнего времени наиболее вариабельным. Знание этой проблемы поможет в работе, связанной с эпидемиологическим контролем ВИЧ-инфекции и направленной на создание лечебных и профилактических вакцин и надежных диагностических тест-систем, а также для выбора стратегии борьбы со СПИДом.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Saag M. S., Hahn B. N., Gibbons G. Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 *in vivo* // Nature.—1998.—334, N 6181.—P. 440—444.
2. Mansky L. M., Temin H. M. Lower *in vivo* mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase // J. Virol.—1995.—69.—P. 5087—5094.
3. Кевлова Н., Лишсола К., Смольская Т., Коровина Г., Маркевич Н., Ташикина И. П. Продолжение исследований по молекулярной характеристике штаммов, обусловивших эпидемию ВИЧ-инфекции в Калининградской области // Рус. журн. ВИЧ/СПИД и родств. проблемы.—2000.—4, № 1.—С. 63—64.
4. Tuofu-Zhu, Korber B. T., Nahmias A. J. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemics // Nature.—1998.—391, N 6667.—P. 594—597.
5. Машарский А. Е., Хабатов А. А., Веревоцкий С. В., Мурашев Б. В., Козлов А. П. Клонирование фрагментов генома вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в странах бывшего СССР, для создания вакцины против ВИЧ // Рус. журн. ВИЧ/СПИД и родств. проблемы.—2000.—4, № 1.—С. 25—26.
6. Delwart E. L., Shpaer E. G., Louwagie J. Genetic relationships determined by DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 *Env* genes // Science.—1993.—262, N 5137.—P. 1257—1261.
7. Хаитов Р. М., Игнатъева Г. А. СПИД.—М.: НАКИОЦ, 1992.—352 с.
8. Gao F., Yue L., Robertson D. L. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology // J. Virol.—1994.—68, N 11.—P. 7433—7447.
9. Казеннова Е. В., Бобков А. Ф., Селимова Л. М., Ханина Т. А., Покровский В. В., Хейндрикс Л., ван дер Гроен Г. Анализ субтипов гена *Gag* вариантов ВИЧ1, выделенных в России, методом сравнительной электрофоретической подвижности дуплексов // Вопр. вирусологии.—2001.—№ 3.—С. 12—16.
10. Bobkova M. R., Kazennova E. V., Selimova L. M., Buravtsova E. V., Lister S., Prilipov A. G., Weber J. N., Pokrovsky V. V., Bobkov A. F. Serological approaches to subtyping of HIV-1 in injecting drug users in Russia: evidence of subtype homogeneity at the main sites of the epidemic // Int. J. STD and AIDS.—2001.—12.—P. 34—40.
11. Реймерс Н. Ф. Популярный биологический словарь.—М.: Наука, 1991.—216 с.
12. Anopoulos. WHO network for HIV isolation and characterization. HIV type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: genetic screening, sequence analysis, and preliminary biological characterization of selected virus strains // AIDS Res. Hum. Retrovirus.—1994.—10.—P. 1327—1343.
13. Карамов Э. В., Щелкунов М. Ю., Юдин А. Н., Горбачева А. П., Бурунова В. В., Славский А. А., Лукашов В. В., Ярославцева Н. Г. Молекулярно-эпидемиологические особенности вариантов ВИЧ-1, циркулирующих среди шприцевых наркоманов на территории СНГ // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.—1999.—№ 1.—С. 39—41.
14. Комиссаренко С. В. Иммунологическое распознавание антигенных детерминант белков и пептидов // Укр. биохим. журн.—1985.—57, № 5.—С. 50—62.
15. Пашкова Т. А., Ярославцева Н. Г., Щелканов М. Ю. Биологические свойства первичных изолятов ВИЧ-1 раз-

- личных серотипов // *Вопр. вирусологии.*—1998.—№ 6.—С. 256—260.
16. Носик Д. Н. Создание коллекции вирусов иммунодефицита человека, циркулирующих на территории Российской Федерации: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.—М., 1992.—79 с.
  17. Баринский И. Ф., Носик Д. Н., Кальнов С. Л. Активация репродукции вирусов при смешанной инфекции вирусом иммунодефицита человека и герпесвирусами // *Вопр. вирусологии.*—1994.—№ 5.—С. 223—226.
  18. Барбашева Е. В. Изучение биологических свойств вирусов иммунодефицита первого типа, выделенных в Украине: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.—Киев, 1997.—18 с.
  19. Karisson I., Antonsson L., Shi Yu, Karisson A., Albert J., Leitner Th., Olde B., Owman Ch., Fenyo E. M. HIV biological variability unveiled: frequent isolations and chimeric receptors reveal unprecedented variation of coreceptor use // *AIDS.*—2003.—17, N 18.—P. 2561—2569.
  20. Покровский В. В., Ермак Т. Н., Беляева В. В., Юрин О. Г. ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика и лечение.—М.: Гэотар Медицина, 2000.—489 с.
  21. Цилинский Я. Я. Популяционная структура и эволюция вирусов.—М.: Медицина, 1988.—240 с.
  22. Букринская А. Г. Вирусы иммунодефицита человека: дополнение к авторскому тексту // *Эволюция вирусов / Под ред. В. М. Жданова.*—М.: Медицина, 1988.—С. 225—237.
  23. Antoni B. A., Stein S. B., Rabson A. B. Regulation of human immunodeficiency virus: implications for pathogenesis // *Adv. Virus. Res.*—1994.—43.—P. 53—145.
  24. Javaherian K., Langlois A., McDanal C. Principal neutralization domain of the HIV-1 envelope protein // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1989.—86.—P. 6768—6772.
  25. Levy J. A. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection // *Microbiol. Revs.*—1993.—57.—P. 183—289.
  26. Fisher A. G., Ensoli B., Looney D. Biologically diverse molecular variants within a single HIV-1 isolate // *Nature.*—1988.—234, N 6182.—P. 444—447.
  27. Terwilliget E. F., Langhoff E., Haseltine W. Characterization of HIV-1 accessory regulatory gene effects upon virus replication in primary cell population // *J. Cell. Biochem.*—1992.—Suppl. 16E.—P. 57.
  28. Rubsamen-Waigmann H., von Briesen H., Holmes H. Standard conditions of virus isolation reveal biological variability of HIV type 1 in different regions of the world // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*—1994.—10.—P. 1401—1408.
  29. Букринская А. Г., Жданов В. М. Молекулярные основы патогенности вирусов.—М.: Медицина, 1991.—256 с.
  30. Полянова М. Генетичного різноманіття при вірусній інфекції HIV — основна проблема при створенні успішної вакцини // *Інфектологія.*—1999.—36, № 4.—С. 3—8.
  31. Delwart E. L., Herring B., Rodrigo A. G. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay // *PCR Methods and Applications.*—1995.—4, N 5, Suppl.—P. S202—S216.
  32. Soares M. A., de Oliveira T., Brindeiro R. M., Diaz R. S., Sabino E. C., Brigido L., Pites I. L., Morgado M. G., Dantas M. C., Berreira D., Teixeira P. R., Cassol Sh., Tanuri A. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brasil // *AIDS.*—2003.—17, N 1.—P. 11—21.
  33. Gessain A., Mahieux R. Un virus appelle HTLV-1: aspects epidemiologiques // *Presse Med.*—2000.—29, N 40.—P. 2233—2239.
  34. Hlozaneck I., Rynditch A. V., Mikhailik A. Role of replaced *v-src* and *env* genes in the duck-adapted variant of Rous sarcoma virus // *Folia Biol.*—1993.—39, N 4.—P. 203—210.
  35. Михайлик А. А. Формування нових вірусів саркоми птахів при трансдукції протоонкогену *src* і адаптації до неспецифічного хазяїна: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.—Київ, 1994.—26 с.
  36. Popovic M., Read-Connole T., Gartner S. Biological properties of HTLV-III/LAV: a possible pathway on natural infection *in vivo* // *Ann. Inst. Pasteur.*—1986.—137d, N 3.—P. 413—417.
  37. Селимова Л. М., Ключник С. Ю. Сравнение двух Т-лимфоидных клеточных линий, персистентно инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-1), с различной продуктивной способностью // *Вопр. вирусологии.*—1991.—№ 4.—С. 277—281.
  38. Poffenberger K. L., Riordan L., Lee S. Persistent HIV-1 (MN) infection of mammary epithelial cells *in vitro* // *J. Cell. Biochem.*—1993.—Suppl. 17A.—P. 36.
  39. Robertson D. L., Sharp P. M., McCutchan F. E., Hahn B. H. Recombination in HIV-1 // *Nature.*—1995.—374, N 6518.—P. 124—126.
  40. Takebe Yu., Motomura K., Tatsumi M., Lwin H. H., Zaw M., Kusagawa Sh. High prevalence of diverse forms of HIV-1 intersubtype recombinants in Central Myanmar: geographical hot spot of extensive recombination // *AIDS.*—17, N 14.—P. 2077—2087.
  41. Oh M. D., Cho K. Epidemiology of HIV infection in the Republic of Korea // *J. Korean Med. Sci.*—1999.—14.—P. 469—474.
  42. Chang K. H. Characteristics of HIV infection/AIDS in Korea // *AIDS DNA Vaccine Conf. and Workshop: Perspectives of the Preventive and Therapeutic HIV-1 Vaccines.*—New York, 2002.—P. 128.
  43. Бобков А. Ф., Казеннова Е. В., Селимова Л. М., Момот О. Ф., Ладная Н. Н., Бобкова М. Р., Покровский В. В. Рекомбинантные вирусы иммунодефицита человека // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.*—1999.—№ 1.—С. 45—47.
  44. Deroo S., Robert I., Fontaine E., Lambert Ch., Plessier J.-M., Arendt V., Staub Th., Hemmler R., Schneider Fr., Schmit J.-C. HIV-1 subtypes in Luxemburg, 1983-2000 // *AIDS.*—2002.—16, N 18.—P. 2461—2467.
  45. Бобков А. Ф., Казеннова Е. В., Селимова Л. М., Ладная Н. Н., Бобкова М. Р., Кравченко А. В., Покровский В. В. Субтипы ВИЧ-1 в России в 1987—1998 гг. // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.*—1999.—№ 1.—P. 43—45.
  46. Бобков А. Ф., Покровский В. В., Селимова Л. М., Ладная Н. Н., Казеннова Е. В., Бобкова М. Р., Ханина Т. А., Кравченко А. В., Юрин О. Г., Саухат С. Р., Зверев С. Я., Федотов Э. А., Момот О. Ф., Колесник А. Н., Переходченко Е. Н., Чейнсонг-Попов Р., Вебер Д. Генетическая характеристика вариантов вируса иммунодефицита человека 1-го типа, вызвавших эпидемию среди наркоманов в странах СНГ // *Вопр. вирусологии.*—1998.—№ 6.—С. 253—256.
  47. Козлов А. П. ВИЧ в России, в Белоруссии и на Украине // *Рус. журн. ВИЧ/СПИД и родст. проблемы.*—2000.—4, № 1.—С. 11—14.
  48. Коровина Г. И., Смольская Т. Т., Ташкинова И. П., Момот О. Ф., Кевлова Н. А., Лишисла К., Лейнишки П., Салминен М. Рекомбинантный штамм ВИЧ-1, вызвавший эпидемию среди инъекционных наркоманов в Калининграде // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.*—1999.—№ 1.—С. 47—49.
  49. Keys B., Karis L., Fadeel B. V3 sequences of paired HIV-1 isolates from blood and cerebrospinal fluid cluster according to host show variation related to clinical stage of disease // *Virology.*—1993.—196, N 2.—P. 475—483.

50. *Monken C. E., Wu B., Srinivasan A.* High resolution analysis of HIV-1 quasispecies in the brain // *AIDS*.—1995.—9, N 4.—P. 345—349.
51. *Cheng-Mayer C., Weiss C., Seto D.* Isolates of human immunodeficiency virus type 1 from the brain may constitute a special group of the AIDS virus // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1989.—86, N 21.—P. 8575—8579.
52. *Zhang L. Q., MacKenzie P., Cleland A.* Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection // *Virology*.—1993.—67, N 6.—P. 3345—3356.
53. *Гапарев М. М.* Закономерности изменчивости основной нейтрализующей доминанты вируса иммунодефицита человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—М., 1993.—48 с.
54. *Gomez-Carillo M., Piccardo C., Libonatti O.* Molecular analysis of the principal neutralization epitope (V3 loop) of human immunodeficiency virus type 1 in Argentina // *Rev. argent. microbiol.*—1992.—24, N 2.—P. 91—101.
55. *Zwart G., Wolfs T. F., Bookelman R.* Greater diversity of the HIV V3 neutralization domain in Tanzania compared with the Netherlands: serological and genetic analysis // *AIDS*.—1993.—7, N 4.—P. 467—474.
56. *Tersmette M., Gruters R., de Wolf F.* Evidence for a role of virulent HIV variant in the pathogenesis of AIDS: studies on sequential HIV isolates // *J. Virol.*—1989.—63.—P. 2119—2125.
57. *Wain-Hobson S.* Human immunodeficiency virus type 1 quasispecies *in vivo* and *ex vivo* // *Curr. Top. Microbiol. and Immunol.*—1992.—176.—P. 181—196.
58. *Sapalo L. A., Lopez-Gomez M.* De la infección por HIV al SIDA: mecanismos inmunobiológicos // *Med. Clin.*—1994.—103, N 12.—P. 454—457.
59. *Roulston A., Lin R., Beauparlant P.* Regulation of human immunodeficiency virus type 1 and cytokine gene expression in myeloid cells by NF- $\kappa$ B/Rel transcription factor // *Microbiol. Revs.*—1995.—59, N 3.—P. 481—505.
60. *Носик Д. Н., Бочкова М. С., Киселева И. А.* Методические рекомендации по выделению вирусов иммунодефицита человека от ВИЧ-инфицированных лиц и больных СПИДом // *Методы исследования в молекуляр., общ. и мед. вирусологии: Тр. Ин-та вирусологии им. Д. И. Иванковского*.—М., 1992.—С. 170—179.
61. *Cheng-Mayer C., Quiroga M., Tung G. W.* Viral determinants of HIV-1 T-cell- macrophage tropism, cytopathicity, and CD4 antigen modulation // *J. Virol.*—1990.—64.—P. 4390—4398.
62. *Goodnow M., Huet T., Saurin W.* HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions // *AIDS*.—1989.—2, N 4.—P. 344—352.
63. *Meyerhans A., Cheyner R., Albert J.* Temporal fluctuations in HIV quasispecies *in vivo* are not reflected by sequential HIV isolates // *Cell*.—1989.—58, N 5.—P. 901—910.
64. *Holland J. J., De La Torre J. C., Steinhauer D. A.* RNA virus population as quasispecies // *Curr. Top. Microbiol. and Immunol.*—1992.—172.—P. 1—20.
65. *Connor R. I., Notermans D. W., Mohri H.* Biological cloning of functionally diverse quasispecies of HIV-1 // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*.—1993.—9, N 5.—P. 541—546.
66. *Sharp P. M., Robertson D. L., Gao F.* Origins and diversity of human immunodeficiency virus // *AIDS*.—1994.—8.—P. 527—542.
67. *Fredriksson R., Stalhanske P., von Gegerfelt A.* Biological characterization of infectious molecular clones derived from a human immunodeficiency virus type 1 isolate with rapid/high replicative capacity // *Virology*.—1991.—181, N 1.—P. 55—61.
68. *Shioda T., Oka S., Ida S.* A naturally occurring single basic amino acid substitution in the V3 region of the human immunodeficiency virus type 1 *env* protein alters the cellular host range and antigenic structure of the virus // *J. Virol.*—1994.—68, N 12.—P. 7689—7696.
69. *Poss M., Martin H. L., Kreiss J. K.* Diversity in virus populations from genital secretions and peripheral blood of women recently infected with immunodeficiency virus type 1 // *J. Virol.*—1995.—69, N 12.—P. 8118—8122.
70. *Andersson B., Gibbs R. A.* Examination of HIV-1 proviral sequence diversity using denaturing gradient gel electrophoresis reveals dominant forms within patient samples // *J. Cell. Biochem.*—1993.—Suppl. 17E.—P. 73.
71. *Bou-Habib D. Ch., Rodriguez G., Oravec T.* Cryptic nature of envelope V3 regions epitopes protects primary monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization // *J. Virol.*—1994.—68, N 9.—P. 6006—6013.
72. *Покровский В. В.* Эпидемиология и профилактика ВИЧ-инфекции и СПИД.—М.: Медицина, 1996.—248 с.
73. *Bushman F., Landau N. R., Emilio E. A.* New developments in the biology and treatment of HIV // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1998.—95.—P. 11041—11042.
74. *Мурашев Б. В., Романович А. Э., Мурашова И. В., Машарский А. Э., Климов Н. А., Козлов А. П.* Создание, контроль и биологические испытания ДНК-вакцин // *Рус. журн. ВИЧ/СПИД и родств. проблемы*.—2000.—4, № 1.—С. 26—27.
75. *Antonyak S.* Report on the pilot study with DNA vaccine (GX-1, GX-12) in 20 HIV-infected subjects to investigate efficacy and safety in combination with HAART // *AIDS DNA Vaccine Conf. and Workshop: Perspectives of the Preventive and Therapeutic HIV-1 Vaccines*.—New York, 2002.—P. 135—136.
76. *Oliynyk I.* Pilot study with DNA-vaccines (GX-1, GX-1a and GX-12) in 20 HIV-infected subjects to investigate efficacy and safety in combination with HAART therapy GB-203 // *AIDS DNA Vaccine Conf. and Workshop: Perspectives of the Preventive and Therapeutic HIV-1 Vaccines*.—New York, 2002.—P. 138.
77. *Eum S.-Y.* Therapeutic vaccination with DNA priming and adenovirus boosting strategy in chronically HIV-infected chimpanzee // *AIDS DNA Vaccine Conf. and Workshop: Perspectives of the Preventive and Therapeutic HIV-1 Vaccines*.—New York, 2002.—P. 18.
78. *Alizon M., Wain-Hobson S., Montagnier L., Sonigo P.* Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients // *Cell*.—1986.—46, N 1.—P. 6374—6385.
79. *Korber B., Brander Ch., Haynes B., Moore J., Koup R., Walker B., Watkins D.* HIV molecular immunology database.—Los Alamos: Nat. Lab. Publ., 1999.—352 p.
80. *Castro B. A., Barnett S. W., Evans L. A.* Biological heterogeneity of human I immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) strains // *Virology*.—1990.—178, N 2.—P. 527—534.