

ФГБУ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»
СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
МЕДИЦИНСКИХ НАУК

На правах рукописи

ДЕМЕНТЬЕВА

Наталья Евгеньевна

**КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И КАЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
СУБПОПУЛЯЦИЙ ВИЧ
В КРОВИ И СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ**

03.02.02 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель: академик РАН, доктор медицинских наук, профессор

Н.А.Беляков

Научный консультант: доктор биологических наук М.Р.Бобкова

Санкт-Петербург

2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Оглавление.....	2
Введение.....	4
Глава 1. Современный взгляд на вопросы патогенеза, диагностики и лечения ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС (обзор литературы)..	12
1.1. Патогенез ВИЧ-инфекции.....	12
1.2. Генетическая гетерогенность ВИЧ	15
1.3. Лекарственная устойчивость ВИЧ.....	18
1.4. Оценка вирусной нагрузки ВИЧ в различных тканях и биологических жидкостях инфицированного организма	20
1.5. Патогенез ВИЧ-инфекции в центральной нервной системе	24
1.6. Клинические проявления ВИЧ-обусловленного поражения центральной нервной системы.....	35
1.7. Вирусологические исследования спинномозговой жидкости	37
1.8. Влияние антиретровирусной терапии на глубину ВИЧ-ассоциированного поражения центральной нервной системы	40
Глава 2. Материалы и методы исследования	45
2.1. Материалы исследования.....	45
2.3. Методы исследования	48
Глава 3. Результаты определения количества CD4 ⁺ -лимфоцитов в крови, вирусной нагрузки и генотипирования ВИЧ при исследовании парных образцов крови и спинномозговой жидкости.....	57
3.1. Результаты определения изучаемых показателей в обследуемой группе ВИЧ-инфицированных пациентов.....	57
3.2. Вирусная нагрузка ВИЧ в спинномозговой жидкости на фоне высокоактивной антиретровирусной терапии	60
3.3. Анализ взаимосвязи между исследуемыми показателями, продолжительностью и стадией заболевания ВИЧ-инфекцией.....	62

Глава 4. Исследование парных образцов крови и спинномозговой жидкости у больных с ВИЧ-ассоциированными неврологическими расстройствами.....	66
4.1. Изучение взаимосвязи между наличием ВИЧ-ассоциированного поражения центральной нервной системы и субтипом ВИЧ, количеством CD4 ⁺ -лимфоцитов в крови, уровнем вирусной нагрузки ВИЧ в плазме крови и спинномозговой жидкости.....	66
4.2. Оценка клинической информативности тестирования уровня вирусной нагрузки ВИЧ в спинномозговой жидкости для диагностики ВИЧ-ассоциированного поражения центральной нервной системы.....	68
Глава 5. Анализ результатов генотипирования ВИЧ в парных образцах крови и спинномозговой жидкости.....	72
5.1. Сравнительный анализ парных нуклеотидных последовательностей гена <i>pol</i> ВИЧ.....	72
5.2. Анализ парных аминокислотных последовательностей, кодируемых геном <i>pol</i> , и профилей лекарственной устойчивости ВИЧ	75
5.3. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена <i>pol</i> ВИЧ при обследовании пациентов в динамике.....	80
Глава 6. Обсуждение.....	84
Выводы.....	93
Практические рекомендации.....	93
Перспективы дальнейшей разработки темы.....	94
Список сокращений.....	96
Список литературы.....	98

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Высокая значимость исследований в области патогенеза, диагностики, лечения и профилактики ВИЧ-инфекции обусловлена исключительной опасностью и широкой распространенностью этого инфекционного заболевания, а также отсутствием средств, способных полностью излечить либо способствовать развитию невосприимчивости к этому заболеванию. Несмотря на значительные усилия, предпринимаемые международным научным сообществом, многие вопросы патогенеза и диагностики этого заболевания остаются недостаточно изученными. По данным ЮНЭЙДС к концу 2011 года оценочное число людей, живущих с ВИЧ, составило 34 (31,4–35,9) миллиона человек [241]. За последние 10 лет количество людей с положительным ВИЧ-статусом в мире увеличилось на 17% [242]. Ежегодный прирост новых случаев ВИЧ-инфекции стабилизировался и составил 2,7 миллиона человек в 2010 году и 2,5 миллиона в 2011 году. Число лиц с положительным ВИЧ-статусом в России уже к 2008 году превышало 400 тыс. человек [29], а к 2013 году достигло более 700 тыс. человек [243]. В Санкт-Петербурге к 2013 году было зарегистрировано более 50 тыс. ВИЧ-инфицированных пациентов – один из самых высоких показателей в Российской Федерации [34, 5, 15], и более 7 тыс. из них была назначена антиретровирусная терапия [35]. Высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ) стала мощным средством спасения человеческих жизней. За 2010-2011 годы число людей, имеющих доступ к антиретровирусной терапии, возросло на 63% [241]. Число людей, живущих с ВИЧ, ежегодно возрастает не только в связи с появлением новых случаев заражения, но и благодаря расширению доступа к лечению, снижению смертности и увеличению продолжительности жизни людей с положительным ВИЧ-статусом [26].

Значительным препятствием на пути создания вакцины и средств для лечения и диагностики ВИЧ-инфекции является высокая генетическая неоднородность и высокая вероятность мутаций при репликации генома [208,

115]. Эти свойства вируса создают предпосылки для широкого разнообразия вариантов ВИЧ, как с точки зрения чувствительности к различным противовирусным препаратам, так и с позиций особенностей патогенеза. Уникальная генетическая изменчивость вируса приводит к появлению новых субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ, обеспечивает вирусу возможность противодействовать иммунной системе и нивелировать эффекты лекарственных препаратов путем селекции устойчивых вариантов вируса с дальнейшим распространением этих штаммов по эпидемическим цепочкам [10]. К настоящему моменту в развитых странах в результате достаточно длительного и широкого охвата антиретровирусной терапией регистрируется сравнительно высокий уровень первичной резистентности у ВИЧ-инфицированных больных - до 15% среди пациентов, не принимавших антиретровирусные препараты (АРВП) [269, 109, 268, 102].

Вирусная популяция в пределах одного инфицированного организма генетически гетерогенна, что является результатом естественных мутационных процессов, существования гистогематических барьеров и селективного давления противовирусных препаратов. При назначении терапии следует учитывать, что степень проникновения лекарственных веществ в различные органы и ткани неодинакова. Таким образом, возможно формирование условий для избирательной репликации и селекции устойчивых вариантов ВИЧ в тканях, где ингибирующие концентрации препаратов снижены. Образование в организме резервуаров ВИЧ, таких как Т-клетки памяти, микроглиальные клетки мозга, макрофаги, дендритные клетки, является причиной «архивирования» различных генетических вариантов ВИЧ, в том числе лекарственно устойчивых, и персистенции вируса в организме больного [11, 8, 39]. Такие резервуары становятся источником множества генетических вариантов вируса и способствуют прогрессированию заболевания. Косвенным подтверждением этому могут служить молекулярно-генетические исследования ВИЧ в различных биологических жидкостях (спинномозговая жидкость (СМЖ), сперма, цервикагинальные мазки и др.), выявляющие локальное

увеличение вирусной нагрузки ВИЧ в тканях и различный спектр мутаций у изолятов ВИЧ, полученных из разных биологических материалов у одного и того же пациента [81, 106, 91, 123, 122]. Различия в нуклеотидных последовательностях вариантов ВИЧ, выделенных из крови и других биологических образцов, могут служить косвенным подтверждением независимой эволюции вируса в различных органах и тканях.

Центральная нервная система (ЦНС) - один из наиболее объемных и клинически значимых резервуаров ВИЧ в инфицированном организме. Благодаря широкому применению антиретровирусной терапии случаи ВИЧ-ассоциированной деменции наблюдаются в настоящее время значительно реже, однако распространенность нейрокогнитивных расстройств средней и легкой степени остается высокой, достигая уровня 50% и более [156, 139, 79]. Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) препятствует не только свободному переходу ВИЧ из крови в ткани ЦНС и обратно, но и затрудняет проникновение лекарственных препаратов. Эти особенности создают условия для избирательной репликации и селекции устойчивых вариантов ВИЧ в ЦНС на фоне низкой концентрации антиретровирусных препаратов [234].

Часто выявляемое длительное сохранение неврологических нарушений у больных на фоне антиретровирусной терапии и супрессии ВИЧ в крови заставляет искать новые подходы для оценки степени ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС и оптимизации схемы терапии. В настоящее время не существует алгоритма лабораторной диагностики ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС и мониторинга эффективности лечения при нейрокогнитивных нарушениях у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Таким образом, изучение генетических особенностей вируса и оценка его количества в различных биологических субстратах является важной составляющей исследования патогенетических механизмов развития ВИЧ-инфекции и эволюции вируса в инфицированном организме, а также способствует созданию более эффективных методов диагностики и лечения этого заболевания.

Состояние научной разработанности проблемы. В мировой научной литературе встречаются результаты исследований, направленных на изучение особенностей репликации ВИЧ в клетках ЦНС и патогенеза ВИЧ-ассоциированных нейрокогнитивных расстройств, в том числе с применением вирусологических методов анализа спинномозговой жидкости (СМЖ). Полученные разными научными группами результаты значительно различаются.

В России подобные исследования не проводили, а зарубежные исследования выполнялись с использованием биологических образцов пациентов, инфицированных субтипами ВИЧ, не получившими в России широкого распространения.

Клиническая информативность вирусологических исследований СМЖ для оценки степени тяжести ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС до сих пор не доказана. В мире не существует зарегистрированных тест-систем для оценки вирусной нагрузки и профиля лекарственной устойчивости ВИЧ в СМЖ, и эти методы диагностики не применяются в клинической практике.

Цель исследования. Провести сравнительный анализ и оценить клинико-диагностическое значение определения уровня вирусной нагрузки и исследования генотипа ВИЧ в парных образцах спинномозговой жидкости и крови у больных ВИЧ-инфекцией.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ уровня вирусной нагрузки в парных образцах плазмы крови и СМЖ и оценить взаимосвязь количества ВИЧ в СМЖ и содержания CD4⁺-лимфоцитов в крови.
2. Проанализировать взаимосвязь между субтипом ВИЧ, содержанием CD4⁺-лимфоцитов в крови, уровнем вирусной нагрузки в крови и СМЖ и наличием признаков ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС.
3. Выполнить сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *pol* ВИЧ, полученных в результате генотипирования ВИЧ в парных образцах крови и СМЖ.

4. Оценить клинико-диагностическое значение определения уровня вирусной нагрузки и тестирования лекарственной устойчивости ВИЧ в образцах СМЖ у больных ВИЧ-инфекцией.

Объект исследования. Исследование посвящено изучению вирусологических аспектов патогенеза ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС, а также разработке новых диагностических подходов для оценки степени поражения ЦНС при ВИЧ-инфекции и вирусологической эффективности антиретровирусной терапии.

Предмет исследования. Основные результаты получены при исследовании вирусной нагрузки и нуклеотидной последовательности гена *pol* ВИЧ в образцах плазмы крови и СМЖ, количества CD4⁺-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных пациентов. В процессе анализа учитывалась клиническая оценка состояния функций ЦНС у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Теоретические и методологические основы исследования. В основу научно-квалификационного исследования легли вопросы вирусологии, патологической физиологии, лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции. В процессе работы применялись общенаучные и специальные методы исследования (методы клинической и лабораторной медицинской диагностики, эпидемиологические методы). Для анализа значимости выявленных закономерностей применялись современные статистические методы оценки.

Информационная база исследования. В качестве информационных источников использовались научные публикации российских и зарубежных исследователей, материалы конференций, нормативные документы, инструкции к использованным в работе тест-системам, данные клинической документации, собственные результаты исследований.

Основные научные результаты исследования, полученные лично автором. Автор участвовал в сборе материала, самостоятельно проводил молекулярно-биологические исследования биологических образцов, анализ архивной и клинической документации, статистическую обработку и

интерпретацию полученных результатов, подготовку и публикацию материалов.

Впервые проведены исследования уровня вирусной нагрузки и генотипирование ВИЧ в образцах СМЖ в большой выборке пациентов, инфицированных характерным для России ВИЧ субтипа А1.

Обнаружены ранее неизвестные особенности (соотношение вирусной нагрузки и генетические различия ВИЧ в крови и СМЖ, количество ВИЧ в СМЖ при наличии ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС), характеризующие количественные и качественные различия субпопуляций ВИЧ в двух биологических жидкостях инфицированного организма.

Обоснована возможность и целесообразность применения молекулярно-биологических исследований образцов спинномозговой жидкости для подтверждающей диагностики ВИЧ-обусловленных поражений центральной нервной системы и определения профиля лекарственной устойчивости ВИЧ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Между концентрацией ВИЧ в СМЖ и крови обнаружена корреляционная связь слабой силы ($r=0,3$, $p<0,01$). У пациентов, не принимавших антиретровирусных препаратов, вирусная нагрузка ВИЧ в СМЖ ниже, чем в крови, в среднем на 1,5 lg копий РНК/мл ($p<0,01$). У нелеченых больных с клиническими признаками поражения ЦНС уровень вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ в среднем на 1,4 lg копий РНК/мл выше, чем у пациентов без нарушения функций ЦНС, при этом разница между концентрацией ВИЧ в крови и СМЖ составляет 0,8 lg и 1,9 lg копий РНК/мл соответственно ($p<0,0001$).
2. У пациентов, не принимавших антиретровирусные препараты, количество ВИЧ в СМЖ, равное или превышающее 4,00 lg копий РНК/мл, свидетельствует о высокой вероятности наличия ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС ($p<0,0001$). Определение вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ рекомендуется применять для лабораторной диагностики ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС.

3. Обнаружена генетическая дивергенция и, в ряде случаев, несовпадение профилей лекарственной устойчивости субпопуляций ВИЧ, циркулирующих в СМЖ и крови. Определение профиля лекарственной устойчивости ВИЧ в СМЖ рекомендуется использовать для лабораторного мониторинга эффективности антиретровирусной терапии в ЦНС.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

Обнаружены ранее неизвестные особенности патогенеза поражения ЦНС при ВИЧ-инфекции, а также генетической изменчивости и репликации ВИЧ в инфицированном организме. Выявленные закономерности позволили произвести оценку диагностической эффективности определения уровня вирусной нагрузки и определения профиля фармакорезистентности ВИЧ в СМЖ. Обнаружено, что в ряде случаев определение профиля лекарственной устойчивости ВИЧ только в образцах крови может быть недостаточно информативным, так как степень чувствительности ВИЧ к препаратам в СМЖ может отличаться от результата, полученного в крови. Полученные данные могут быть использованы для диагностики ВИЧ-ассоциированных поражений ЦНС и лабораторного мониторинга эффективности терапии ВИЧ-инфекции.

Апробация результатов исследования. Материалы работы были представлены на двух Международных симпозиумах «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (Санкт-Петербург, 2011, 2013 г.), региональной научно-практической конференции «Развитие службы ВИЧ/СПИДа. Современные подходы к профилактике, диагностике и лечению ВИЧ-инфекции» (Мурманск, 2011 г), Международном симпозиуме «Женщина, ребенок и ВИЧ» (Санкт-Петербург, 2011 г.), Научно-практической конференции III Виноградовские чтения «ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – приверженность больных к лечению и фармакорезистентность ВИЧ» (Санкт-Петербург, 2011 г.), Международном конгрессе «Женщина, ребенок, ВИЧ» (Санкт-Петербург, 2012 г.), Юбилейной всероссийской научной конференции «Отечественная эпидемиология в XXI веке: приоритетные направления развития и новые направления диагностики и профилактики болезней

человека» (Санкт-Петербург, 2012 г.), Международном круглом столе «НейроСПИД – от минимальной когнитивной дисфункции до грубых структурных изменений» (Санкт-Петербург, 2013 г.).

Полученные результаты внедрены в практическую диагностику ВИЧ-ассоциированных поражений ЦНС в Санкт-Петербургском Центре по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, а также включены в учебный курс «ВИЧ-медицина» СПбГМУ им. И.П.Павлова.

Публикации по теме диссертации. По результатам исследования опубликовано 18 печатных работ, из них 9 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК. Материалы исследования были использованы при подготовке двух руководств для врачей: «ВИЧ-медицина» (СПб, 2010 г.) и «Женщина, ребенок и ВИЧ» (СПб, 2012 г.)

Структура и содержание диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста, текст иллюстрирован 10 таблицами и 12 рисунками. В списке литературы приведены 272 источника, из них 38 отечественных и 234 иностранных.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА ВОПРОСЫ ПАТОГЕНЕЗА, ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ВИЧ-АССОЦИИРОВАННОГО ПОРАЖЕНИЯ ЦНС (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Патогенез ВИЧ-инфекции

Инфицирование ВИЧ происходит тремя основными путями:

- контакт вирусосодержащего материала с кровью (переливание инфицированной крови, внутривенное потребление наркотиков и т.п.);
- контакт вирусосодержащего материала со слизистыми (половой гомо- и гетеросексуальный путь передачи);
- перинатальный путь передачи инфекции.

Очевидно, что наиболее высокорискованным будет непосредственное поступление вируса в кровь, так как в этом случае вирус легко и быстро встретится с большим количеством основных клеток-мишеней. Заражение новорожденных может происходить перинатальным путем, но механизмы и способы реализации этого пути разнообразны и значительно зависят от количества вируса в крови матери.

Риск передачи вируса при контакте со слизистой оболочкой в сотни раз ниже и во многом зависит от состояния и строения эпителия слизистой и количества вируса в инфицирующем материале [11, 5]. При реализации этого пути передачи вирус использует дополнительные механизмы, позволяющие ему быстрее и проще вступить в тесный контакт с клетками-мишенями, так как в слизистой оболочке их немного [238]. В частности, для неспецифического контакта (прилипания) ВИЧ использует молекулы лектинов. На поверхности дендритных клеток, локализующихся в том числе в слизистой, присутствуют молекулы DC-SIGN. Вирус неспецифически связывается с этими рецепторами и интернализуется внутрь клетки в составе эндосомы. Продуктивное заражение дендритных клеток в силу наличия у них необходимых рецепторов и корецепторов также возможно, но играет меньшую роль из-за их невысокой

концентрации на поверхности этих клеток. Дальнейшая миграция дендритных клеток приводит их в лимфоузлы, где вирус в процессе экзоцитоза высвобождается и инфицирует основные клетки-мишени ВИЧ - Т-лимфоциты [80].

Основной мишенью ВИЧ в человеческом организме являются клетки, обладающие рецептором CD4 и одним из двух корецепторов: CCR5 или CXCR4. На первом этапе наружный оболочечный гликопротеин вируса gp120 присоединяется к CD4-рецептору клетки-мишени. После молекулярных конформаций gp120 связывается с корецептором CCR5 или CXCR4, происходит слияние вирусной и клеточной мембран и проникновение внутрь клетки вирусного нуклеокапсида. С помощью вирусной обратной транскриптазы синтезируется ДНК-копия РНК-генома вируса, происходит транслокация провирусной ДНК в ядро клетки и ее интеграция в человеческий геном. Дальнейшая транскрипция, трансляция и синтез вирусных генов происходит рутинным путем по аналогии с генами клетки. Результатом этих процессов является синтез вирусных нуклеиновых кислот и белков, сборка новых вирионов и их высвобождение из клетки [14, 221, 114].

Основная масса чувствительных к заражению ВИЧ клеток – это Т-лимфоциты. Кроме лимфоцитов естественной мишенью вируса в силу наличия необходимых рецепторов являются макрофаги, моноциты, дендритные клетки, НК-клетки, микроглия мозга [76]. Эти клетки не являются основными продуцентами вируса в организме, но могут обуславливать местные особенности патогенеза и эволюции вируса, а также способны быть долгоживущим резервуаром ВИЧ и источником генетически устойчивых вариантов вируса [39]. Способность вируса инфицировать другие клетки продолжает активно изучаться (астроциты, эндотелиоциты и др.), и в литературе иногда встречаются противоположные мнения о возможности заражения этих клеток [83, 179, 117, 125, 60, 118, 136, 193, 111, 148, 64, 56, 54].

Течение ВИЧ-инфекции после окончания инкубации включает в себя стадию острой инфекции, стадию хронической инфекции (в том числе

латентный период) и стадию СПИДа (рис. 1). К концу инкубационного периода вирусная нагрузка в крови достигает значительного уровня (до 10^6 и более копий РНК/мл), а количество $CD4^+$ -лимфоцитов падает. Репликация вируса приводит к активации иммунной системы и появлению клиники «острого ретровирусного синдрома» [168]. Уникальная генетическая изменчивость вируса является причиной несостоятельности иммунной системы в борьбе с ВИЧ, инфекция переходит в хроническую фазу, которая может длиться несколько лет в зависимости от индивидуальных особенностей организма и вируса. Латентный период инфекции сопровождается ограниченной репликацией вируса на фоне постепенного истощения иммунной системы. При отсутствии лечения вирусная нагрузка постепенно нарастает, а количество $CD4^+$ -лимфоцитов падает, что приводит к развитию синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) и появлению оппортунистических заболеваний. В отсутствие лечения ВИЧ-инфекция завершается гибелью пациента [28, 145].

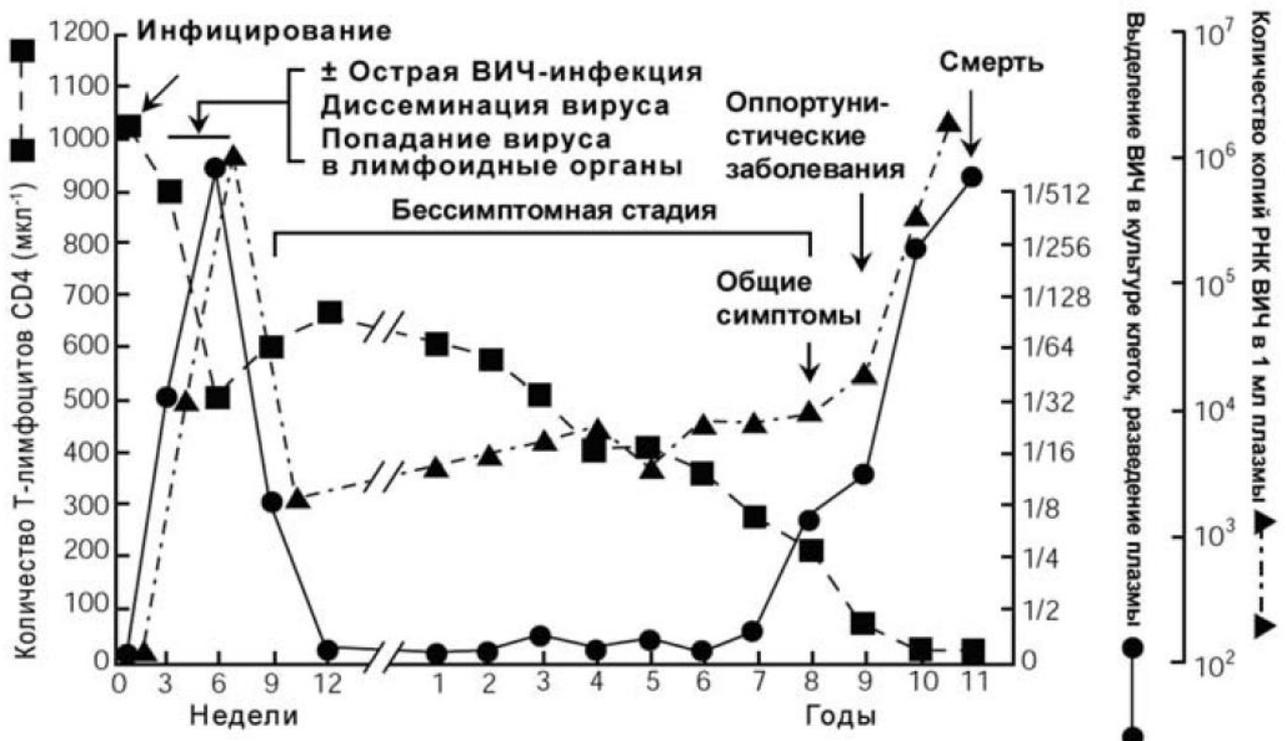


Рис. 1. Течение ВИЧ-инфекции в отсутствие лечения [4]

В России для диагноза различных стадий ВИЧ-инфекции используется клиническая классификация, разработанная академиком В.И. Покровским [30]. Согласно этой классификации заболевание имеет 5 стадий:

- стадия 1 – «стадия инкубации»;
- стадия 2 – «стадия первичных проявлений» (в зависимости от клинической симптоматики выделяют стадии 2А, 2Б, 2В);
- стадия 3 – «субклиническая стадия»;
- стадия 4 – «стадия вторичных заболеваний» (в зависимости от тяжести вторичных заболеваний выделяют стадии 4А, 4Б, 4В);
- стадия 5 – «терминальная стадия».

1.2. Генетическая гетерогенность ВИЧ

В мире встречается множество генетических вариантов ВИЧ [127, 225, 261]. Наибольшее распространение получила группа М вируса, внутри которой сформировались филогенетические кластеры (субтипы и рекомбинантные формы), отличающиеся по нуклеотидному составу на 25-30% для *env*-гена, на 20% для *gag* и на 10% для *pol* [226]. Процесс генетического видоизменения вируса продолжается, и таксономическое дерево ВИЧ обростает все новыми ветвями (рис. 2).

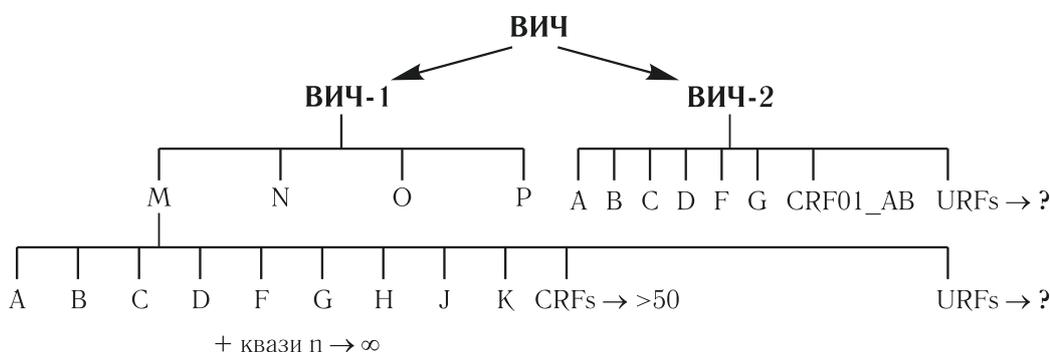


Рис. 2. Схема видового распределения ВИЧ

В разных географических районах доминируют различные субтипы и рекомбинантные формы ВИЧ, что, вероятно, явилось результатом действия «эффекта основателя» [184] (рис. 3).

Практически все подтипы ВИЧ-1, а также ВИЧ-2 можно обнаружить в странах Центральной и Западной Африки. В России наибольшую распространенность получил местный генетический вариант субтипа A1 - IDU-A1 (injecting drug use - A1) [6, 22, 13, 24], в Северной Америке, Западной Европе, Австралии и Японии доминирует субтип В.

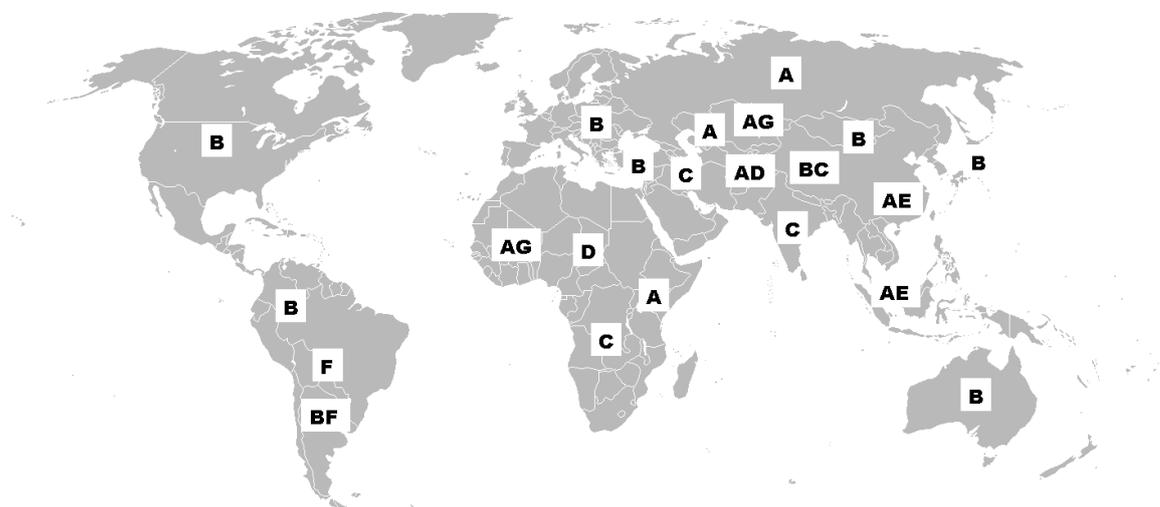


Рис. 3. Распределение субтипов ВИЧ по регионам мира (по данным национальной лаборатории Лос-Аламоса, США, URL: <http://www.hiv.lanl.gov>, дата обращения 13.03.2012)

Во многих регионах России эпидемия ВИЧ-инфекции начиналась с заноса и медленного распространения субтипа В ВИЧ половым путем. С проникновением субтипа А в группу потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) картина резко изменилась. Высокая численность группы ПИН, как результат изменения и ухудшения социальных условий жизни населения России в 90-е годы прошлого столетия, и рискованные практики наркопотребления (добавление крови при кустарном приготовлении

наркотиков из маковой соломки для внутривенного введения, использование одного шприца несколькими наркопотребителями) стали причиной эпидемического распространения этого субтипа вируса на постсоветском пространстве [2, 26]. В результате действия «эффекта основателя» генетический вариант IDU-A1 начал доминировать в многочисленной субпопуляции высокого риска инфицирования (ПИН) [184, 7].

В настоящее время в России выявляется более десяти разновидностей ВИЧ [2, 254, 3], субтип A1 на большинстве территорий доминирует [31], другие субтипы и рекомбинантные формы встречаются реже, занимая различные доли в зависимости от региона.

В 2009 году было проведено изучение распространенности субтипов ВИЧ на территории России по нуклеотидным последовательностям гена *pol*, полученным в российских Центрах СПИД при рутинном тестировании лекарственной устойчивости [254].

Субтип A1 на большинстве территорий доминировал, но наблюдалась значительное разнообразие в распространенности других вариантов ВИЧ. В Ростовском Центре СПИД и республиканской клинической больнице в Усть-Ижоре более половины случаев ВИЧ-инфекции были связаны с субтипом G, так как в этих учреждениях значительное число ВИЧ-инфицированных пациентов составляли дети, инфицированные во время внутрибольничных вспышек, вызванных этим субтипом в 90-е годы.

В Вологде, Екатеринбурге, Ноябрьске, а также по данным Северо-Западного окружного Центра СПИД и инфекционной больницы в Усть-Ижоре от 6 до 24% случаев составляла рекомбинантная форма CRF03_AB [254]. Похожий рекомбинантный вирус IDU-A/B ВИЧ-1 в 2006 году вызвал вспышку ВИЧ-инфекции (более 800 случаев) как среди ПИН, так и среди заразившихся половым путем в г. Череповце Вологодской области [23, 25].

Субтип В по данным N. Marlowe чаще регистрировался в Санкт-Петербурге (18,6%) и Хабаровске (36,4%) [254], что, возможно, связано с тем, что оба города – приграничные и являются крупными портами. Данные 2012

года по ситуации в Дальневосточном федеральном округе очень близки к распределению субтипов в Санкт-Петербурге: субтип В составляет 9,8% и 10,7% соответственно, субтип А1 – 89% и 86,7% [32, 3]. В Московской области в 2010 году субтип В встречался в 6,6% случаев [21].

В целом по России ВИЧ-инфекция, вызванная субтипом А1, была обнаружена в 75% случаев, а субтипы В, G и вариант CRF03_AB занимали почти одинаковые доли от 7 до 9 % [254].

Слежение за распространением различных субтипов ВИЧ – важная часть эпидемиологического мониторинга ВИЧ-инфекции, позволяющая, в том числе, контролировать пути передачи инфекции. Кроме того, продолжаются исследования, целью которых является оценка влияния субтипа вируса на течение, передачу ВИЧ-инфекции и эффективность противовирусной терапии [97, 132, 144]. Окончательного согласия по этим вопросам до сих пор не достигнуто, так как результаты этих исследований весьма противоречивы в силу различных эпидемиологических и методологических причин.

1.3. Лекарственная устойчивость ВИЧ

В связи с уже многолетним опытом применения ВААРТ и постоянным увеличением охвата терапией больных (более 6000 пациентов в Санкт-Петербурге и 50000 в России) возможно появление передающейся лекарственной устойчивости среди ВИЧ-инфицированных пациентов, как это уже произошло в других странах, где применение антиретровирусных препаратов началось на десятилетие раньше, чем в России. В 2011 году на 6-й Международной конференции по патогенезу, лечению и предупреждению ВИЧ-инфекции (6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention) были представлены результаты изучения уровня первичной устойчивости среди ВИЧ-инфицированных пациентов Москвы и Московской области. Среди 56 проанализированных образцов, полученных от не принимавших АРВП ВИЧ-инфицированных больных, мутация

фармакорезистентности была обнаружена только в одном случае [255]. Совершенно иная ситуация в странах, где эпидемия ВИЧ-инфекции и применение антиретровирусных препаратов начались значительно раньше, чем в России. На той же конференции прозвучали следующие данные: при анализе первичной устойчивости среди ВИЧ-инфицированных пациентов в странах Центральной Америки мутации резистентности выявлены в 8,5% случаев, в Италии – в 10%, в США мутации устойчивости выявлены в 9% образцов [271, 270, 267].

В 2007 году опубликован анализ изучения первичной устойчивости ВИЧ среди 27 пациентов с недавней сероконверсией и 49 беременных ВИЧ-инфицированных женщин в возрасте до 25 лет в Москве и Московской области: не обнаружено ни одного случая первичной фармакорезистентности [33].

При изучении первичной устойчивости вируса у 76 ВИЧ-инфицированных пациентов Дальневосточного федерального округа, никогда ранее не получавших антиретровирусных препаратов, был обнаружен только один случай первичной фармакорезистентности ВИЧ: мутация M46IM (1,35%), снижающая чувствительность к ряду ингибиторов протеазы [27].

Европейские эксперты рекомендуют определение профиля резистентности до начала ВААРТ у всех пациентов с учетом того, что в Европе уровень первичной устойчивости в большинстве стран составляет от 5 до 10%. Учитывая значительные различия в уровнях первичной фармакорезистентности ВИЧ на разных территориях, для отдельных регионов рекомендуются более углубленные исследования экономической эффективности тестирования, так как такие исследования до начала терапии является экономически эффективными только когда уровень первичной устойчивости ВИЧ превышает 1-5 % [104]. Эта рекомендация особенно актуальна, учитывая то, что тестирование абсолютно всех пациентов требует значительных финансовых затрат и серьезного расширения парка лабораторного оборудования для генетических исследований.

1.4. Оценка вирусной нагрузки ВИЧ в различных тканях и биологических жидкостях инфицированного организма

В настоящее время все зарегистрированные в России тест-системы для диагностики ВИЧ предусматривают использование в качестве субстрата исследования образцы крови. Вопросы репликации и концентрации ВИЧ в различных тканях и биологических жидкостях организма остаются недостаточно изученными. Решению этой проблемы препятствует отсутствие простых, дешевых и доступных методик количественного определения ВИЧ в различных тканевых образцах. Во многих случаях влияет и меньшая доступность самих биологических жидкостей для исследования. Значительные затруднения вызывает вопрос количественного измерения содержания вируса в биологических образцах, не являющихся жидкостью, например, цервикально-вагинальном отделяемом, ткани мозга, так как эти субстраты невозможно точно дозировать, и они не являются гистологически однородным материалом, что создает препятствия для интерпретации и сравнения результатов.

Несмотря на общую закономерность – меньшую концентрацию ВИЧ по сравнению с кровью и снижение содержания вируса в жидкостях организма на фоне успешной ВААРТ, существуют данные, свидетельствующие о случаях дискордантных результатов определения вирусной нагрузки в крови и других биологических образцах у одного и того же пациента.

В когортном исследовании WINS было обнаружено, что из 290 женщин с вирусной нагрузкой ВИЧ в крови менее 500 копий РНК/мл 44 (15%) демонстрировали детектируемую нагрузку ВИЧ в цервикально-вагинальных образцах, в том числе у 6 (2%) количество вируса превышало 1000 копий РНК/мл. Более высокое содержание вируса в цервикальных образцах в большей степени коррелировало с приемом нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы в составе схем терапии по сравнению с ингибиторами протеазы [72].

При исследовании выделения ВИЧ с цервикагинальным секретом у женщин, принимающих ВААРТ, с подавленной вирусной нагрузкой в крови было установлено, что у 22 из 59 (37%) женщин хотя бы однократно вирус обнаруживался в цервикагинальном отделяемом, несмотря на супрессию в крови. Образцы отбирались ежемесячно, всего у 59 женщин было проведено 582 анализа. 6,8% пациентов постоянно выделяли вирус с цервикагинальным секретом, 31% - периодически, у 45,8% - вирус не обнаруживался [123]. Женщины оставались потенциально опасными с точки зрения заражения ВИЧ, несмотря на супрессию вируса в крови.

В 2008 году Швейцарская национальная комиссия по борьбе с ВИЧ на основании научных данных вынесла резолюцию о том, что ВИЧ-инфицированный человек в случае отсутствия заболеваний, передающихся половым путем, принимающий антиретровирусные препараты и в течение последних 6 месяцев демонстрирующий «неопределяемую» вирусную нагрузку, является неопасным с точки зрения передачи вируса при сексуальном контакте и, соответственно, может не применять барьерные методы защиты. Комиссия оценила риск передачи при вышеуказанных обстоятельствах по меньшей мере 1 на 100 тыс. случаев, что всего в шесть раз превышает риск получения удара молнии [262]. Это заявление вызвало многочисленные бурные дискуссии и подтолкнуло к проведению новых исследований в этой сфере, учитывая, что очень многие были не согласны с таким заявлением.

Через год на Конференции по ретровирусам и оппортунистическим инфекциям (CROI 2009) были представлены сразу два доклада, свидетельствующие о том, что ВИЧ может обнаруживаться в сперме даже при неопределяемой вирусной нагрузке в плазме крови. Вирус обнаруживался в сперме 12 из 25 (48%) пациентов, несмотря на неопределяемую нагрузку в крови, в том числе в количестве более 5000 копий РНК/мл у 4 пациентов (16%). Изолированное обнаружение ВИЧ отмечалось в образцах спермы, полученных во время 19 визитов из 116 (14%). Из 13 пациентов с пролонгированной супрессией вируса в крови (в среднем - 126 месяцев), изолированное появление

вируса в сперме наблюдалось в 4 случаях (31%) [204]. Обнаружено, что рост вирусной нагрузки в сперме у одного и того же мужчины может носить характер спорадических всплесков [91].

В другом исследовании у 5% пациентов обнаруживался вирус в сперме, несмотря на «неопределяемую» нагрузку в крови в течение последних 6 месяцев [90]. Таким образом, хотя эффективная ВААРТ многократно снижает риск передачи ВИЧ при сексуальном контакте, нет полной гарантии безопасности даже при длительной супрессии ВИЧ в крови.

В 2004 году было проведено изучение корреляции между снижением вирусной нагрузки в крови, сперме и секретом слизистой прямой кишки у ВИЧ-инфицированных мужчин, практикующих секс с мужчинами. Несмотря на ВААРТ, уровни ВИЧ РНК в отделяемом прямой кишки были даже выше, чем в крови и сперме (4,96 lg копий РНК/мл по сравнению с 4,24 и 3,55 lg копий РНК/мл соответственно). Исследователи определили, что при снижении нагрузки ВИЧ в крови на 1 lg наблюдается уменьшение нагрузки в ректальном отделяемом и сперме только на 0,5 lg. Фактически при 200 копиях РНК/мл ВИЧ в крови обнаруживалось 1000 копий РНК/мл в сперме и 3980 копий РНК/мл в ректальном секрете [130].

При сравнении образцов ректального отделяемого у мужчин, практикующих секс с мужчинами, принимающих и не принимающих антиретровирусные препараты, было обнаружено, что в целом вирус обнаруживался значительно реже на фоне ВААРТ. Однако выявление ДНК ВИЧ в двух группах не отличалось, т.е. значительного снижения содержания провирусной ДНК ВИЧ в клетках практически не наблюдалось. А у одного пациента была обнаружена РНК ВИЧ в секрете прямой кишки, несмотря на вирусную нагрузку в крови менее 50 копий РНК/мл [46].

Проводилось изучение и других биологических жидкостей, в частности связанных с опасностью заражения ребенка от ВИЧ-инфицированной матери: околоплодных вод и грудного молока.

Анализ концентрации ВИЧ в околоплодных водах значительно затруднен и в научной литературе встречается мало сообщений о таких исследованиях. Тем не менее, присутствие ВИЧ в амниотической жидкости изучается с 1987 года [149, 163, 140]. Вирус был обнаружен лишь однажды [149] в образце, полученном при амниоцентезе, и методологией исследования не была исключена контаминация образца материнской кровью.

Инфицирование детей при грудном вскармливании доказано многими исследованиями. Высокая вирусная нагрузка в крови и молоке ВИЧ-инфицированной матери сопряжена с повышенным риском передачи вируса ребенку при грудном вскармливании. Уровень ВИЧ в грудном молоке коррелировал с нагрузкой в крови [59] и был ассоциирован с риском передачи вируса при грудном вскармливании [59, 150]. Риск передачи ВИЧ ребенку увеличивался пятикратно, если вирус обнаруживался в грудном молоке [150]. Воспалительные заболевания молочной железы сопряжены с ростом вирусной нагрузки в молоке пораженной железы, но возвращаются к исходному уровню после выздоровления [150, 227]. Количество вируса в грудном молоке коррелирует с нагрузкой в крови, а у матерей ВИЧ-инфицированных детей вирус в грудном молоке обнаруживался чаще и в большем количестве, чем у матерей здоровых детей [67].

Риск автономной репликации вируса в отдельных тканях организма может быть связан с недостаточным проникновением антиретровирусных препаратов в различные отделы организма. Например, большой размер молекулы энфувиртида не позволяет ему проникать через гематоэнцефалический и гематотестикулярный барьеры [229]. Концентрация одного из нуклеозидных ингибиторов, эфавиренза, составляет в спинномозговой жидкости только 0,5% по сравнению с плазмой крови, хотя и достигает необходимого уровня IC₅₀ [96]. Концентрации лопинавира, ампренавира, саквинавира и эфавиренза не достигают эффективного терапевтического уровня в семенной жидкости [205, 43, 201, 99, 178, 177].

Учитывая вышесказанное, факты несоответствия уровней концентрации вируса в различных тканях организма пациента, принимающего АРВП, представляются достаточно закономерными. На фоне недостаточной приверженности к терапии, либо выборочной приверженности к препаратам, риск автономной активной репликации ВИЧ в различных отделах организма увеличивается. Эти особенности наиболее характерны для тканей, обладающих барьером для свободного перемещения лекарственных веществ из крови, таких как ЦНС (гематоэнцефалический барьер) и генитальный тракт (гематотестикулярный барьер). Таким образом, возможно формирование условий для избирательной репликации и селекции устойчивых вариантов ВИЧ в тканях, где ингибирующие концентрации препаратов снижены. Такие резервуары становятся источником генетически различающихся вариантов вируса и прогрессирования заболевания, несмотря на кажущуюся эффективность схемы терапии, и способствуют микроэволюции вируса по пути увеличения сопротивляемости иммунной системе и антиретровирусным препаратам [155, 108, 112, 199, 141].

1.5. Патогенез ВИЧ-инфекции в центральной нервной системе

Значительное расширение доступа к антиретровирусной терапии позволило уменьшить число смертей вследствие СПИДа, и в последние годы на первый план выходят задачи улучшения качества жизни ВИЧ-инфицированных больных.

Одной из задач, требующих решения, является поражение центральной нервной системы у людей, живущих с ВИЧ. Благодаря антиретровирусной терапии, продолжительность жизни пациентов значительно увеличилась, но невозможность полного искоренения вируса в организме заставляет бороться с его разрушительным влиянием, в том числе и на центральную нервную систему, на протяжении всей жизни пациента [176, 185, 147]. Социальная значимость этой проблемы определяется еще и тем фактом, что ВИЧ в первую

очередь поражает людей в молодом и зрелом возрасте, и нарушение нейрокогнитивных функций создает трудности в получении образования, продуктивной трудовой деятельности и личной жизни людей с положительным ВИЧ-статусом. На долю молодых людей в возрастной группе от 15 до 24 лет приходится более одной трети всех новых случаев заражения ВИЧ, ежедневно около 3000 молодых людей в мире становятся ВИЧ-инфицированными [242].

На пути свободной циркуляции вируса между ЦНС и кровью находятся два барьера гематоэнцефалический (ГЭБ) и гематоликворный (рис. 4). Это уникальные биологические структуры, позволяющие защитить мозг от проникновения химических и биологических субстанций, способных нарушить его гомеостаз.

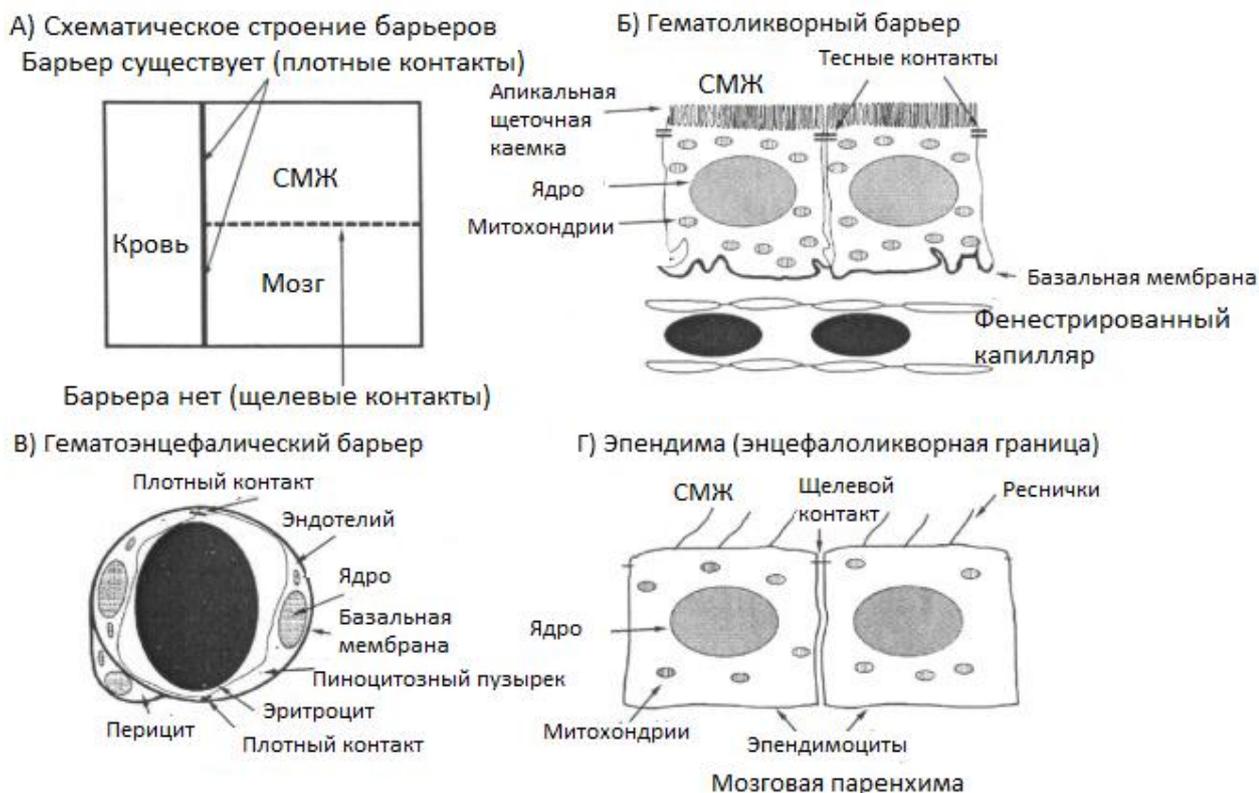


Рис. 4. Морфология барьеров между кровью, ЦНС и спинномозговой жидкостью: А) Схематическое строение барьеров; Б) Строение гематоликворного барьера; В) Строение гематоэнцефалического барьера; Г) Строение эпендимы [223]

Гематоэнцефалический барьер включает в себя, во-первых, эндотелий капиллярного русла головного мозга, который отличается от эндотелия других

органов чрезвычайно тесными (замыкающим) контактами соседних латеральных поверхностей эндотелиоцитов друг с другом. Клетки «сшиты» друг с другом с помощью белковых молекул клаудинов и окклюдина. Слой эндотелиальных клеток со стороны мозга покрывает базальная мембрана, имеющая плотную фибриллярную макропротеидную структуру [16, 12]. На базальной мембране со стороны мозговой паренхимы лежат перициты. Перициты представляют собой удлиненные многоотростчатые клетки, расположенные вдоль длинной оси капилляра. Отростки перицитов опоясывают капилляры и образуют плотные соединения с эндотелиоцитами [45]. Эти соединения облегчают взаимодействие цитоплазмы перицитов и эндотелиоцитов.

Предполагается, что перициты могут мигрировать из периваскулярного пространства и выполнять функции тканевых макрофагов [202]. Интересной особенностью перицитов (или, по крайней мере, части этих клеток) является их вероятная способность к репликации и мультипотентность [78], то есть способность к дифференцировке в клетки мезенхимального ряда (остеобласты, хондроциты, адипоциты, гладкомышечные клетки) [172, 47, 222, 116]. Возможно, эти клетки являются частью пула нейрональных стволовых клеток, участвуют в регенерации мозговой ткани и обладают способностью к дифференцировке в олигодендроциты, астроциты, нейроны [263, 78], что до настоящего времени является предметом дискуссий. В недавних исследованиях было показано, что снижение числа перицитов в центральной нервной системе может вызвать нарушение гематоэнцефалического барьера и приводить к другим дегенеративным изменениям [203].

Капилляры мозга плотно окутаны отростками астроцитарной глии, которые, не выполняя прямой барьерной функции, тем не менее, оказывают значительное регулирующее влияние на состояние ГЭБ [154, 49, 58, 36, 37, 48].

Гематоликворный барьер формируется кубическим эпителием хороидного синуса, клетки которого также связаны плотными контактами. Капилляры хороидного сплетения фенестрированы, так как основной функцией

этого анатомического образования является продукция и поддержание гомеостаза спинномозговой жидкости.

Между тканью мозга и спинномозговой жидкостью лежит слой клеток эпендимы мозговых желудочков, который по своему гистологическому строению не может рассматриваться как полноценный барьер между этими тканями [191].

Пути преодоления гематоэнцефалического барьера вирусом иммунодефицита человека изучены не полностью и остаются предметом дискуссий [20]. В целом, механизмы проникновения ВИЧ через ГЭБ сходны с продвижением вируса через любые тканевые барьеры организма, например, слизистую оболочку желудочно-кишечного и урогенитального трактов при половом пути заражения [11, 14]. Применительно к проникновению вируса в ткань мозга через гематоэнцефалический барьер эти способы могут выглядеть следующим образом (рис. 5):

- проникновение вируса через гематоэнцефалический барьер в ЦНС внутри инфицированных клеток (механизм «тройного коня») [40, 75, 189];
- эндоцитоз вируса эндотелиоцитами с последующим выходом вируса из эндосом в ткань мозга;
- проникновение вируса через межклеточные щели эндотелия сосудов мозга, в том числе эндотелий гематоликворного барьера сосудистых сплетений мозга;
- теоретически можно допустить наличие транспорта ВИЧ и через другие пути, например из СМЖ через эпендиму, по ходу черепных нервов и др.

Наибольшее признание получила версия проникновения ВИЧ в ЦНС с инфицированными клетками. Заражение чувствительных клеток (лимфоцитов и моноцитов) в организме больного происходит за пределами ГЭБ, например, в крови. Далее инфицированные клетки проникают через гематоэнцефалический барьер, моноциты дифференцируются в ткани мозга в периваскулярные

макрофаги, способные к продукции вируса с последующим заражением других клеток ЦНС. Эта гипотеза находит наибольшее количество сторонников и признается наиболее вероятным механизмом инфицирования ЦНС в ходе ВИЧ-инфекции [40]. Диapedез моноцитов и лимфоцитов из сосудистого русла через гематоэнцефалический барьер, возможно, еще более усиливается в ответ на продукцию хемоаттрактантов (MCP-1) в ходе ВИЧ-нейроинвазии.

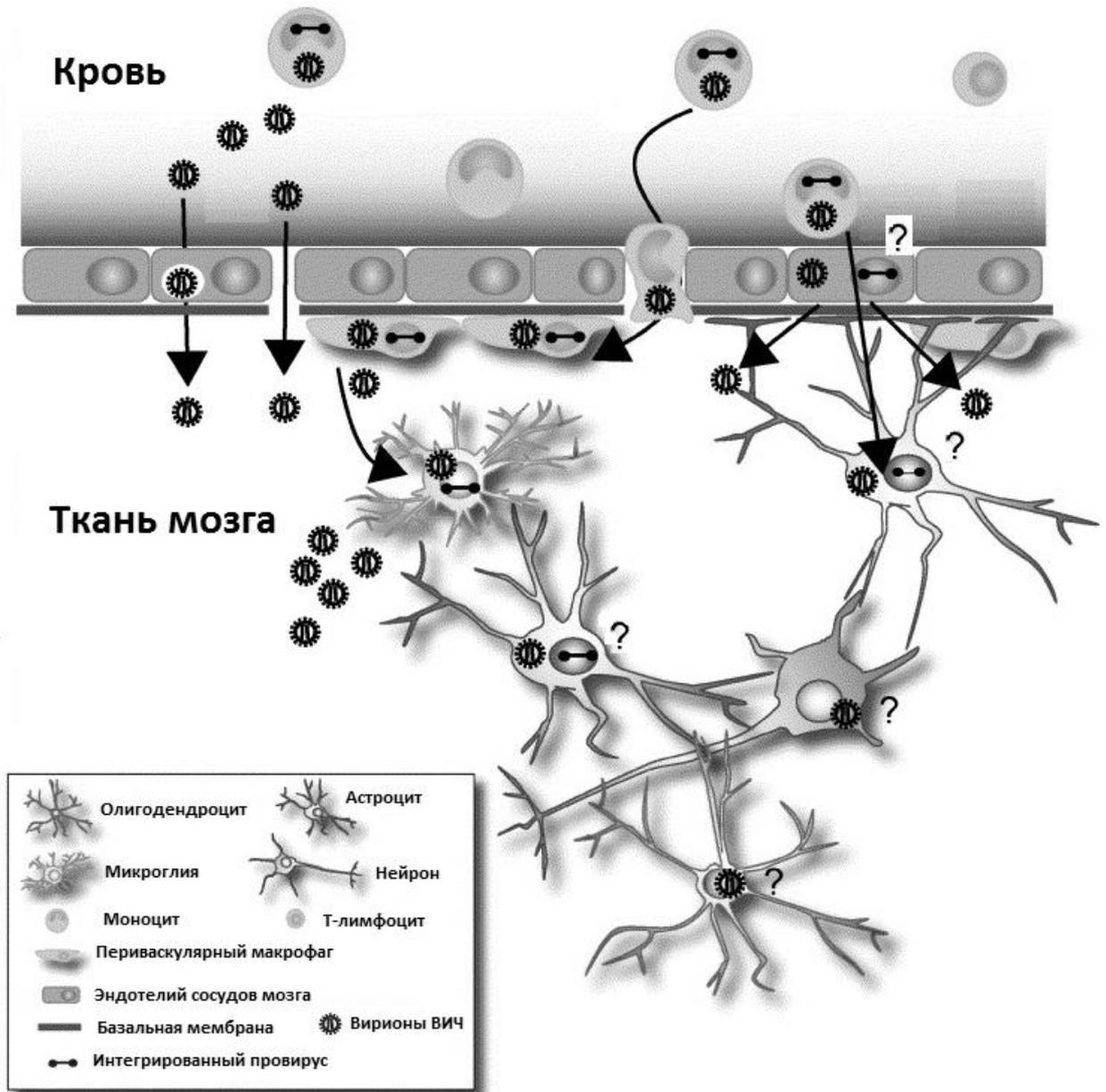


Рис. 5. Пути проникновения ВИЧ через гематоэнцефалический барьер и возможные для инфицирования клетки-мишени [88]

Эндоцитоз вируса был обнаружен *in vitro* через эндотелиальные клетки сосудов мозга путем макропиноцитоза вируса эндотелиоцитами с последующим выходом небольшого количества вируса к базальной мембране эндотелия [152, 232]. Классический путь инфицирования эндотелиоцитов вирусом с использованием CD4-рецепторов и корецепторов CCR5 и CXCR4 маловероятен. Данные о экспрессии CD4-рецепторов на поверхности эндотелиоцитов противоречивы и зависят от методики, применявшейся для анализа. Большинство данных свидетельствуют о том, что эндотелиальные клетки сосудов мозга не имеют CD4 рецепторов [87, 63, 209, 190], либо экспрессируют весьма небольшое их количество [131]. Однако они имеют на поверхности лектины С-типа (MBL, лектин, связывающий маннозу), сходные по функциям с DC-SIGN дендритных клеток, но обладающие меньшей аффинностью к gp120 [53, 167, 209]. Не случайно вирус имеет в своем распоряжении механизмы, способствующие увеличению экспрессии DC-SIGN на поверхности клеток, в частности эту функцию выполняет вирусный белок Nef [230, 135]. Эта способность белка Nef подтверждается тем, что лентивирусы приматов, которые не продуцируют полноценный Nef-белок, не способны демонстрировать высокие вирусные нагрузки, и особи, инфицированные такими вирусами, в том числе ВИЧ-инфицированные «непрогрессоры», долго остаются асимптоматичными [157, 182].

Следует отметить, что вирус использует те же механизмы для проникновения через многослойный эпителий уrogenитального тракта, также не обладающий CD4-рецепторами [66]. Вирусный белок gp120 связывается с лектинами С-типа на поверхности эпителия. Это взаимодействие активирует металлопротеиназы, приводя к деструкции плотных межклеточных контактов [253, 170], и облегчает вирусу доступ к основной мишени вируса – CD4⁺-клеткам иммунной системы, лежащим в глубине слизистой [134, 260]. Интактный эпителиальный барьер пропускает частицы до 30 нм в диаметре, а ВИЧ имеет диаметр 80-100 нм [220]. Однако вирус преодолевает эту преграду за 2 часа [210, 146].

Еще один возможный путь проникновения – межклеточные щели эндотелия сосудов мозга. Этот путь с наибольшей вероятностью может реализовываться в продвинутой фазе ВИЧ-инфекции ЦНС, когда в результате патогенного действия вируса, либо сопутствующих заболеваний происходит гибель эндотелиоцитов, разрушение их тесных межклеточных контактов и базальной мембраны и, таким образом, формирование брешей в ГЭБ [181, 41]. В мозге пациентов, которые умерли с диагнозом «ВИЧ-энцефалит», была обнаружена фрагментация окклюдина и ZO-1: двух важных структурных белков, ответственных за «сшивание» мембран соседних эндотелиоцитов, обеспечивающих целостность ГЭБ [55].

К нарушению целостности ГЭБ приводит продуктивная инфекция перицитов [193] и даже сама по себе иммунная активация клеток ЦНС. Активированные клетки продуцируют медиаторы воспаления, обладающие цитотоксическими свойствами, что ведет к разрушению тесных клеточных контактов эндотелиоцитов и у вируса появляется возможность свободно проходить через межэндотелиальные щели из крови в ткань мозга. Этот путь также может быть реализован в результате первичного поступления вирусных белков Tat и gp120 в мозг из кровяного русла, где они находятся в избыточном количестве. Дальнейшее разрушение барьера происходит как результат их нейротоксического действия [52]. Состояние ГЭБ усугубляется при присоединении оппортунистических инфекций ЦНС и эскалации местной воспалительной реакции [160, 239, 214, 61, 126].

Нужно отметить, что для патологического влияния на нервную деятельность вирусу достаточно того, что его молекулярные компоненты могут пересекать гематоэнцефалический барьер и оказывать нейротоксическое действие. Например, белок gp120, который в избытке образуется при репликации вируса и циркулирует в крови в свободной форме, пересекает ГЭБ путем эндоцитоза через эндотелиальные клетки сосудов мозга [169, 196]. Биологически активные молекулы (например, TNF, IL-1, IL-6), циркулирующие в крови ВИЧ-инфицированного больного в больших количествах [86], также

оказывают системное действие на организм, в том числе ЦНС. Эти вещества могут поступать из крови и в спинномозговую жидкость [51].

Таким образом, проникновению вируса в мозг может предшествовать повреждение эндотелия и разрушение непроницаемого для вируса ГЭБ с помощью циркулирующих в крови токсичных для эндотелия продуктов. После проникновения вируса начинается его репликация в клетках ЦНС, приводящая к еще большему накоплению токсичных компонентов вируса и биологически активных молекул в результате местной иммунной активации. Происходит дальнейшее разрушение ГЭБ, что позволяет вирусу в еще больших количествах проникать в мозг из кровеносного русла. Возникает порочный круг, когда экспансия вируса в ткань мозга из крови приводит к увеличению размножения ВИЧ в ЦНС, что в свою очередь является причиной все большего проникновения вируса в клетки ЦНС.

Дальнейший сценарий распространения ВИЧ в клетках ЦНС напрямую связан со способностью клеток мозга быть инфицированными вирусом, то есть в первую очередь определяется наличием на мембране клеток рецепторов для проникновения вируса в клетку: CD4 и корецепторов CCR5 либо CXCR4 (табл. 1).

Исследователи приходят к различным выводам относительно возможности продуктивной инфекции ВИЧ некоторых клеток ЦНС (астроциты, эндотелиоциты). Часто это обусловлено применением различных методик для обнаружения вируса в клетках, затруднениями в сепарации и идентификации вида клеток, использованием лабораторных клеточных линий, отличных от нативных клеток ЦНС. Очевидно, что основным резервуаром ВИЧ в ЦНС будут являться клетки макрофагального ряда, обладающие необходимыми рецепторами: микроглиальные клетки и периваскулярные макрофаги [74, 164, 54, 193]. Фактически это сходство проистекает из факта тесного онтогенетического родства этих клеток: все мозговые макрофаги (мигрирующие макрофагов, перициты, периваскулярные макрофаги, микроглия) имеют мезодермальное происхождение [128, 200].

Характеристика клеток нервной системы по наличию рецепторов для ВИЧ и способности быть инфицированными вирусом [83, 179, 117, 125, 60, 118, 136, 179, 193, 111, 148, 64, 56, 54, 63]

Тип клетки	Функции	CD4 рецептор	Хемокиновые рецепторы CCR5 или CXCR4	Продуктивная инфекция
Астроциты	Опорная, разграничительная, трофическая, регуляция активности нейронов, часть ГЭБ	-/+	+	+/-
Эндотелиальные клетки капилляров мозга	Основная часть ГЭБ	- / +	+	-
Микроглия	Защитная (макрофаги)	+	+	+
Нейроны	Основные функции ЦНС	-	+	-
Олигодендроциты	Образование миелиновой оболочки нейронов, участие в метаболизме	-	+	-
Периваскулярные макрофаги (пероциты)	Защитная, часть ГЭБ	+	+	+

Способность ВИЧ инфицировать астроциты продолжает активно изучаться. В отличие от макрофагов, астроциты имеют другое происхождение – эктодермальное, и, соответственно, другие структурные особенности и набор рецепторов. Астроциты – самая многочисленная группа клеток в ЦНС, но на поверхности этих клеток рецепторы CD4 не обнаруживаются прямыми методами исследования [165, 171, 183, 57, 64]. Тем не менее, анализ аутопсийного материала показывает, что ВИЧ присутствует в астроцитах на всех стадиях ВИЧ-инфекции в белом и сером веществе головного мозга [158, 171, 56]. Взаимодействие ВИЧ и астроцитов было продемонстрировано в клеточных культурах. Однако, клеточные культуры для изучения этого

процесса представляли из себя клеточные линии астроцитом, либо фетальные клетки [56]. Оба этих типа митотически активны в отличие от полностью дифференцированных неделящихся астроцитов, а значит не могут достоверно воспроизводить процесс ВИЧ-инфекции в астроцитах. Механизм инфицирования этих клеток при отсутствии всех необходимых рецепторов для проникновения ВИЧ внутрь клетки, по-видимому, фундаментально отличается от классического пути инфицирования клеток вирусом. Существуют данные, что вирус попадает в эти клетки за счет связывания с хемокиновым рецептором [68], либо за счет связывания с лектинами С-типа на поверхности клетки и интернационализуется внутрь цитоплазмы с формированием эндосомы [129]. На поверхности астроцитов обнаружены лектины С-типа (DC-SIGN). Взаимодействие gp120 с этими рецепторами приводит к эндоцитозу вируса в цитоплазму астроцитов и через 5 дней после проникновения вируса в клетки может обнаруживаться ДНК ВИЧ в астроцитах. Этот процесс блокируется добавлением к культуре клеток антагонистов DC-SIGN [62]. В эндосоме вирус сохраняется в жизнеспособном состоянии, не подвергается перевариванию за счет различных, малоизученных защитных механизмов и в дальнейшем может возвращаться на поверхность клеточной стенки и инфицировать CD4⁺-клетку в результате трансинфекции.

Путь проникновения вируса в клетки путем эндоцитоза без участия CD4-рецепторов подтверждается также другими исследованиями, демонстрирующими, что применение лизосомотропных агентов (хлорохин) приводит к значительному увеличению продукции вируса в астроцитах [235].

Лектины С-типа экспрессированы на мембранах нейронов, астроцитов, микроглии, олигодендроглии. Интересно, что эти рецепторы чаще обнаруживались при посмертном исследовании ткани мозга ВИЧ-инфицированных пациентов с диагнозом ВИЧ-энцефалит, чем без признаков энцефалита, особенно в области аксонов нейронов [110]. Изучаются возможные терапевтические стратегии, связанные с использованием DC-SIGN и лектина С-типа, либо антител против gp120 [231].

ВИЧ в астроцитах был обнаружен несколькими исследователями, однако было очевидно, что инфицируется лишь малое количество этих клеток (менее 10%), и активного размножения вируса внутри их не происходит [148]. Фактически наблюдался только синтез структурных компонентов вируса [218, 212, 186]. По всей вероятности структурные особенности астроцитов не могут обеспечить полноценную репликацию вирусов. Однако важным фактом является то, что вирус способен длительно сохраняться в астроцитах и быть переданным соседним клеткам макрофагального ряда, вызывая в них продуктивную ВИЧ-инфекцию [166, 56, 213, 231], то есть астроциты могут являться резервуаром ВИЧ-инфекции в организме. Причем в этом резервуаре вирус защищен от воздействия иммунных факторов и от большинства антиретровирусных препаратов, прерывающих процесс размножения вируса, так как в этих клетках вирус главным образом сохраняется, но не размножается. Активация этих инфицированных астроцитов и продукция активных биомолекул в них приводит к распространению нейротоксических веществ по межклеточным контактам, индуцируя гибель соседних клеток: неинфицированных астроцитов, эндотелиоцитов и нейронов [148, 207, 103].

Поражение ЦНС не ограничивается только продуктивным инфицированием чувствительных к ВИЧ клеток. Основными клетками, отвечающими за выполнение функций мозга, являются нейроны, но они не могут быть напрямую инфицированы вирусом из-за отсутствия на их поверхности CD4-рецепторов. Таким образом, на первый план выступает нарушение функций нейронов в результате опосредованного механизма: нейротоксическое действие белков вируса (gp 120, Tat) и продуктов, синтезируемых в процессе иммунной активации клеток (TNF- α , интерлейкины, глутамат, хинолевая кислота) на сами нейроны и клетки, обеспечивающие жизнедеятельность нейронов. Нейроны крайне чувствительны к неблагоприятным воздействиям и быстро подвергаются некрозу и апоптозу. Например, связывание gp120 с хемокиновыми рецепторами CXCR4,

представленными на мембранах нейронов, через цепь молекулярных взаимодействий приводит к апоптозу клетки [50].

Белок Tat и gp 120 активирует металлопротеиназы [153, 38, 134], которые разрушают белковые связи в ГЭБ, приводят к деградации миелина и индуцируют смерть нейронов [215].

Поражение мозга при ВИЧ-инфекции сопровождается аутоиммунным компонентом. У пациентов с ВИЧ-ассоциированными нейрокогнитивными расстройствами наблюдаются повышенные титры антител к миелину. Титры антител в СМЖ у этих пациентов и больных с ВИЧ-ассоциированными оппортунистическими инфекциями ЦНС выше, чем у асимптоматических ВИЧ-инфицированных пациентов и ВИЧ-негативных больных с невоспалительным поражением ЦНС [42]. Вероятно, ВИЧ-ассоциированное поражение ЦНС сопровождается повреждением гематоэнцефалического барьера, что лишает ЦНС неприкосновенности перед собственной иммунной системой пациента и способствует аутоагрессии против собственных антигенов.

1.6. Клинические проявления ВИЧ-обусловленного поражения центральной нервной системы

Симптоматика поражения нервной системы бывает различной и зависит от степени и основной локализации повреждения тканей ЦНС. Однако частота распространения такого поражения среди ВИЧ-инфицированных пациентов очень высока. Спектр выявляемых нарушений широк и не является специфичным только для ВИЧ-инфекции. У ВИЧ-инфицированных пациентов наблюдаются нарушение когнитивных функций (память, интеллект, обучаемость), расстройства сознания и внимания, эмоциональные и поведенческие расстройства вплоть до тяжелого поражения ЦНС – ВИЧ-ассоциированной деменции. Могут обнаруживаться симптомы поражения периферической нервной системы. В нозологической структуре поражений нервной системы у ВИЧ-инфицированных лиц чаще всего встречается ВИЧ-

энцефалопатия. Неврологические расстройства усугубляются при присоединении вторичных ВИЧ-ассоциированных заболеваний.

ВИЧ-ассоциированное поражение ЦНС является следствием размножения вируса и иммунной активации в нервной ткани. В эру высокоактивной антиретровирусной терапии распространенность тяжелых поражений ЦНС, таких как ВИЧ-ассоциированная деменция, снизилась [138]. Например, в Датской когорте ВИЧ-инфицированных количество тяжелых поражений ЦНС среди ВИЧ-инфицированных пациентов к 2004 году практически сравнялось с распространенностью подобных заболеваний среди остального населения [159]. Тем не менее, полностью исключить патогенное влияние ВИЧ на ЦНС не представляется возможным, и распространенность нейрокогнитивных расстройств средней и легкой степени остается высокой [156, 265], достигая уровней в 50% и более [77, 139, 264]. При изучении распространенности нейрокогнитивных расстройств путем психологического тестирования среди ВИЧ-инфицированных людей в Швейцарии было обнаружено, что симптомы нарушения когнитивных функций наблюдаются у 69% пациентов, хотя только 27% из них предъявляли жалобы. У всех пациентов была достигнута полная супрессия вируса в среднем на протяжении последних 4 лет [79]. При сравнении двух исследований, проведенных среди ВИЧ-инфицированных больных в различные периоды эпидемии ВИЧ-инфекции, ВИЧ-ассоциированные нейрокогнитивные расстройства наблюдались в эру ВААРТ (2000-2007 гг.) и до широкого применения терапии (1988-1995 гг.) у 36% ВИЧ-инфицированных пациентов и у 29% до развития СПИД соответственно, и у 43% и 46% на фоне СПИД. Распространенность сходных нарушений у неинфицированных людей в соответствующие годы составляла только 16% и 19% [139].

Рост количества случаев легкого поражения ЦНС у ВИЧ-инфицированных пациентов связан также с увеличением продолжительности жизни на фоне ВААРТ и увеличением доли людей среднего и старшего возраста среди ВИЧ-инфицированных пациентов, у которых возрастные

изменения отягощают состояние ЦНС [257]. Эти факты поднимают вопросы возможной необходимости начинать лечение раньше для предупреждения ухудшения функций ЦНС, а также определения клинических или лабораторных маркеров степени поражения ЦНС для отбора пациентов на лечение.

Раннее назначение противовирусной терапии является сдерживающим фактором для патогенного влияния ВИЧ на функции ЦНС [251]. В многоцентровом обсервационном исследовании CHARTER было показано, что чем ниже минимальный уровень CD4⁺-лимфоцитов, наблюдавшийся у пациента, тем выше риск возникновения неврологический нарушений. Этот результат привел исследователей к выводу, что инициировать ВААРТ следует как можно раньше, не дожидаясь падения количества CD4⁺-лимфоцитов до 200 клеток/мкл [65].

На 19-й Международной конференции по ретровирусным и оппортунистическим инфекциям (19th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections) группа исследователей продемонстрировала результаты изучения влияния раннего начала ВААРТ на функции ЦНС [251]. Были проанализированы результаты тестирования нейрокогнитивных функций у 35 пациентов с количеством CD4⁺-лимфоцитов более 350 клеток/мкл до начала лечения и через год. В качестве контрольной группы были выбраны больные (44 пациента) со сходным уровнем CD4⁺-лимфоцитов, но не получавшие лечения. У пациентов, принимавших антиретровирусные препараты, наблюдалось улучшение состояния ЦНС через год после начала ВААРТ, особенно заметное среди тех, кто демонстрировал до начала терапии наибольшее поражение нейрокогнитивных функций.

1.7. Вирусологические исследования спинномозговой жидкости

Изучение генома вирусов, локализованных в тканях ЦНС, показывает различные результаты. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генома ВИЧ, полученных от пациентов с тяжелыми

нейрокогнитивными расстройствами, часто демонстрирует кластеризацию вирусов, циркулирующих в СМЖ [228, 180, 119, 84]. При исследовании больных без признаков нейрокогнитивной дисфункции разные научные группы получили различные результаты: у отдельных больных есть признаки компартментализации, у других – нет [82, 245]. Гистогематические барьеры затрудняют взаимопроникновение вирусов из крови в ткани и обратно, однако компартментализация не приводит к полной изоляции вирусных субпопуляций. Эти генетические варианты вирусов остаются частью общей популяции ВИЧ в инфицированном организме, и научные данные подтверждают обмен вирусами между кровью и другими тканями [143].

Большое количество исследований включало в себя определение количества ВИЧ в СМЖ. В исследовании S. Letendre при использовании ультрачувствительного метода определения вирусной нагрузки (нижний лимит определения 2 копии/мл) было установлено, что пациенты с полной супрессией ВИЧ в крови и обнаруживаемым ВИЧ в СМЖ (диапазон 2 – 50 копий /мл) демонстрировали при психологическом тестировании худшие результаты, чем те, у кого вирус и в крови, и в СМЖ был полностью подавлен [266].

A. Canestri с коллегами изучали группу из 11 пациентов, стабильно получавших АРВП в течение в среднем 13 месяцев, но, несмотря на это, продемонстрировавших новые признаки ухудшения состояния ЦНС [92]. Вирусная нагрузка в крови была у всех менее 500 копий РНК/мл, а в СМЖ была выше, достигая разницы в 1 lg. Для оптимизации схемы терапии были также определены лекарственная устойчивость вируса в СМЖ и уровни лекарственных препаратов в СМЖ. После модификации схемы терапии с учетом выявленной устойчивости ВИЧ в образцах СМЖ количество вируса снизилось до неопределяемого уровня в СМЖ и наступило клиническое улучшение.

В исследовании CHARTERS. S. Letendre и соавторы сопоставили результаты определения вирусной нагрузки в крови и СМЖ у 1221 пациента. Присутствие вируса в СМЖ находилось в обратной взаимосвязи с фактом

лечения антиретровирусными препаратами. Среди нелеченых пациентов высокая вирусная нагрузка в СМЖ была ассоциирована с высокой концентрацией ВИЧ в крови, низким уровнем CD4⁺-клеток, более низким падением CD4⁺-лимфоцитов в анамнезе, более старшим возрастом. На фоне терапии к этим факторам добавлялись короткая продолжительность лечения, низкая приверженность и низкий коэффициент проникающей способности препаратов [248].

Результаты изучения корреляционных отношений между количеством ВИЧ в СМЖ и плазме крови различаются: одни исследователи обнаруживают взаимосвязь [85, 70], другие не находят статистически значимой связи между этими показателями [113, 69, 100].

При изучении количества ВИЧ в СМЖ у пациентов с нейрокогнитивными расстройствами большинство исследователей обнаруживали более высокий уровень вирусной нагрузки по сравнению с больными без симптомов нарушения функций ЦНС [85, 195, 206]. По данным В.Gelman среди пациентов с нейрокогнитивными расстройствами вирусная нагрузка ВИЧ в СМЖ была выше на 2,48 lg копий/мл, чем у больных без нейрокогнитивной дисфункции [197]. Однако, при изучении другой группой исследователей уровня вирусной нагрузки ВИЧ в крови и СМЖ как предикторов развития ВИЧ-ассоциированной деменции, взаимосвязи обнаружено не было [105].

Нейрокогнитивные расстройства у пациентов во многих исследованиях были статистически ассоциированы с более низким падением количества CD4⁺-клеток, когда-либо наблюдавшимся у пациентов, вирусной нагрузкой ВИЧ в крови, использованием антиретровирусной терапии. В целом, признаки поражения ЦНС отмечались реже у тех, кто имел вирусную нагрузку в крови менее 50 копий РНК/мл и чей уровень CD4⁺-клеток никогда не опускался ниже 200 клеток/мл [258, 259]. Другими словами, раннее назначение антиретровирусной терапии предохраняет мозг от разрушительного действия ВИЧ-инфекции.

1.8. Влияние антиретровирусной терапии на глубину ВИЧ-ассоциированного поражения центральной нервной системы

Назначение антиретровирусной терапии снижает вирусную нагрузку не только в крови, но и в СМЖ [185]. Однако на пенетрацию лекарственных веществ в ЦНС через гематоэнцефалический барьер влияет множество факторов. Применяемые лекарственные препараты обладают различной проникающей способностью в ткани и органы. Ряд исследователей высказывают мнение, что необходимо подбирать схемы терапии с хорошим проникновением через гематоэнцефалический барьер для обеспечения достаточной концентрации препаратов и прекращения вирусной репликации в клетках ЦНС [234]. На степень проникновения лекарственных препаратов в нервную ткань влияют следующие факторы:

- степень связывания препарата с белками – вещества, обладающие высокой степенью связывания с белками плазмы, хуже проходят через гематоэнцефалический барьер. С этой точки зрения степень пенетрации у НеНИОТ и ИП примерно одинаковы и ниже, чем у НИОТ, которые в меньшей степени связываются с белками плазмы крови;
- липофильность – чем выше жирорастворимость, тем лучше препарат проникает через гематоэнцефалический барьер: ИП и ННИОТ проникают лучше, чем НИОТ, так как обладают большей липофильностью;
- размер молекул препарата (молекулярный вес) – чем выше, тем хуже препарат проникает в ЦНС. Наиболее маленькие молекулы у НИОТ и они проникают лучше, чем НеНИОТ, а те, в свою очередь, лучше, чем ИП. Ингибитор интегразы энфувиртид, обладающий высоким молекулярным весом, плохо проникает через ГЭБ;
- сродство к активным транспортным мембранным системам ГЭБ. Анионные и катионные транспортеры (ОАТ, ОСТ, ОАТР) снижают

концентрацию в ЦНС НИОТ путем активного вывода препаратов в кровеносное русло. Например, Р-гликопротеин препятствует накоплению в клетках ЦНС ИП, маравирока, ралтегравира [174, 101, 9].

В 2006 году группой американских ученых во главе с S. Letendre была предпринята первая попытка определить сравнительные числовые коэффициенты проникновения различных антиретровирусных препаратов в ЦНС (CPE – CNS Penetration-Effectiveness) [234]. Исследователи опирались в своем анализе на результаты сопоставления вирусной нагрузки в СМЖ на фоне приема различных препаратов и коэффициента проникновения (CPE) этих препаратов. Антиретровирусные препараты были разделены на 3 группы с коэффициентами проникновения 0,5, 1 и 1,5, основываясь на данных различных научных исследований. Категоризация была произведена с учетом химических особенностей препаратов, их концентрации в СМЖ, эффективности снижения вирусной нагрузки в СМЖ и улучшения неврологических функций на фоне приема препарата. В 2010 году эта классификация была усовершенствована той же группой специалистов, опираясь на данные исследования CHARTER, в котором было проанализировано около 1600 пациентов [176]. Препараты разделили на 4 группы, величина коэффициента пенетрации (CPE) соответствовала номеру группы, увеличиваясь последовательно от 1 к 4 группе [249]. Для оценки терапии на основе этой классификации применяют сумму коэффициентов проникновения препаратов, входящих в схему. Проанализировав вирусные нагрузки ВИЧ в цереброспинальной жидкости 615 пациентов, группа исследователей пришла к заключению, что более высокий коэффициент проникновения статистически значимо связан с более низкой вирусной нагрузкой в СМЖ [248]. Суммарный коэффициент пенетрации препаратов схемы выше 7 был статистически ассоциирован с очень малым количеством пациентов, у которых количество вируса в СМЖ было больше 2 копий РНК/мл [266].

L. Cysique и коллеги наблюдали взаимосвязь между высоким коэффициентом проникновения антиретровирусной схемы терапии и низким

уровнем вирусной нагрузки в СМЖ и лучшим прохождением нейропсихологических тестов у 37 пациентов [95]. Однако снижение вирусной нагрузки в СМЖ не обладает прямой взаимосвязью с уменьшением признаков поражения ЦНС. Нарушение функций ЦНС наступает не только в связи с прямым патогенным действием вируса, но и в результате иммунной активации, сопутствующих заболеваний, токсического действия лекарственных препаратов. Данные исследователей, изучавших взаимосвязь коэффициента пенетрации препаратов в ЦНС и результатов нейропсихологического тестирования, расходятся. Например, М. Smurzynski с соавторами проанализировали в рандомизированном пролонгированном исследовании ALLRT 2636 пациентов (10413 визитов) и обнаружили положительную корреляцию между коэффициентом пенетрации и лучшим прохождением психологических тестов, если пациенты принимали более 3 препаратов в схеме. Однако при схеме терапии, содержащей 3 и менее препаратов, статистически значимой корреляции не обнаруживалось [98]. V. Tozzi и соавторы, протестировав 185 пациентов до и после назначения ВААРТ, установили, что пациенты, получавшие схему терапии с более высоким коэффициентом проникновения, проходили нейропсихологические тесты с лучшим результатом [73].

Другими исследователями была установлена связь между лучшей выживаемостью перинатально инфицированных детей с диагнозом ВИЧ-энцефалопатии и коэффициентом проникновения препаратов в ЦНС [156]. Подобная связь между уровнем смертности и коэффициентом проникновения препаратов у взрослых была обнаружена и другой группой исследователей: коэффициент пенетрации равный или менее 4 был независимо ассоциирован с повышенным риском смерти [44].

Исследователи из Канады изучали взаимосвязь нейрокогнитивных функций и коэффициента проникновения антиретровирусных препаратов в канадской когорте ВИЧ-инфицированных пациентов (545 человек) [252]. В анализ были включены оба варианта коэффициентов - 2006 и 2010 годов. В

целом, связи между лучшим проникновением АРВП через ГЭБ и лучшим прохождением нейропсихологических тестов установлено не было. Исследования были продолжены в 2011-2012 гг., и на 19-й Конференции по ретровирусам и оппортунистическим инфекциям канадские исследователи представили полученные результаты: вывод о существовании связи между улучшением отдельных когнитивных функций и коэффициентом пенетрации, в отношении других функций нервной системы (двигательные функции) связь была даже негативной и наблюдалось несоответствие между исходами, оцениваемыми по шкалам 2006 и 2010 годов [246].

Британские исследователи изучали взаимосвязь между коэффициентом проникновения препаратов в ЦНС и вероятностью развития оппортунистических заболеваний ЦНС. Устойчивой статистической связи между этими событиями установлено не было [250, 237].

А. Eden и коллеги не обнаружили статистической связи между коэффициентом пенетрации и супрессией вируса в СМЖ, как и с уровнем неоптерина [137]. Из 69 пациентов, асимптоматических с точки зрения поражения ЦНС и с неопределяемой вирусной нагрузкой в крови, у 7 (10%) вирус определялся в СМЖ в количестве 121 (54-213) копий РНК/мл, и зависимости между коэффициентом пенетрации и величиной вирусной нагрузки в СМЖ или уровнем интратекальной иммунной активации не наблюдалось. Таким образом, проблема влияния проникающей способности препаратов на улучшение нейрокогнитивных функций у ВИЧ-инфицированных пациентов требует дальнейшего изучения.

Динамика и период достижения супрессии ВИЧ на фоне ВААРТ в СМЖ может отличаться от показателей, характерных для крови. В исследовании D. Naas с соавторами наблюдалась более медленная динамика падения вирусной нагрузки на фоне терапии в СМЖ, чем крови [107].

Изучение генетических различий между субпопуляциями ВИЧ в крови и СМЖ на фоне ВААРТ и у нелеченых пациентов с диагнозом «ВИЧ-энцефалит» показало, что высокая степень генетических различий наблюдалась только в

группе больных с низким уровнем пенетрации препаратов и автономной репликацией ВИЧ в СМЖ на фоне супрессии в крови [142].

Попытки купировать продолжающуюся интратекральную воспалительную реакцию у пациентов с длительной супрессией вируса (в среднем 6,5 лет) и в крови (в среднем 4,8 копий РНК/мл), и в СМЖ (в среднем менее 2 копий РНК/мл), но с повышенными уровнями неоптерина, β 2-микроглобулина, индекса IgG в СМЖ, путем интенсификации схемы терапии с помощью высокопроникающих антиретровирусных препаратов не приводят к успеху [233]. Таким образом, высокопроникающие схемы ВААРТ не могут остановить постоянную остаточную репликацию вируса на низком уровне и хронический воспалительный процесс в ЦНС.

Большинство исследователей сходятся во мнении, что продолжающаяся репликация вируса в ЦНС на фоне ВААРТ – признак недостаточной эффективности схемы терапии и фактор риска с точки зрения селекции фармакорезистентного варианта вируса. В научной литературе встречаются данные, демонстрирующие случаи различного профиля лекарственной устойчивости в популяциях вируса, полученных у одного и того же больного из крови и СМЖ [141, 106, 121] и в различных отделах головного мозга по данным аутопсии [161]. В некоторых случаях наблюдаются признаки ухудшения неврологических функций на фоне усиления репликации ВИЧ в ЦНС, в том числе из-за формирования фармакорезистентности ВИЧ в этом отделе организма [71].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Отбор ВИЧ-инфицированных больных в исследование производился методом спонтанной выборки среди пациентов, пришедших на прием в Санкт-Петербургский «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями». Основным лимитирующим фактором было согласие пациента на проведение спинномозгового пунктирования. Все участники давали информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения являлись возраст менее 18 лет и старше 60 лет, черепно-мозговые травмы и психические расстройства в анамнезе, признаки органического заболевания ЦНС, текущая зависимость от психоактивных веществ, острые соматические заболевания, беременность.

Диагностика, лечение, получение информированного согласия и включение пациентов в исследование осуществлялись специалистами Санкт-Петербургского «Центра по профилактике и борьбе со СПИД» А.С. Шеломовым, к.м.н. Н.В. Сизовой, к.м.н. О.Н. Леоновой. Клиническую диагностику симптомов поражения ЦНС выполнял врач-невролог. При диагностике нейрокогнитивных расстройств учитывались результаты психологического тестирования пациентов психологами Санкт-Петербургского «Центра по профилактике и борьбе со СПИД» с применением ряда тестов: оценка зрительного восприятия с использованием методики «узнавания предмета по неполным контурам», оценка устойчивости внимания и динамики работоспособности по таблицам Шульте, оценка мнестических процессов по шкале памяти Векслера.

Всего в исследовании приняли участие 139 человек (табл. 2), из них 5 больных обследовались в динамике двукратно, 3 пациента - трехкратно. У 54 пациентов (39,1%) были выявлены клинические признаки ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС (менингит, энцефалит, менингоэнцефалит,

энцефалопатия, судорожный синдром, мозжечковая атаксия, дистальная сенсорная полинейропатия, умеренное и выраженное снижение нейрокогнитивных функций при психологическом тестировании и др.).

Таблица 2

Общая характеристика ВИЧ-инфицированных пациентов, принявших участие в исследовании (по показателям первого визита, n=139)

Характеристики		Значение
Средний возраст (годы)		33,2 (18-60 лет)
Средняя продолжительность заболевания (годы)		7,6 (3 мес. – 15 лет)
Количество пациентов с клиническими признаками поражения ЦНС		54 (39,1%)
Пол	мужчины	95 (68,3%)
	женщины	44 (31,7%)
Путь передачи	половой	54 (38,8%)
	инъекционный	75 (54,0%)
	путь заражения не установлен	10 (7,2%)
Стадия ВИЧ-инфекции	2Б	7 (5,0%)
	2В	1 (0,7%)
	3	6 (4,3%)
	4А	37 (26,6%)
	4Б	19 (13,7%)
	4В	69 (50,0%)
Опыт приема АРВП	Никогда ранее не принимали	104 (74,8%)
	Принимали ранее	14 (10,1%)
	Начали прием АРВП (до 6 мес.)	12 (8,6%)
	Длительно принимают АРВП (более 6 мес.)	9 (6,5%)

Парные образцы крови и СМЖ отбирали у пациентов одновременно во время каждого визита. Всего было получено 150 парных образцов крови и СМЖ.

Время инфицирования устанавливалось ретроспективно на основании данных истории болезни, результатов эпидемиологического расследования и даты получения положительного результата иммуноферментного анализа и/или иммунного блотинга. Предположительное время инфицирования у большинства пациентов можно оценивать только ориентировочно. Продолжительность заболевания варьировала от нескольких месяцев у пациентов с диагностированной 2 стадией ВИЧ-инфекции до 15 лет у пациентов с 4 стадией заболевания.

Выбор СМЖ как биологического материала для диагностики ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС обусловлен следующими подходами:

- исследование СМЖ как материала, отражающего состояние ткани мозга, используется давно и хорошо изучено в отношении поражения ЦНС как инфекционного, так и неинфекционного характера. Такой подход обусловлен особенностями ликворообразования и ликворообмена между тканью мозга и подпаутинным пространством и желудочками мозга, тесной связью между химическим и клеточным составом, стерильностью ликвора и состоянием ткани мозга, а также отсутствием полноценного барьера между тканью мозга и спинномозговой жидкостью. Не являясь полным аналогом мозговой ткани, состояние этой биологической жидкости, тем не менее, может служить чутким барометром состояния ЦНС;
- прижизненное получение образца ткани ЦНС невозможно, и, следовательно, данный вид исследований непригоден для клинического применения;
- посмертный образец (аутопнат) ткани мозга не может отражать истинной интенсивности размножения вируса в ЦНС при жизни больного в силу того, что проницаемость сосудов сразу после смерти значительно

увеличивается, сосудистая стенка перестает быть препятствием для перехода вируса из крови в окружающую ткань и обратно. Кроме того, аутолиз будет сопровождаться быстрой гибелью вирионов, продолжительность полужизни которых *in vivo* составляет по разным оценкам от нескольких минут до нескольких часов [211, 192];

- невозможно ретроспективно провести оценку нейрокогнитивных функций больного после наступления смерти с целью установления взаимосвязи степени их нарушения и интенсивности вирусной репликации в ткани ЦНС;
- определение вирусной нагрузки ВИЧ в биоптатах связано со значительными трудностями оценки объема материала, в котором выполнялось исследование, и, следовательно, невозможностью расчета количества вируса на единицу объема. Кроме того, невозможно обеспечить клеточную однородность образцов тканей при получении биоптатов и исключить попадание в образец крови, содержащей значительное количество вирионов (в том числе в виде участка сосуда).

2.3. Методы исследования

Постановку диагноза ВИЧ-инфекции пациентам, включенным в исследование, осуществляли в соответствии с методическим письмом N 5922-РХ от 10.11.2006 «Правила постановки диагноза ВИЧ-инфекции», утвержденным Минсоцздравразвития РФ [19]. Для оценки клинического статуса больных использовался комплекс диагностических методов: клинический осмотр врача-инфекциониста, клинический осмотр врача-невролога, психологическое тестирование, при необходимости осмотр другими специалистами. Лабораторное обследование включало в себя подтверждение диагноза ВИЧ-инфекции методами ИФА и иммунного блота, а также дополнительные методы для постановки развернутого клинического диагноза:

клинический анализ крови, биохимические, иммунологические, серологические, молекулярно-биологические исследования.

Для выполнения лабораторных молекулярно-биологических исследований образцы крови у больных отбирали в вакуумные одноразовые пробирки с ЭДТА. Центрифугирование и отбор аликвот плазмы в микропробирки осуществляли в течение 4 часов после забора крови. Образцы плазмы до выполнения исследований хранили при температуре - 70°C.

Отбор СМЖ осуществляли в стерильные пробирки с дальнейшим аликвотированием в микропробирки и хранением при температуре - 70°C.

Определение вирусной нагрузки ВИЧ выполняли с использованием автоматизированного комплекса Abbott *m2000 RealTime System*. Исследования проводили с помощью тест-систем Abbott RealTime HIV-1, предназначенных для анализа вирусной нагрузки ВИЧ в плазме крови и обладающих специфичностью по отношению к детекции ВИЧ субтипов А, В, С, D, CRF01_AE, F, CRF02_AG, G группы М и вирусов группы О [244]. Исследование СМЖ проводили по такой же методике, как и для плазмы, так как химический состав и реологические свойства СМЖ позволяют использовать данную методику без дополнительной модификации. Чувствительность метода для плазмы крови составила 40 копий РНК/мл, линейный диапазон измерения от 40 копий РНК/мл (1,6 lg копий РНК/мл) до 10 млн. копий РНК/мл (7 lg копий РНК/мл). В связи с невозможностью получить достаточный объем образцов СМЖ для выполнения исследований с такой же высокой чувствительностью (необходимый аналитический объем образца для получения результата с чувствительностью 40 копий РНК/мл – 0,6 мл), вирусная нагрузка в СМЖ определяли в меньшем объеме образца (0,2 мл) с чувствительностью 150 копий РНК/мл (2,2 lg копий РНК/мл) согласно инструкции по применению тест-системы Abbott RealTime HIV-1. Методика определения вирусной нагрузки ВИЧ в плазме и СМЖ включала в себя следующие этапы:

1. Добавление внутреннего контрольного образца и лизис биологических образцов с помощью лизирующего буфера, содержащего хаотропный агент (гуанидина тиоционат), сопровождающийся разрушением вирусов с высвобождением вирусной РНК.
2. Связывание РНК с магнитными частицами.
3. Осаждение магнитных частиц с РНК и удаление лизирующего буфера.
4. Отмывка от потенциальных ингибиторов полимеразной цепной реакции (ПЦР) (компоненты клеток, соли, лизирующий буфер и др).
5. Получение очищенного препарата РНК путем элюции.
6. Амплификация целевой нуклеотидной последовательности в присутствии внутреннего контроля, включающая в себя первичный этап синтеза кДНК на матрице РНК и дальнейшее накопление целевой ДНК. В качестве целевой ДНК выступает последовательность высококонсервативного региона *pol* ВИЧ-1.
7. Детекция осуществляется в режиме Real-Time путем измерения уровня флюоресценции зондов, связавшихся с целевой ДНК. Количество РНК ВИЧ-1 рассчитывается автоматически с помощью программного обеспечения прибора Abbott 2000rt с использованием калибровочных образцов.

Определение нуклеотидной последовательности гена *pol* ВИЧ проводили с помощью системы генотипирования ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Celera Diagnostics), предназначенной для анализа области генома ВИЧ, включающей ген протеазы (кодоны 1-99) и две трети гена обратной транскриптазы (кодоны 1-335). Мутации в этом регионе генома ВИЧ являются основной причиной лекарственной устойчивости вируса к большинству применяемых в настоящее время антиретровирусных препаратов. Тест-система была верифицирована разработчиками для образцов крови, содержащих ВИЧ субтипа В в концентрации от 2000 до 750000 копий РНК/мл [272].

Образцы крови отбирали в вакуумные одноразовые пробирки с ЭДТА. Центрифугирование и отбор аликвот плазмы в микропробирки осуществляли в течение 4 часов после забора крови. Образцы плазмы и СМЖ аликвотировали и хранили до выполнения исследований в микропробирках при температуре -70°C.

Метод включает в себя следующие этапы:

1. Пробоподготовка:

1.1. Осаждение вирусных частиц из биологического образца объемом 0,3 – 2 мл путем осаждения ультрацентрифугированием при температуре 4°C на скорости 24000g в течение 60 минут;

1.2. Удаление супернатанта и лизис клеток и вирусных частиц с помощью лизирующего буфера, содержащего хаотропный агент (гуанидина тиоционат), сопровождающийся разрушением вирусов с высвобождением вирусной РНК;

1.3. Преципитация вирусной РНК, ее осаждение центрифугированием и дальнейшая отмывка 70% этанолом от потенциальных ингибиторов ПЦР;

1.4. Элюция РНК.

2. Обратная транскрипция (получение нуклеотидной последовательности кДНК длиной 1800 пар нуклеотидов на матрице РНК):

2.1. К 10 мкл полученного препарата РНК добавляли обратную транскриптазу вируса лейкемии мыши, праймер, дитиотриэтол, ингибитор РНКазы и дезоксинуклеотидтрифосфаты. Смесь инкубировали при 42°C в течение 60 минут.

3. Полимеразная цепная реакция (накопление ПЦР-продукта - целевой ДНК ВИЧ):

3.1. К полученной кДНК добавляли ДНК полимеразу AmpliTaq Gold, прямой и обратный праймеры, дезоксинуклеотидтрифосфаты и фермент AmpErase UNG. Дальнейшая ПЦР-реакция включала в себя первичный цикл разрушения ампликонов амперазой (10 мин при 50 °C)

для исключения возможной контаминации и собственно амплификацию ДНК-мишени (40 температурных циклов, включающих в себя следующие температурные полки: 20 сек при 93 °С, 45 сек при 64 °С, 3 мин при 66 °С).

4. Циклическое секвенирование (получение каскада фрагментов целевой ДНК разной длины, отличающихся на один нуклеотид):

4.1. Очистка ПЦР-продукта от нестроившихся дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и праймеров с помощью фильтрации образцов через мембрану микроконцентраторов, задерживающую длинные целевые нуклеотидные последовательности;

4.2. Оценка количества ПЦР-продукта методом горизонтального электрофореза в агарозном геле в присутствии бромистого этидия путем сравнения с подвижностью маркерной ДНК для выбора дальнейшего разведения ПЦР-продуктов;

4.3. Циклическое секвенирование (по Сенгеру) [217] с использованием флуоресцентномеченых терминирующих дидезоксирибонуклеотидтрифосфатов (ддНТФ) BigDye. Секвенирование каждого образца проводили с использованием 7 праймеров, при этом в каждой реакции происходило образование ПЦР-продукта длиной 600-700 пар нуклеотидов, которые в совокупности, частично перекрываясь, покрывали целевой фрагмент гена *pol* ВИЧ длиной 1300 пар нуклеотидов. 12 мкл каждого праймера смешивали с 8 мкл очищенного образца и проводили амплификацию (25 циклов, включающих в себя следующие температурные полки: 10 сек при 96°С, 5 сек при 50°С, 4 мин при 60°С).

5. Очистка продуктов циклического секвенирования:

5.1. Преципитация ПЦР-продуктов изопропанолом путем центрифугирования и удаления супернатанта.

6. Автоматическая детекция нуклеотидных последовательностей ДНК с помощью анализатора ABI Prism 3100-Avant путем капиллярного электрофореза в полиакриламидном геле:

6.1. Очищенные ПЦР-продукты секвенирования ресуспендировали в растворе формамида и денатурировали при 95°C в течение 2 минут. В процессе секвенирования генерируется электрический ток, негативнозаряженные фрагменты каскадной ДНК, полученной в реакции циклического секвенирования, мигрируют в полиакриламидном геле внутри капилляра. Скорость миграции соответствует длине фрагмента. Каждый из 4 терминирующих ддНТФ содержит свою метку, флюоресценция которой возбуждается аргоновым лазером прибора и детектируется CCD камерой. Короткие фрагменты мигрируют первыми, каждый последующий длиннее предыдущего на один нуклеотид и прибор последовательно фиксирует флюоресцентные метки, соответствующие одному из четырех нуклеотидов. Далее с помощью программного обеспечения виртуально выстраивается полученная нуклеотидная последовательность.

Методика расшифровки нуклеотидной последовательности гена с помощью капиллярного электрофореза, применявшаяся в данном исследовании, способна определять генетические варианты ВИЧ, которые составляют более 20-25% от количества вирусов в биологическом образце.

Дальнейшую интерпретацию полученных нуклеотидных последовательностей ВИЧ для получения профиля лекарственной устойчивости вируса выполняли согласно современным международным рекомендациям и российским нормативным документам. В России нормативным документом, устанавливающим правила проведения тестирования лекарственной устойчивости ВИЧ, являются МР №5956-РХ от 06.08.2007 «Определение чувствительности вируса иммунодефицита человека к лекарственным препаратам» [18]. Кроме того, при анализе фармакорезистентности ВИЧ учитывали международные стандарты диагностики и лечения [104],

определяющие показания к тестированию, методы и способы интерпретации результатов.

В данном исследовании для анализа мутаций и получения заключения о профиле фармакорезистентности применяли программное обеспечение базы данных HIVdbProgram: SequenceAnalysis Стэнфордского университета (URL: <http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra>) [219, 151, 224].

Субтипирование ВИЧ проводили с применением on-line программы Rega HIV-1 Subtyping Tool (URL: <http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping>) [31, 247]. Для оценки генетических дистанций между последовательностями и построения филогенетических деревьев использовался программный пакет Mega 5.05 [187, 188, 173]. Построение филогенетических деревьев осуществляли с помощью метода ближайших соседей (neighbor-joining method) [216]. Референсные нуклеотидные последовательности субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ были получены с сайта базы данных ВИЧ Национальной лаборатории Лос-Аламоса (URL: <http://www.hiv.lanl.gov/content/index>). Сравнение последовательности нуклеотидов в изучаемых областях генома ВИЧ, полученных из парных образцов плазмы и СМЖ, выполняли с применением программы CLC Sequence Viewer (URL: <http://www.clcbio.com/products/clc-sequence-viewer>).

Для оценки количества CD4⁺-лимфоцитов образцы крови отбирали в вакуумные одноразовые пробирки с ЭДТА.

Оценку количества CD4⁺-лимфоцитов в крови выполняли методом проточной цитофлюориметрии по одноплатформенной технологии на проточном цитометре Becton Dickinson FACS Calibur с использованием реагента TriTEST CD3/CD4/CD45 в пробирках TruCount. Реагент предназначен для идентификации и определения процентного и абсолютного содержания зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺) и Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), являющихся субпопуляцией Т-лимфоцитов и экспрессирующих антиген CD4, в цельной крови человека с лизированными эритроцитами по безотмывочной технологии. Исследуемый образец крови вносили в пробирку, содержащую осадок

референсных флюоресцирующих частиц с известной концентрацией. После инкубации с моноклональными антителами, мечеными флюорохромами, окрашенные образцы крови обрабатывали лизирующим раствором для разрушения эритроцитов и анализировали на проточном цитометре. Методика основана на том, что окрашенный образец через пробозаборник вводится в проточный цитометр и проходит в узком потоке омывающей жидкости через путь лазерного луча. В результате возбуждения лазерным лучом меченые флюорохромом клетки флюоресцируют, и испускаемые сигналы собираются и детектируются проточным цитометром. Использование 3 флюорохромов позволяет проводить одновременный трехцветный анализ, поскольку эмиссия каждого флюорохрома происходит на различных длинах волн. Абсолютное число положительно прореагировавших клеток определяется путем сравнения уровней флюоресценции на клетках и референсных частицах. Данные флюоресценции анализируются автоматически с помощью программного обеспечения и выражаются в процентном отношении (% положительно прореагировавших клеток в популяции лимфоцитов) или в виде абсолютного значения (число положительно прореагировавших клеток в микролитре крови).

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программы SAS 9.3 (SAS Institute Inc., США). Различия признавали значимыми при критическом уровне вероятности принятия «нулевой гипотезы» $p \leq 0,05$. Поскольку в большинстве случаев данные не подчинялись нормальному распределению, для статистического анализа использовали непараметрические (робастные) методы статистики.

При статистическом анализе были использованы следующие методы:

- методы описательной статистики;
- проверка нормального распределения данных (тесты Шапиро-Уилка, Колмогорова-Смирнова) для выбора методов статистической оценки;
- ранговая корреляция Спирмена для обнаружения статистически значимой взаимосвязи между явлениями;

- сравнение выборок с помощью точного критерия Фишера (при числе значений менее 5);
- робастная регрессия для оценки направления и степени зависимости между явлениями;
- непараметрический однофакторный дисперсионный анализ: критерий Манна-Уитни для сравнения двух независимых выборок, критерий Краскела-Уоллиса для сравнения средних значений в трех и более независимых выборках;
- логистическая регрессия, построение ROC-кривых для оценки клинической эффективности применения лабораторных исследований при диагностике ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС;
- индекс Юдена для определения порога принятия клинического решения при диагностике ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС с помощью изучаемых лабораторных методов исследования.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА CD4⁺-ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ, ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИЧ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ПАРНЫХ ОБРАЗЦОВ КРОВИ И СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

3.1. Результаты определения изучаемых показателей в обследуемой группе ВИЧ-инфицированных пациентов

В исследовании приняли участие 139 пациентов, из них 5 человек обследовались в динамике двукратно, 3 пациента обследовались трехкратно. Парные образцы крови и СМЖ отбирались у пациентов во время каждого визита. Всего было проанализировано 150 парных образцов крови и СМЖ (табл. 3).

Таблица 3

Средние величины исследуемых показателей у ВИЧ-инфицированных пациентов (по данным первого визита)

Исследуемый показатель	Среднее значение* (95% ДИ)
Количество CD4 ⁺ -лимфоцитов в крови (клеток/мкл, n=139)	101 (71-133)
Уровень вирусной нагрузки ВИЧ в крови (lg копий РНК/мл, n=139)	5,3 (5,1-5,4)
Уровень вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ (lg копий РНК/мл, n=139)	3,7 (3,5-4,0)
Количество однонуклеотидных замен при сравнении нуклеотидных последовательностей гена <i>pol</i> ВИЧ, выявленного в крови и СМЖ (n=105)	20 (17-23)

* в связи с отсутствием нормального распределения полученных показателей здесь и далее указаны усеченные средние величины.

Результаты определения количества CD4⁺-лимфоцитов в крови, уровней вирусной нагрузки ВИЧ в плазме крови и СМЖ удалось получить для всех 150 парных образцов.

Количество CD4⁺-лимфоцитов в крови составляло от 1 клетки/мкл до 862 клеток/мкл. Вирусная нагрузка ВИЧ в плазме крови колебалась от неопределяемой (ниже границы аналитической чувствительности теста 1,60 lg копий РНК/мл) до 6,78 lg копий РНК/мл, в спинномозговой жидкости – от неопределяемой до 6,08 lg копий РНК/мл.

Генотипирование ВИЧ удалось провести в образцах СМЖ, содержащих ВИЧ в количестве от 63 до 1213678 копий РНК/мл (1,80 – 6,08 lg копий РНК/мл), в плазме крови – при вирусной нагрузке ВИЧ от 104 до 6081295 копий РНК/мл (2,01 – 6,78 lg копий РНК/мл). Нуклеотидные последовательности гена *pol* ВИЧ из образцов крови при первом визите были получены у 131 пациента, из образцов СМЖ – у 106 пациентов. Удалось получить 108 парных нуклеотидных последовательностей гена *pol* вирусов, циркулирующих в крови и СМЖ, в том числе 105 - при первом визите и 3 - при повторных визитах, в остальных случаях генотипирование было выполнено только в крови или только в СМЖ, либо результаты невозможно было получить в обоих образцах. Невозможность проведения генотипирования ВИЧ была связана с тем, что вирусная нагрузка ВИЧ в образце крови и/или СМЖ не достигала уровней, необходимых для выполнения анализа, либо объема полученного образца СМЖ было недостаточно для проведения исследования.

При повторных визитах парные нуклеотидные последовательности были получены только у 2 из 6 человек, так как остальные пациенты достигли супрессии вируса в крови и/или в СМЖ в процессе ВААРТ, и выполнение этого исследования стало невозможным.

Количество однонуклеотидных замен при сравнении нуклеотидных последовательностей гена *pol* ВИЧ в парных образцах крови и СМЖ колебалось от нуля до 65.

Во всех случаях результаты определения субтипа ВИЧ в образцах крови и парных образцах СМЖ совпадали между собой. У 6 человек не удалось определить субтип ВИЧ из-за невозможности получения нуклеотидной последовательности генома ВИЧ из крови и/или СМЖ в связи с низкой вирусной нагрузкой. Из 133 обследованных пациентов, для которых удалось получить нуклеотидную последовательность гена *pol* ВИЧ в крови и/или СМЖ, 88,0% (117) были инфицированы субтипом А1, 11,2% (15) - субтипом В и 0,8% (1) циркулирующей рекомбинантной формой CRF 06_crx (рис. 6).

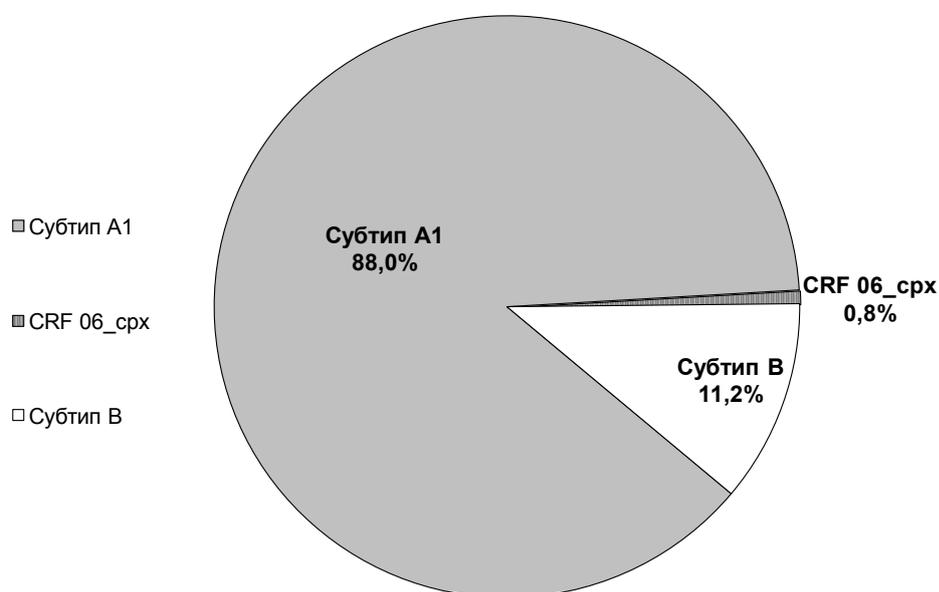


Рис. 6. Субтипы ВИЧ, выявленные при обследовании ВИЧ-инфицированных пациентов (n=133)

Результаты проведенных исследований показали, что уровень вирусной нагрузки ВИЧ в спинномозговой жидкости варьирует в таком же широком диапазоне, как и в крови. Консенсусная нуклеотидная последовательность гена *pol* ВИЧ, характеризующая ВИЧ в спинномозговой жидкости имеет отличия (однонуклеотидные замены) от нуклеотидной последовательности вирусов, циркулирующих в крови.

3.2. Вирусная нагрузка ВИЧ в спинномозговой жидкости на фоне высокоактивной антиретровирусной терапии

Среди обследованных пациентов 21 принимали антиретровирусные препараты на момент участия в исследовании, 104 больных никогда ранее не принимали АРВП. С целью изучения влияния ВААРТ на исследуемые показатели был проведен сравнительный анализ содержания CD4⁺-лимфоцитов в крови и уровней вирусной нагрузки ВИЧ в плазме крови и СМЖ в группах пациентов с разным опытом приема терапии (табл. 4). По нашим наблюдениям у больных, принимающих ВААРТ, разница между вирусной нагрузкой ВИЧ в плазме крови и СМЖ была значительно меньше, чем у не принимавших АРВП больных.

Таблица 4

Показатели содержания CD4⁺-лимфоцитов в крови и концентрации ВИЧ в крови и СМЖ в зависимости от опыта приема антиретровирусных препаратов (усеченные средние величины с 95% ДИ, n=125)

Опыт приема АРВП	Концентрация ВИЧ в крови (lg копий РНК/мл)	Концентрация ВИЧ в СМЖ (lg копий РНК/мл)	Разница между концентрацией ВИЧ в крови и СМЖ (lg копий РНК/мл)	Количество CD4 ⁺ -лимфоцитов в крови (клеток/мкл)
Никогда не принимали АРВП (n=104)	5,4 (5,3-5,6)*	3,8 (3,5-4,0)	1,5 (1,3-1,8)*	97 (58-136)
Начали ВААРТ (6-127 дней приема) (n=12)	3,5 (2,8-4,2)*	3,2 (1,9-4,5)	0,4 (-0,3-1,0)*	153 (60-245)
Длительно принимают ВААРТ (более 199 дней) (n=9)	1,6 (0,1-3,2)*	1,7 (0-3,4)**	-0,4 (-0,9-0,1)*	265 (150-380)**

* статистически значимые различия между всеми группами (p<0,05, критерий Манна-Уитни).

** статистически значимые различия между группой пациентов, длительно принимающих ВААРТ, и группами начинающих ВААРТ и никогда не принимавших АРВП (p<0,05, критерий Манна-Уитни).

У ряда больных на фоне длительного (более 6 месяцев) приема ВААРТ обнаруживались дискордантные результаты, когда количество вируса в СМЖ превышало его концентрацию в крови (рис. 7). В группе пациентов, длительно принимающих ВААРТ, признаки поражения ЦНС были обнаружены в 83% случаев (10/12). По данным научных публикаций для таких больных характерно медленное снижение вирусной нагрузки в СМЖ на фоне ВААРТ [92].

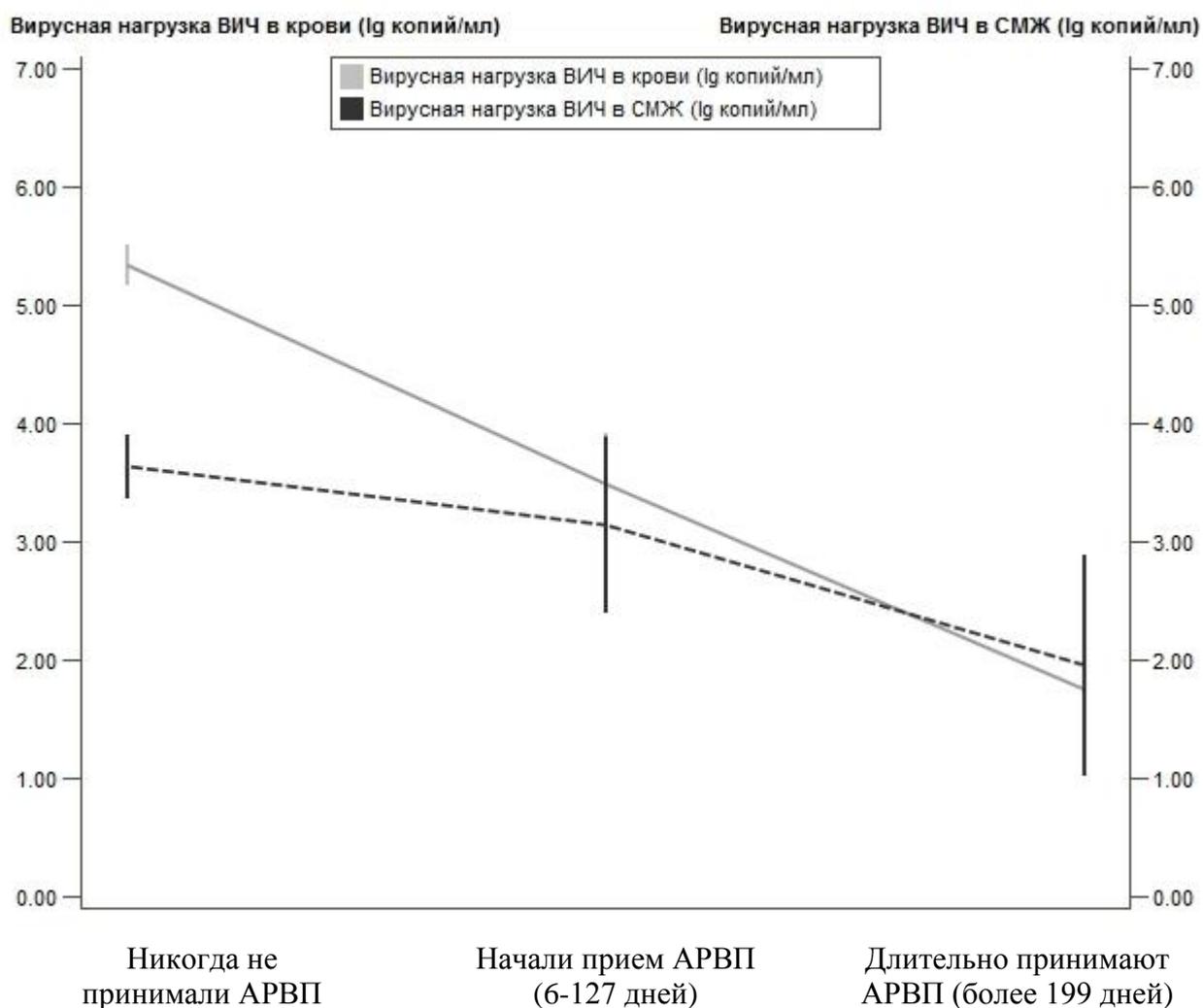


Рис. 7. Сравнение средних показателей вирусной нагрузки ВИЧ в крови и СМЖ в группах пациентов с разным опытом приема АРВП

Результаты исследования уровня вирусной нагрузки ВИЧ в крови и спинномозговой жидкости у пациентов до и на фоне ВААРТ показали, что

прием антиретровирусных препаратов приводит к снижению количества вируса и в крови, и в ликворе, однако динамика супрессии вирусов в этих биологических жидкостях значительно различается. У пациентов, принимающих ВААРТ, разница между вирусными нагрузками ВИЧ в крови и ликворе была значительно меньше, чем у нелеченых пациентов, достигая отрицательных значений в группе больных с опытом приема препаратов более полугода. В связи с недостаточным количеством пациентов, обследованных проспективно до и после назначения ВААРТ, было невозможно установить ориентировочные сроки наступления супрессии репликации ВИЧ в СМЖ.

3.3. Анализ взаимосвязи между исследуемыми показателями, продолжительностью и стадией заболевания ВИЧ-инфекцией

Поскольку прием антиретровирусных препаратов оказывает значительное влияние на содержание $CD4^+$ -лимфоцитов в крови и уровень вирусной нагрузки, как в крови, так и в СМЖ, для дальнейшего статистического анализа были отобраны результаты, полученные у пациентов, не имевших опыта приема АРВП (табл. 5).

В результате анализа была выявлена статистически значимая взаимосвязь показателей вирусной нагрузки ВИЧ в крови и количества $CD4^+$ -лимфоцитов и их корреляция со стадией или продолжительностью заболевания ($p < 0,05$). Вирусная нагрузка ВИЧ в СМЖ находилась в корреляционной связи слабой степени с вирусной нагрузкой в крови ($r = 0,3$, $p < 0,01$) и не коррелировала с количеством $CD4^+$ -лимфоцитов в крови, продолжительностью заболевания и стадией ВИЧ-инфекции ($p > 0,05$).

Статистическая зависимость между исследуемыми лабораторными показателями и некоторыми клиническими характеристиками заболевания ВИЧ-инфекцией (в ячейках таблицы указаны значения коэффициента корреляции Спирмена, $n=104$)

	Вирусная нагрузка ВИЧ в крови	Вирусная нагрузка ВИЧ в СМЖ	Количество CD4 ⁺ -лимфоцитов в крови	Количество однонуклеотидных замен в парных последовательностях гена <i>pol</i> ВИЧ
Вирусная нагрузка ВИЧ в крови	-	0,31*	-0,34*	0,07
Вирусная нагрузка ВИЧ в СМЖ	0,31*	-	0,13	-0,01
Количество CD4 ⁺ -лимфоцитов в крови	-0,34*	0,13	-	-0,54*
Количество однонуклеотидных замен в парных последовательностях гена <i>pol</i> ВИЧ	0,07	-0,01	-0,51*	-
Продолжительность заболевания	0,1	0,15	-0,47*	0,60*
Стадия ВИЧ-инфекции	0,23*	0,13	-0,50*	0,37*

* обнаружена статистически значимая связь между показателями ($p<0,05$, непараметрический однофакторный дисперсионный анализ)

В группе не принимавших АРВП пациентов ($n=104$) вирусная нагрузка в крови колебалась от 2,7 до 6,8, составляя в среднем 5,4 lg копий РНК/мл (95% ДИ 5,3 – 5,6), в СМЖ – от неопределяемой до 6 lg копий РНК/мл, в среднем 3,8 lg копий РНК/мл (95% ДИ 3,5 – 4,0). В среднем в крови вирусная нагрузка была выше, чем в СМЖ, на 1,5 lg копий РНК/мл ($p<0,05$). Подъем вирусной нагрузки в крови на 1 lg копий РНК/мл соответствовал росту вирусной нагрузки в СМЖ только на 0,37 lg (робастная регрессия, $p=0,04$) (рис. 8).

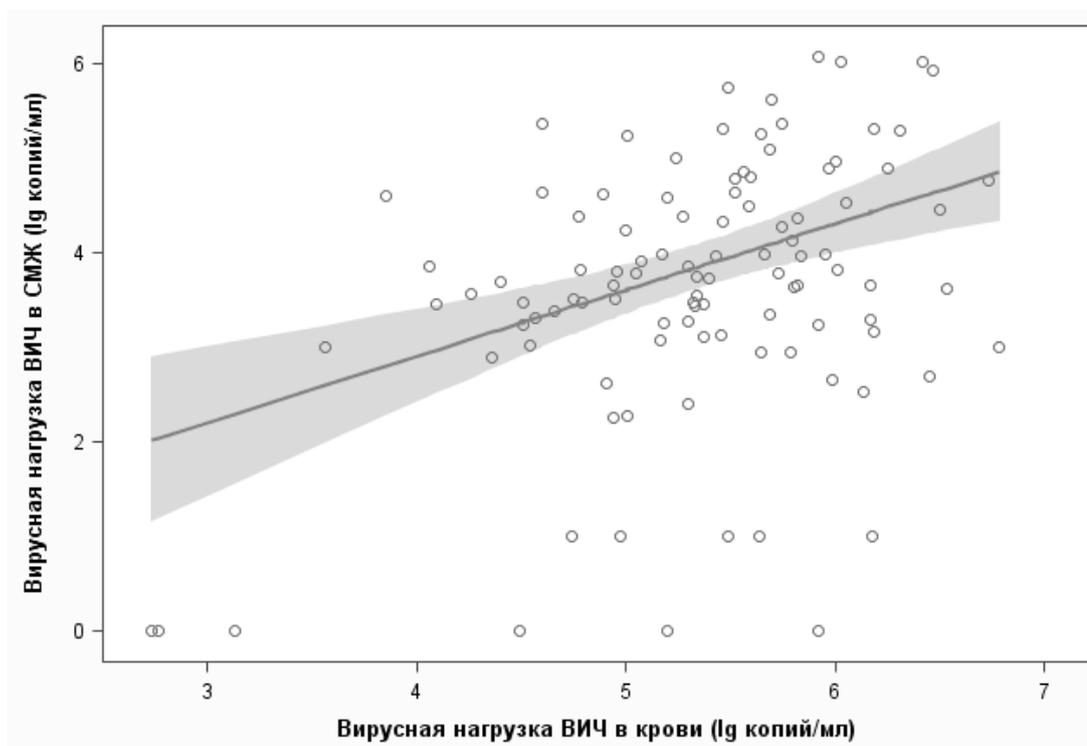


Рис. 8. График соотношения уровней вирусной нагрузки в образцах спинномозговой жидкости и крови у не принимавших антиретровирусных препаратов пациентов (робастная регрессия с зоной 95% доверительного интервала, $n=104$)

Преобладание уровня вирусной нагрузки ВИЧ в крови над количеством ВИЧ в СМЖ было выявлено у большинства больных - 89,4% (93/104). Однако среди этих пациентов у 26,9% (25/93) наблюдалось значительное увеличение разницы между уровнями вирусной нагрузки ВИЧ в крови и СМЖ по сравнению со средним значением: от 2,5 lg копий РНК/мл и более, вплоть до полного отсутствия вируса в СМЖ на фоне большого количества ВИЧ в крови (более 4 lg копий РНК/мл). Среди этих больных только у одного (4%) были обнаружены признаки поражения ЦНС.

У остальных 10,6% (11/104) не принимавших АРВП пациентов количество вирусов в СМЖ было равным или превышало вирусную нагрузку в крови (учитывая величину стандартного отклонения 0,25 lg, полученного производителем при валидации тест-системы и указанного в инструкции). Из

них 81,8% (9/11) принадлежали к когорте пациентов с признаками поражения ЦНС.

Таким образом, вирусная нагрузка ВИЧ в крови была в среднем выше на 1,5 lg копий РНК/мл, чем в СМЖ. У 35% больных были выявлены значительные отличия от среднего значения разницы между уровнями вирусной нагрузки ВИЧ в крови и СМЖ. Сокращение разницы между количеством ВИЧ в крови и СМЖ наблюдалось преимущественно у больных с клиническими признаками поражения ЦНС.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРНЫХ ОБРАЗЦОВ КРОВИ И СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ С ВИЧ-АССОЦИИРОВАННЫМИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИМИ РАССТРОЙСТВАМИ

4.1. Изучение взаимосвязи между наличием ВИЧ-ассоциированного поражения центральной нервной системы и субтипом ВИЧ, количеством CD4⁺-лимфоцитов в крови, уровнем вирусной нагрузки ВИЧ в плазме крови и спинномозговой жидкости

Нуклеотидная последовательность гена *pol* ВИЧ была получена у 49 больных с клиническими признаками поражения ЦНС и у 84 пациентов без неврологических нарушений (табл. 6)

Таблица 6

Частота выявления различных субтипов ВИЧ у пациентов с наличием и без клинических признаков поражения ЦНС

Субтипы ВИЧ	Пациенты с симптомами поражения ЦНС (n=49)	Пациенты без симптомов поражения ЦНС(n=84)
Субтип А1	45 (91,9%)	72 (85,7%)
Субтип В	3 (6,1%)	12 (14,3%)
Циркулирующая рекомбинантная форма CRF 06_crx	1 (2%)	-

Статистический анализ зависимости частоты выявления ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС от субтипа ВИЧ был проведен только для пациентов с субтипами А (117 человек) и В (15 человек), так как CRF 06_crx была обнаружена только у одного пациента. Частота выявления различных субтипов ВИЧ у пациентов с признаками поражения ЦНС и у больных без таких симптомов не отличалась (точный критерий Фишера, $p > 0,05$).

В целях изучения взаимосвязи результатов выполненных исследований с наличием у пациентов ВИЧ-ассоциированных нейрокогнитивных нарушений

для дальнейшего статистического анализа были отобраны результаты, полученные у больных, не имевших опыта приема АРВП, чтобы исключить влияние терапии на уровень этих показателей.

Наличие у пациента клинических признаков поражения ЦНС было статистически значимо взаимосвязано с уровнем вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ (логистическая регрессия, $p < 0,0001$) и не связано с содержанием $CD4^+$ -лимфоцитов или уровнем вирусной нагрузки ВИЧ в крови (логистическая регрессия, $p > 0,05$).

При сравнении результатов исследований у пациентов с симптомами поражения ЦНС и без таких признаков были обнаружены статистически значимые отличия. У пациентов с неврологическими расстройствами уровень вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ был в среднем выше на 1,4 lg копий РНК/мл ($p < 0,0001$), несмотря на то, что средние показатели количества $CD4^+$ -лимфоцитов и вирусной нагрузки ВИЧ в крови в обеих группах больных не отличались ($p > 0,05$) (табл. 7). Разница между вирусной нагрузкой ВИЧ в крови и СМЖ у пациентов с неврологическими нарушениями составляла всего 0,8 lg копий РНК/мл.

Следует отметить, что средняя продолжительность заболевания ВИЧ-инфекцией в группе пациентов с нейрокогнитивными нарушениями оказалась выше, что отражает возрастание риска возникновения нейрокогнитивных расстройств с увеличением продолжительности заболевания при отсутствии антиретровирусной терапии.

Выполненный анализ показал, что, несмотря на сходные показатели содержания $CD4^+$ -лимфоцитов и количества ВИЧ в крови, у ВИЧ-инфицированных больных с клиническими признаками поражения ЦНС уровень вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ на 1,4 lg копий РНК/мл больше по сравнению с пациентами без симптомов нарушения функций ЦНС ($p < 0,0001$). Разница между вирусной нагрузкой ВИЧ в крови и СМЖ при наличии нейрокогнитивных нарушений сокращалась до 0,8 lg копий РНК/мл по сравнению с 1,9 lg копий РНК/мл в группе больных без признаков поражения

ЦНС. Наличие ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС статистически не связано с субтипом ВИЧ, содержанием CD4⁺-лимфоцитов или уровнем вирусной нагрузки ВИЧ в крови,

Таблица 7

Средние величины количества CD4⁺-лимфоцитов в крови и вирусной нагрузки ВИЧ в крови и СМЖ в группах пациентов с наличием и без неврологических нарушений (по данным первого визита у не принимавших АРВП пациентов, n=104)

Группа пациентов Наименование исследования	Пациенты с неврологическими нарушениями, средняя величина с 95% ДИ (n=34)	Пациенты без неврологических нарушений, средняя величина с 95% ДИ (n=70)	p-уровень, однофакторный дисперсионный анализ, критерий Манна-Уитни
Количество CD4 ⁺ -лимфоцитов в крови (клеток/мкл)	74 (14-133)	107 (49-165)	p=0,66
Концентрация ВИЧ в крови (lg копий РНК/мл)	5,6 (5,3-5,8)	5,3 (5,1-5,5)	p=0,08
Концентрация ВИЧ в СМЖ (lg копий РНК/мл)	4,8 (4,5-5,2)	3,4 (3,2-3,6)	p<0,0001
Разница между концентрациями ВИЧ в крови и СМЖ (lg копий РНК/мл)	0,8 (0,4-1,1)*	1,9 (1,6-2,2)*	p<0,0001
Продолжительность заболевания ВИЧ-инфекцией (годы)	9,0 (7,3-10,7)	4,9 (2,6-7,2)	p=0,02

4.2. Оценка клинической информативности тестирования уровня вирусной нагрузки ВИЧ в спинномозговой жидкости для диагностики ВИЧ-ассоциированного поражения центральной нервной системы

Так как была установлена статистическая зависимость между уровнем вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ и выявлением признаков поражения ЦНС далее была проведена оценка возможности применения определения количества ВИЧ в СМЖ для лабораторной диагностики ВИЧ-

ассоциированного поражения ЦНС. Оценка клинической информативности определения вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ для выявления ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС проводилась в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53022.3-2008 «Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Правила оценки клинической информативности тестов». Оценка диагностической эффективности применения результатов изучаемых тестов и выбор теста с большей дискриминирующей способностью для диагностики ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС проводились с построением кривых оперативной характеристики каждого лабораторной теста (ROC-кривые) для выявления метода с наибольшей площадью под кривой (AUC) [1]. Анализ кривой оперативной характеристики лабораторного теста (ROC-кривая) показал, что метод определения количества ВИЧ в СМЖ обладает хорошей клинической информативностью (AUC=0,85 - «очень хорошая прогностическая модель», $p < 0,0001$) для выявления у больных ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС.

Определение порога клинического решения при интерпретации результатов исследования, то есть числового значения количества ВИЧ в СМЖ, являющегося критерием наличия признаков поражения ЦНС, проводилось с помощью индекса Юдена. Был установлен уровень вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ, при котором наблюдалось оптимальное соотношение диагностической чувствительности и специфичности теста. Статистический анализ показал, что уровень вирусной нагрузки ВИЧ в образце СМЖ, равный или превышающий $4,00 \lg$ копий РНК/мл (10000 копий РНК/мл), свидетельствовал о значительной вероятности наличия у пациентов ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС ($p < 0,0001$).

Определение вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ с порогом принятия клинического решения на уровне $4,00 \lg$ копий РНК/мл обладало следующими характеристиками диагностического лабораторного теста (табл. 8):

1. Выявление в СМЖ уровня вирусной нагрузки ВИЧ, равного или превышающего $4,00 \lg$ копий РНК/мл (10000 копий РНК/мл), обладало

диагностической чувствительностью 76% и диагностической специфичностью 84% в отношении наличия у пациента ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС.

2. Вероятность обнаружения у больного ВИЧ-ассоциированного нейрокогнитивного расстройства (прогностическая ценность положительного результата) при вирусной нагрузке ВИЧ в СМЖ, равной или превышающей 4,00 lg копий РНК/мл, составила 70%.

Таблица 8

Характеристика определения уровня вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ как лабораторного теста для диагностики ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС (положительный результат определяется как вирусная нагрузка ВИЧ в СМЖ, равная или превышающая 4,00 lg копий РНК/мл)

Характеристики диагностического теста	Значение
Диагностическая чувствительность, %	76%
Диагностическая специфичность, %	84%
Положительная прогностическая ценность, %	70%
Отрицательная прогностическая ценность, %	88%
Диагностическая эффективность теста, %	82%
Отношение правдоподобия для положительного результата	4,9
Отношение правдоподобия для отрицательного результата	0,3
Отношение шансов (OR) ($p < 0,0001$)	17,1 (95%ДИ 6,2-47,6)

3. Вероятность отсутствия у больного ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС (прогностическая ценность отрицательного результата) при вирусной нагрузке ВИЧ в СМЖ меньше 4,00 lg копий РНК/мл составила 88%.

4. Диагностическая эффективность теста (процент истинных результатов к общему числу полученных результатов) составила 82%. Истинность результатов, то есть наличие или отсутствие поражения ЦНС, определяли по клиническим критериям.

5. Вероятность обнаружить ВИЧ-ассоциированное поражение ЦНС при выявлении у ВИЧ-инфицированных пациентов вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ, равной или большей 4,00 lg копий РНК/мл, в 4,9 раза выше, чем получить такой же результат при отсутствии нейрокогнитивных нарушений (отношение правдоподобия для положительного результата).

6. Шансы обнаружить ВИЧ-ассоциированное поражение ЦНС при выявлении у ВИЧ-инфицированных пациентов вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ, равной или большей 4,00 lg копий РНК/мл, в 17 раз выше, чем диагностировать нейрокогнитивные нарушения у пациентов с вирусной нагрузкой в СМЖ менее 4,00 lg копий РНК/мл (отношение шансов OR, $p < 0,0001$).

Таким образом, методика определения уровня вирусной нагрузки ВИЧ в образцах спинномозговой жидкости может применяться для оптимизации алгоритма диагностики ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС, дифференциальной диагностики с нейрокогнитивными нарушениями неинфекционной этиологии. Порогом принятия клинического решения является уровень вирусной нагрузки ВИЧ в образце СМЖ, равный или превышающий 4,00 lg копий РНК/мл, что свидетельствует о значительной вероятности наличия у пациента ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС. Высокая степень ассоциации уровня вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ, превышающего 4,00 lg копий РНК/мл, с наличием признаков поражения ЦНС требует дальнейшего изучения, как показания для назначения ВААРТ.

ГЛАВА 5. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИЧ В ПАРНЫХ ОБРАЗЦАХ КРОВИ И СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

5.1. Сравнительный анализ парных нуклеотидных последовательностей гена *pol* ВИЧ

По литературным данным между тканевыми субпопуляциями вирусов могут существовать различия в степени чувствительности к антиретровирусным препаратам. В основе этих различий лежат мутации в геноме вирусов. Поскольку несовпадение профилей лекарственной устойчивости ВИЧ представляет собой только частный случай различий в геноме ВИЧ, мы предварительно оценили степень генетического расхождения вирусов, полученных из крови и СМЖ. Степень генетических различий (эволюционной дистанции) между вирусами в различных отделах и тканях организма может быть оценена как количество однонуклеотидных замен при сравнении парных нуклеотидных последовательностей одного и того же вирусного гена, полученного из разных биологических образцов [17]. Для оценки генетических различий между вирусами, циркулирующими в крови и СМЖ, был проведен анализ всех полученных парных нуклеотидных последовательностей у ранее не принимавших АРВП пациентов.

У обследованных пациентов при сравнении парных нуклеотидных последовательностей гена *pol* ВИЧ, полученных из крови и СМЖ, обнаруживалось до 65 нуклеотидных замен, что, возможно, являлось следствием эволюционной дивергенции вирусов в тканях, разделенных гистогематическим барьером. Согласно теории «молекулярных часов» количество различий пропорционально времени, прошедшего после расхождения от общего предка [240]. В подтверждение этой теории у не принимавших АРВП пациентов количество однонуклеотидных замен находилось в прямой зависимости от продолжительности заболевания ВИЧ-инфекцией ($r=0,60$, $p<0,0001$). При увеличении продолжительности заболевания

на 1 год количество однонуклеотидных замен в геномах вирусов, циркулирующих в крови и СМЖ, увеличивалось на 2 нуклеотидных замены (робастная регрессия, $p < 0,0001$) (рис. 9).

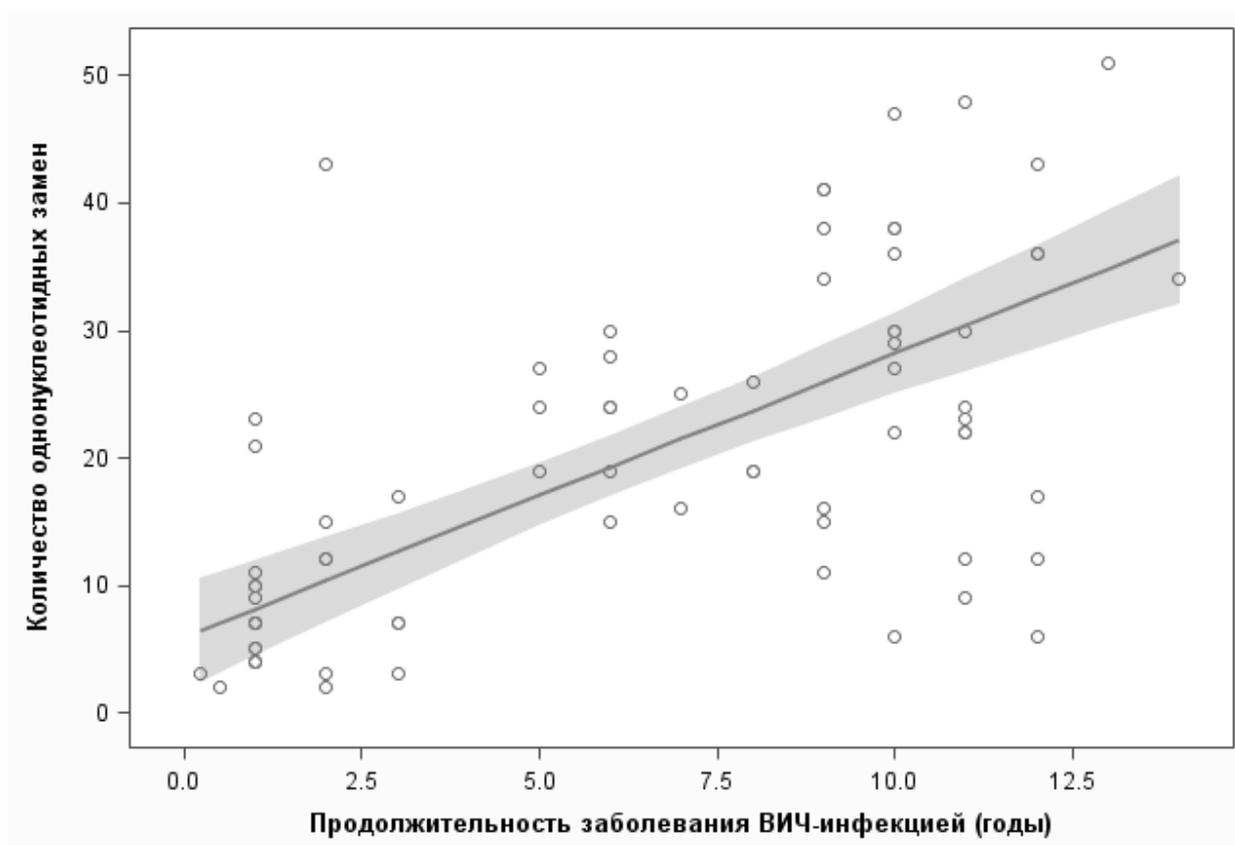


Рис. 9. Зависимость между количеством однонуклеотидных замен в парных нуклеотидных последовательностях гена *pol* ВИЧ и продолжительностью заболевания ВИЧ-инфекцией (робастная регрессия с зоной 95% доверительного интервала, $n=82$)

Эволюционная дивергенция вирусов в крови и ЦНС с увеличением продолжительности заболевания ВИЧ-инфекцией подтверждалась также обратной статистической зависимостью между количеством однонуклеотидных замен в парных нуклеотидных последовательностях гена *pol* и уровнем $CD4^+$ -лимфоцитов в крови ($r = -0,54$, $p < 0,0001$): при снижении $CD4^+$ -лимфоцитов в крови на 100 клеток количество замен увеличивалось на 3 замены (робастная регрессия, $p < 0,0001$) (рис. 10). Очевидно, что выявленная зависимость является

опосредованной, так как количество $CD4^+$ -лимфоцитов в крови падает с увеличением продолжительности заболевания.

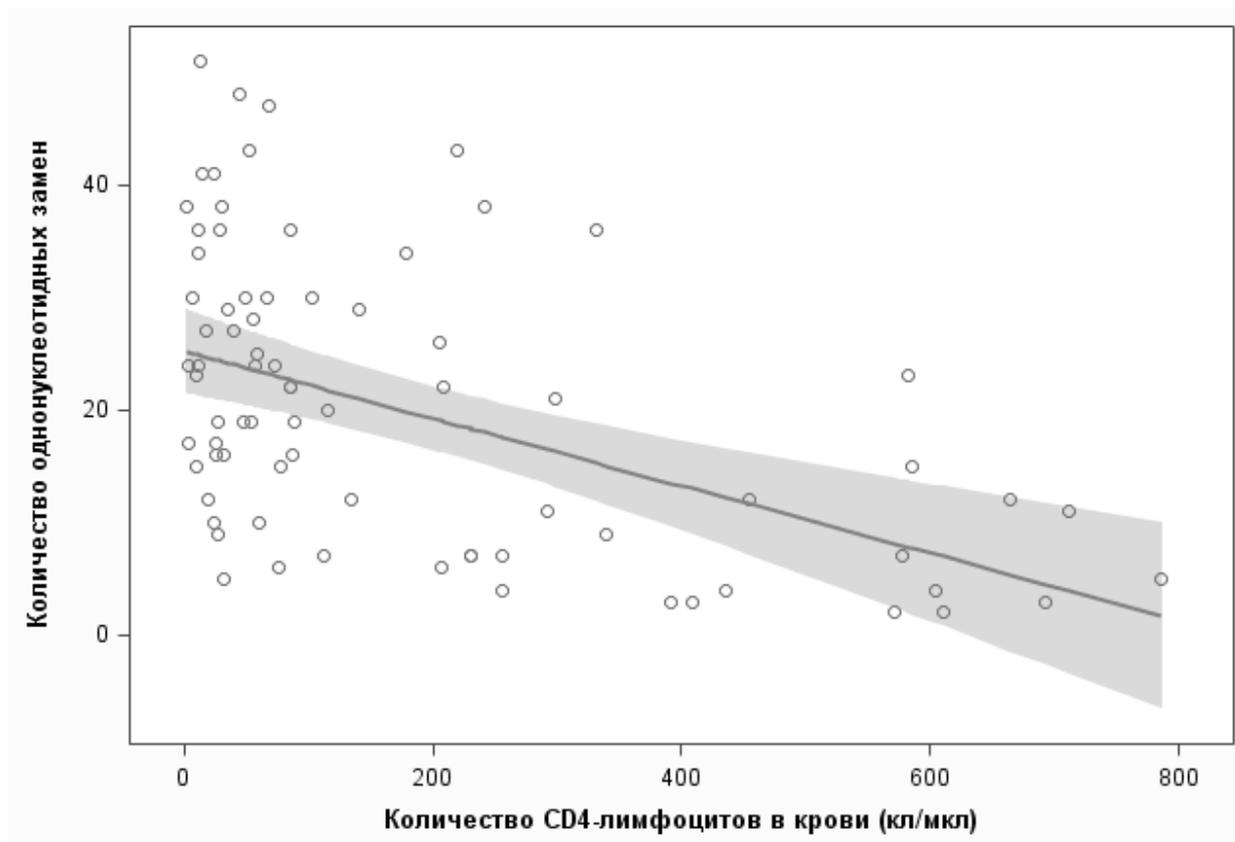


Рис. 10. Зависимость между количеством однонуклеотидных замен в парных нуклеотидных последовательностях гена *pol* ВИЧ и содержанием $CD4^+$ -лимфоцитов в крови (робастная регрессия с зоной 95% доверительного интервала, $n=82$)

Рост количества однонуклеотидных замен в парных образцах генома ВИЧ с увеличением продолжительности заболевания, вероятно, связан с независимой эволюцией субпопуляции ВИЧ, относительно изолированной в ткани ЦНС из-за наличия гематоэнцефалического барьера. Полученные результаты свидетельствует о том, что вирусы, локализованные в ткани ЦНС, могут обладать генетическими и, соответственно, фенотипическими отличиями от вирусов, циркулирующих в крови.

5.2. Анализ парных аминокислотных последовательностей, кодируемых геном *pol*, и профилей лекарственной устойчивости ВИЧ

Вследствие вырожденности генетического кода, некоторые нуклеотидные замены являются синонимичными и не приводят к замене аминокислоты в соответствующей позиции. При оценке различий в кодируемых геном *pol* парных аминокислотных последовательностях белков были обнаружены закономерности, сходные с полученными при анализе нуклеотидных последовательностей. Количество аминокислотных замен находилось в прямой зависимости от продолжительности заболевания ВИЧ-инфекцией (коэффициент корреляции Спирмена, $r=0,58$, $p<0,0001$), и наблюдалась косвенная обратная зависимость от содержания $CD4^+$ -лимфоцитов в крови (коэффициент корреляции Спирмена, $r=-0,53$, $p<0,0001$).

Частным и клинически значимым следствием аминокислотных замен в белковой структуре ферментов ВИЧ является возникновение лекарственной устойчивости ВИЧ. При сравнительном анализе профилей лекарственной устойчивости ВИЧ в парных образцах крови и СМЖ было обнаружено, что у 13 пациентов в гене *pol* ВИЧ присутствуют мутации, связанные с формированием лекарственной устойчивости. Из них 7 пациентов никогда ранее не принимали антиретровирусные препараты и 6 больных получали антиретровирусную терапию. Мутации генома ВИЧ, обнаруженные у нелеченых пациентов, являлись второстепенными и интерпретировались как мутации, приводящие к «низкому» и «потенциально низкому уровню устойчивости» к некоторым препаратам. У 6 пациентов, принимавших антиретровирусные препараты, обнаруживались как второстепенные, так и первичные мутации гена *pol* ВИЧ, приводящие к клинически значимому снижению чувствительности ВИЧ к определенным антиретровирусным препаратам.

Профили лекарственной устойчивости ВИЧ в парных образцах крови и СМЖ не совпадали у 6 пациентов (6%). Из них трое больных никогда ранее не

принимали антиретровирусные препараты, двое лечились антретровирусными препаратами ранее, один человек находился на лечении в момент исследования (табл. 9).

Таблица 9

Случаи несовпадения профилей лекарственной устойчивости ВИЧ в парных образцах крови и СМЖ (согласно интерпретации базы данных Стенфордского университета HIV Drug Resistance Database)

Пациенты	Аминокислотные замены в геноме ВИЧ, связанные с формированием фармакорезистентности и обнаруженные в крови		Аминокислотные замены в геноме ВИЧ, связанные с формированием фармакорезистентности и обнаруженные в СМЖ	
	Обратная транскриптаза	Протеаза	Обратная транскриптаза	Протеаза
X2647	K70TK, V106IV	L10I	-	L10FI
Б1711	-	-	T69NT	
A1411	-	-	T215IT	
B1455	T69NT, V108IMV	-	-	
П1243	K103KN, E138A, G190GS	-	E138AE	
B1273	M184V, L74V, K101E, Y181F, G190S	M46IM, L10I	-	L10I

В образце крови у одного из не принимавших АРВП пациентов (X2647) в обратной транскриптазе ВИЧ были обнаружены аминокислотные замены (K70TK и V106IV), ассоциированные с развитием лекарственной устойчивости к нуклеозидным и ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы. Одна из этих мутаций, K70T, классифицировалась согласно интерпретации

базы данных Стенфордского университета HIV Drug Resistance Database как мутация, вызывающая потенциально низкую устойчивость к большинству нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы. В спинномозговой жидкости эти мутации не обнаруживались.

У второго нелеченого пациента (Б1711) при исследовании образца СМЖ была обнаружена замена Т69NT в аминокислотной последовательности обратной транскриптазы. Эта мутация ассоциирована с потенциальной резистентностью низкого уровня к диданозину. У вирусов, циркулирующих в крови, такой мутации не обнаружено.

В третьем случае расхождения результатов тестирования лекарственной устойчивости ВИЧ у не принимавших АРВП пациентов (А1411) в образце СМЖ была выявлена мутация Т215IT, приводящая к потенциально низкой лекарственной устойчивости к абакавиру, диданозину и тенофовиру и резистентности низкого уровня к зидовудину и ставудину. При исследовании образца крови эта мутация не выявлялась.

Среди больных, принимавших антиретровирусные препараты ранее, у одного пациента (В1455) в аминокислотной последовательности обратной транскриптазы ВИЧ, полученной из крови, были обнаружены второстепенные мутации Т69NT и V108IMV, отсутствовавшие в спинномозговой жидкости. Согласно интерпретации базы данных Стенфордского университета HIV Drug Resistance Database, эти мутации вызывают потенциальную резистентность ВИЧ низкого уровня к диданозину и невирапину соответственно. У второго пациента (П1243), принимавшего антиретровирусные препараты ранее, в гене *pol* ВИЧ, полученном из крови, выявлялись мутации K103KN, E138A и G190GS, в то время как в СМЖ была обнаружена только мутация E138AE. Соответственно вирусы, циркулировавшие в крови, обладали высоким уровнем устойчивости к эфавирензу и невирапину и низким уровнем резистентности к рилпивирину и этравирину, а ВИЧ, обнаруженный в СМЖ, демонстрировал только низкий уровень устойчивости к рилпивирину.

Последний случай расхождения результатов тестирования фармакорезистентности ВИЧ, обнаруженный у пациента, принимавшего в момент исследования антиретровирусные препараты, будет рассмотрен подробно ниже (табл. 10).

Таблица 10

Динамика лабораторных показателей в крови и СМЖ у пациента В1273

Дата исследования	12.07.2011	21.03.2012	10.04.2012
Визит	1	2	3
ВААРТ на момент исследования	Перерыв в приеме ВААРТ (предыдущая схема – ЗТС+АВС+ЕFV)	ВААРТ продолжительностью 4 недели (ЗТС+АВС+LPV/r)	ВААРТ продолжительностью 7 недель (ЗТС+ZDV+LPV/r)
Вирусная нагрузка ВИЧ в крови (lg копий РНК/мл)	6,28	3,62	2,87
Вирусная нагрузка ВИЧ в СМЖ (lg копий РНК/мл)	5,38	4,60	4,87
Количество однонуклеотидных замен в парных образцах гена <i>pol</i> ВИЧ	53	59	65
Количество CD4 ⁺ -лимфоцитов в крови (клеток/мкл)	31	227	243
Профиль лекарственной устойчивости ВИЧ в крови	Чувствителен ко всем АРВП	Устойчивость высокого уровня к ЗТС, ddI, АВС (M184V, L74V), высокого уровня к EFV и NVP, низкого уровня к RPV, ETR (K101E, Y181F, G190S)	Устойчивость высокого уровня к ЗТС, ddI, АВС (M184V, L74V), высокого уровня к EFV и NVP, низкого уровня к RPV, ETR (K101E, Y181F, G190S), потенциально низкий уровень устойчивости к ATV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, низкий уровень устойчивости к NFV (M46IM, L10I)
Профиль лекарственной устойчивости ВИЧ в СМЖ	Чувствителен ко всем АРВП	Чувствителен ко всем АРВП	Чувствителен ко всем АРВП

У пациента В1273 ВИЧ-инфекция была диагностирована в 2000 г. В 2010 году пациент был госпитализирован с диагнозом «серозный менингит» в стационар Центра СПИД, где пациенту была назначена ВААРТ, включающая в себя абакавир, ламивудин и эфавиренз. Через два года эфавиренз был заменен на калетру, а в апреле 2012 г. схема терапии была еще раз изменена и включала в себя азидотимидин, ламивудин и калетру. Приверженность к терапии у пациента была неполной, супрессия ВИЧ не была достигнута, и с 2011 г. по 2012 г. он лечился в стационаре еще 4 раза с диагнозом «энцефалопатия смешанного генеза». В 2012 году наблюдались признаки выраженной энцефалопатии, были диагностированы лейкоэнцефалит и полинейропатия. В течение 2011-2012 гг. больному трижды выполнялось определение вирусной нагрузки и лекарственной устойчивости ВИЧ в крови и СМЖ: в июле 2011 г. после того, как пациент самостоятельно прервал терапию, в марте и апреле 2012г. на фоне терапии. Во время второго и третьего визитов пациента в образцах крови мы обнаружили мутации, вызывающие лекарственную устойчивость ВИЧ, но вирус, содержащийся в СМЖ, был полностью чувствителен к антиретровирусным препаратам. Супрессия ВИЧ в СМЖ не наблюдалась через 7 недель приема ВААРТ, хотя коэффициент проникновения препаратов в ЦНС был достаточно высокий (СРЕ ЗТС+АВС+LPV/r=7, СРЕ ЗТС+AZT+LPV/r=8) [249]. Неэффективность терапии в связи с недостаточной приверженностью в этот период была исключена, так как больной находился на лечении в стационаре, и приверженность к терапии подтверждается падением вирусной нагрузки в крови.

Таким образом, результаты генотипирования ВИЧ показали, что профили лекарственной устойчивости ВИЧ в парных образцах крови и СМЖ могут быть различны.

5.3. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена *pol* ВИЧ при обследовании пациентов в динамике

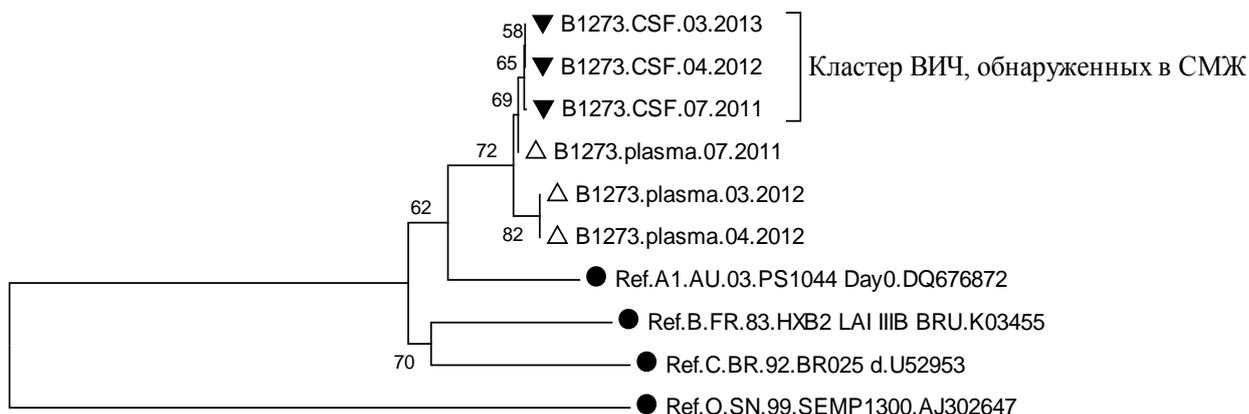
В нашем исследовании повторные визиты были только у 8 пациентов, из них трехкратно обследовались трое. Все пациенты на момент повторных визитов уже принимали антиретровирусную терапию, что оказывало критическое влияние на динамику вирусной нагрузки ВИЧ в крови и СМЖ. В связи с супрессией вируса в крови и/или СМЖ на фоне ВААРТ для филогенетического анализа оказались доступны повторные нуклеотидные последовательности ВИЧ только у 2 пациентов.

Пациент В1273 был обследован трехкратно в течение 2011-2012 гг. Признаки нарушения функций ЦНС отмечались у больного с 2010 года (энцефалопатия, лейкоэнцефалит и полинейропатия). Во время второго и третьего визитов пациента были обнаружены мутации, вызывающие лекарственную устойчивость ВИЧ, в образцах крови, но вирус, содержащийся в СМЖ, был полностью чувствителен к антиретровирусным препаратам. При определении вирусной нагрузки ВИЧ в парных образцах через 4 и через 7 недель после начала ВААРТ количество ВИЧ в крови оставалось на высоком уровне (4,60 и 4,87 lg копий РНК/мл соответственно), несмотря на активное снижение вирусной нагрузки ВИЧ в крови (3,62 и 2,87 lg копий РНК/мл). При сравнении нуклеотидных последовательностей гена *pol* вируса в крови и СМЖ у данного пациента в динамике мы наблюдали увеличение количества однонуклеотидных замен, то есть рост эволюционной дистанции между субпопуляциями ВИЧ в СМЖ и крови с течением времени.

При филогенетическом анализе нуклеотидных последовательностей, полученных из образцов крови и СМЖ пациента В1273, мы наблюдали образование отдельного кластера вирусов, циркулировавших в СМЖ (рис. 11). Кластеризация последовательностей, полученных из СМЖ, и сохранение высокой вирусной нагрузки в СМЖ, вероятно, были связаны с тем, что

гематоэнцефалический барьер препятствовал переходу вирусов между тканями и перемешиванию генетических вариантов ВИЧ в крови и ЦНС.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что вариант вируса, локализованный в ЦНС, независимо эволюционировал по своему пути филогенеза.



▼ нуклеотидная последовательность гена *pol* ВИЧ, циркулирующего в СМЖ

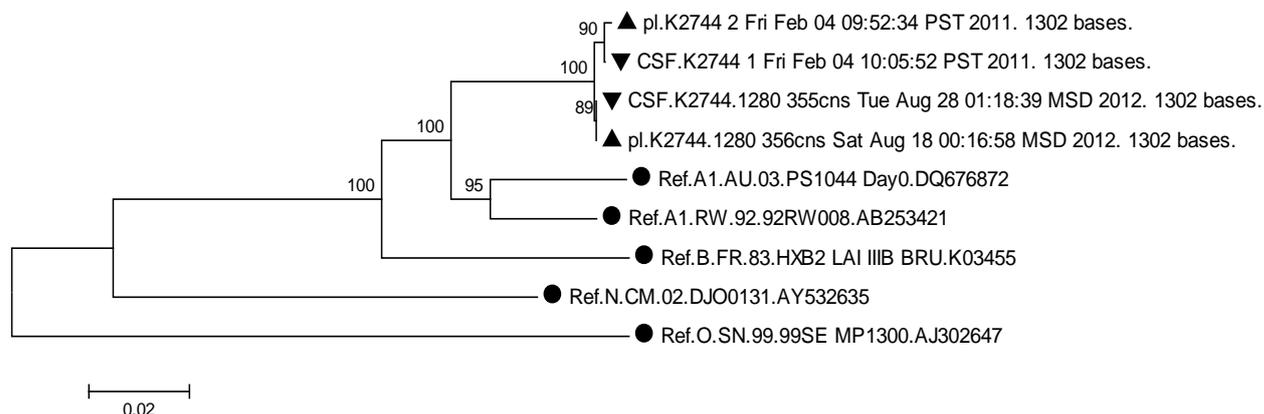
△ нуклеотидная последовательность гена *pol* ВИЧ, циркулирующего в крови

● референсные нуклеотидные последовательности гена *pol* субтипов А1, В, С группы М и группы О ВИЧ-1, полученные с сайта базы данных ВИЧ Национальной лаборатории Лос-Аламоса (URL: <http://www.hiv.lanl.gov/content/index>)

Рис. 11. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей гена *pol* ВИЧ, полученных при исследовании парных образцов СМЖ и крови пациента В1273

У второго пациента К2744 был диагностирован рецидивирующий серозный менингит. Больной был обследован дважды на фоне ВААРТ с интервалом в 19 месяцев. Профили лекарственной устойчивости в крови и в СМЖ совпадали, но наблюдалась неполная чувствительность к некоторым препаратам схемы ВААРТ. В течение этого периода больному дважды меняли схему ВААРТ, однако назначить препараты, к которым ВИЧ был бы полностью чувствителен не представлялось возможным. Во время второго визита мы обнаружили, что уровень вирусной нагрузки в крови снизился по сравнению с результатами первого визита (3,50 и 2,02 lg копий РНК/мл), а количество ВИЧ в

СМЖ наоборот возросло (2,10 и 3,11 lg копий РНК/мл). При филогенетическом анализе парных нуклеотидных последовательностей генома ВИЧ у данного больного не наблюдалось дивергенции вирусной эволюции в СМЖ и крови, как в предыдущем случае (рис. 12).



▼ нуклеотидная последовательность гена *pol* ВИЧ, циркулирующего в СМЖ
 ▲ нуклеотидная последовательность гена *pol* ВИЧ, циркулирующего в крови
 ● референсные нуклеотидные последовательности гена *pol* субтипов А1, В, С группы М и группы О ВИЧ-1, полученные с сайта базы данных ВИЧ Национальной лаборатории Лос-Аламоса (URL: <http://www.hiv.lanl.gov/content/index>)

Рис. 12. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей гена *pol* ВИЧ, полученных при исследовании парных образцов СМЖ и крови пациента К2744

Недостаточное количество пациентов, обследованных в динамике, не позволило нам сравнить результаты филогенетического анализа ВИЧ в парных образцах крови и СМЖ у больных с клиническими признаками поражения ЦНС и без нарушения функций ЦНС. По литературным данным у пациентов с ВИЧ-ассоциированным поражением ЦНС при филогенетическом анализе может наблюдаться кластеризация вирусов, циркулирующих в СМЖ, и медленное снижение вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ на фоне ВААРТ [162, 120, 92]. Результаты определения вирусной нагрузки в СМЖ и анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ, полученных от пациента В1273, также

демонстрируют медленное снижение количества ВИЧ в СМЖ и образование отдельного кластера вирусов, циркулирующих в СМЖ.

ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении патогенеза и разработке подходов к лабораторной диагностике ВИЧ-ассоциированных поражений органов и систем организма необходимо учитывать гистологические, физиологические и иммунологические особенности тканей и органов, неодинаковую тропность ВИЧ к различным клеткам и значительную генетическую изменчивость ВИЧ, в основе которой лежат высокая численность вирусной популяции, быстрая смена поколений и высокая частота ошибок обратной транскриптазы. Закономерным следствием взаимодействия этих характеристик будут особенности патогенеза, клинической симптоматики и динамики заболевания со стороны различных систем организма.

Вопросы репликации и концентрации ВИЧ в различных тканях и биологических жидкостях организма остаются недостаточно изученными. Решению этой проблемы препятствует отсутствие простых, дешевых и доступных методик количественного определения ВИЧ в различных тканевых образцах. В настоящее время лабораторные вирусологические исследования для диагностики ВИЧ-инфекции выполняются только в образцах крови. Важной проблемой ВИЧ-медицины остается оценка степени тяжести поражения различных органов и систем организма, и, в первую очередь, центральной нервной системы вследствие высокой распространенности нейрокогнитивных нарушений у ВИЧ-инфицированных пациентов, несмотря на широкое применение ВААРТ. Анализы крови малоинформативны для диагностики ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС. Для лабораторной диагностики состояния ЦНС используют клинические и биохимические исследования ликвора, но оценить степень инфицированности нервной ткани и тяжесть ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС с помощью этих методов не представляется возможным.

Для более детального изучения вопросов репликации вируса и диагностики ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС нами были

проанализированы парные образцы СМЖ и крови, полученные у пациентов с ВИЧ-инфекцией. Исследование СМЖ в сочетании с одновременным анализом образцов крови особенно интересно в силу наличия гематоэнцефалического барьера, препятствующего свободной пенетрации вирусов из крови в ткань мозга и обратно. Обособленное размножение вируса в ткани, имеющей специфическое гистологическое строение, клеточный состав, перечень и концентрации биоактивных веществ, может сопровождаться генетическими перестройками ВИЧ по пути адаптации к этой ткани. Учитывая избирательную проницаемость ГЭБ для лекарственных препаратов, вирус также способен формировать резистентные варианты в данном отделе организма и автономно реплицироваться в ЦНС.

Применявшиеся в данном исследовании наборы реагентов Abbott RealTime HIV-1 и ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System предназначены для выполнения анализов в плазме крови. СМЖ как биологический материал с теоретической точки зрения не требует по сравнению с плазмой крови дополнительной обработки для проведения молекулярно-биологических исследований, так как не содержит веществ, способных снизить эффективность методов экстракции РНК ВИЧ, применяющихся для плазмы крови. СМЖ близка по составу к сыворотке крови и состоит из 90% воды и 10% сухого вещества. Также СМЖ не содержит значимого количества химических субстратов, способных привести к ингибированию амплификации нуклеиновых кислот (вязкие слизистые субстраты, большое количество липидов, белков, гемоглобин). Однако важным условием для качественного выполнения молекулярно-биологического исследования, как и для других видов лабораторного анализа СМЖ, является соблюдение требований к качеству преаналитического этапа исследования. В первую очередь это получение чистого образца СМЖ без примеси крови. Примесь крови в образце СМЖ не только ухудшает качество полученного на этапе пробоподготовки экстракта, содержащего очищенные нуклеиновые кислоты, но и затрудняет интерпретацию результатов вирусологического исследования, так как

невозможно исключить ошибку, связанную с попаданием в образец СМЖ вирусов, циркулирующих в крови.

Выполненное исследование продемонстрировало, что для анализа вирусной нагрузки и генотипирования ВИЧ в спинномозговой жидкости может быть использована стандартная методика выявления вируса в крови. При определении количества ВИЧ в СМЖ результат удалось получить в 100% образцов, что свидетельствует о том, что данный набор реагентов может успешно применяться для лабораторной диагностики вирусной нагрузки ВИЧ в образцах ликвора.

Тест-система для генотипирования ВИЧ ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System не была верифицирована производителем для диагностики лекарственной устойчивости подтипов ВИЧ, отличных от субтипа В, и других биологических образцов, кроме плазмы крови. Однако эта тест-система показала стабильные результаты при диагностике фармакорезистентности ВИЧ у ВИЧ-инфицированных пациентов Санкт-Петербурга, где большинство случаев ВИЧ-инфекции вызвано ВИЧ субтипа А1. Нуклеотидные последовательности гена *pol* ВИЧ у всех обследованных пациентов были получены, если вирусная нагрузка ВИЧ в крови или СМЖ находилась в диапазоне 2000-750000 копий РНК/мл, заявленном разработчиком как интервал допустимый для выполнения анализа, а в ряде случаев и при меньшем количестве вирусов в образце.

Результаты исследования показали, что вирусная нагрузка ВИЧ в СМЖ в отличие от количества вируса в крови не коррелирует ни с содержанием CD4⁺-лимфоцитов в крови, ни с продолжительностью заболевания. Статистическая взаимосвязь обнаружена только с концентрацией ВИЧ в крови. Однако слабая степень корреляции ($r=0,3$, $p<0,01$) и значительная как положительная, так и отрицательная разница между количеством ВИЧ в крови и СМЖ у трети пациентов говорят о том, что степень инфицированности клеток ЦНС, возможно, находится во взаимосвязи с другими факторами, например с концентрацией некоторых цитокинов в ткани мозга и внутриклеточными

условиями размножения вирусов. Для изучения причин высокой концентрации ВИЧ в ткани ЦНС необходим поиск и анализ других факторов или субстратов, способных быть либо катализатором, либо следствием активной репликации ВИЧ в клетках мозга. Возможно, эти субстраты могли бы стать объектом лабораторной диагностики и мониторинга ВИЧ-инфекции для оптимизации лечения и улучшения прогноза заболевания.

В результате статистического анализа полученных в исследовании данных было обнаружено, что в среднем у не принимавших АРВП пациентов вирусная нагрузка в крови превышает нагрузку в СМЖ на 1,5 lg копий РНК/мл. Более высокая концентрация вируса в СМЖ и, соответственно, сдвиг разницы между количеством ВИЧ в крови и СМЖ в меньшую сторону наблюдались в группе пациентов с признаками ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС ($p < 0.0001$). Полученные результаты говорят о том, что нарушение функций ЦНС взаимосвязано с увеличением репликации ВИЧ в клетках нервной ткани. Однако установить первопричину большого количества вируса в СМЖ у пациентов с признаками нарушения функций ЦНС в кросс-секционном (одномоментном) исследовании невозможно, так как большое количество вирусов в ткани ЦНС может быть как следствием разрушения гематоэнцефалического барьера, так и результатом высокой репликативной активности и значительной инфицированности клеток нервной ткани. Следует отметить, что средняя продолжительность заболевания ВИЧ-инфекцией в группе пациентов с нейрокогнитивными нарушениями оказалась больше, что отражает возрастание риска возникновения нейрокогнитивных расстройств с увеличением продолжительности заболевания при отсутствии антиретровирусной терапии.

Для изучения возможности применения анализа вирусной нагрузки ВИЧ в образцах СМЖ в целях диагностики ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС нами была проведена оценка клинической информативности исследования. На основании статистических методов был определен порог принятия клинического решения (числовое значение количества ВИЧ в СМЖ,

являющееся критерием наличия признаков поражения ЦНС), который оказался равен вирусной нагрузке ВИЧ в СМЖ равной или большей 4,00 lg копий РНК/мл (10000 копий РНК/мл). Методика показала относительно высокую диагностическую чувствительность (76%) и специфичность (84%) по отношению к выявлению пациентов с ВИЧ-ассоциированными неврологическими нарушениями. Вероятность диагностировать ВИЧ-ассоциированное поражение ЦНС при выявлении у больного вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ, равной или большей 4,00 lg копий РНК/мл, в 4,9 раза выше, чем получить такой же результат при отсутствии нейрокогнитивных нарушений. Шанс обнаружить ВИЧ-ассоциированное поражение ЦНС при выявлении у ВИЧ-инфицированного пациента вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ, равной или большей 4,00 lg копий РНК/мл, в 17 раз выше, чем диагностировать нейрокогнитивные нарушения у пациентов с вирусной нагрузкой в СМЖ менее 4,00 lg копий РНК/мл.

Вероятность обнаружения поражения ЦНС у нелеченого пациента с вирусной нагрузкой ВИЧ в СМЖ равной или большей, чем 4,00 lg копий РНК/мл, составляла 70% (прогностическая ценность положительного результата). Прогностическая ценность отрицательного результата находилась на более высоком уровне (88%) и показывала, что низкая вирусная нагрузка ВИЧ в СМЖ в подавляющем большинстве случаев исключает клинически значимую степень поражения ЦНС. Более низкий показатель прогностической ценности положительного результата мог быть связан и с гиподиагностикой нейрокогнитивных нарушений у пациентов, так как всесторонняя комплексная диагностика функционального и органического состояния ЦНС должна включать очень широкий спектр клинических, психологических, инструментальных и лабораторных методов исследования.

Назначение больному антиретровирусных препаратов значительно изменяло картину результатов лабораторных исследований. У пациентов, обследованных на фоне приема антиретровирусных препаратов, было обнаружено значительное сокращение разницы между количеством ВИЧ в

крови и СМЖ, а у пациентов с продолжительностью приема ВААРТ более 6 месяцев наблюдался даже более высокий уровень вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ, чем в крови. В данном исследовании оказалось невозможно установить клиническую информативность определения вирусной нагрузки в СМЖ у пациентов на фоне ВААРТ из-за недостаточного количества наблюдений в динамике до и на фоне терапии. Для изучения динамики падения вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ на фоне ВААРТ необходимо обследовать ВИЧ-инфицированных пациентов в проспективном исследовании, чтобы установить ориентировочные сроки наступления супрессии ВИЧ в СМЖ и, соответственно, диагностические критерии неэффективности терапии в ткани ЦНС.

Быстрое падение количества вируса в крови с началом ВААРТ связывают с элиминацией не только свободных вирионов из кровяного русла, но и инфицированных $CD4^+$ -лимфоцитов, продуцентов новых вирионов, продолжительность жизни которых составляет 1-2 дня. Однако в ткани ЦНС основными клетками-мишенями ВИЧ являются микроглиальные клетки и периваскулярные макрофаги, продолжительность жизни которых по разным данным составляет месяцы и годы. Соответственно, интегрированная провирусная ДНК длительно способна быть источником синтеза нейротоксичных вирусных белков и вирионов в инфицированных долгоживущих клетках мозга.

Механизм действия антиретровирусных направлен на прекращение инфицирования здоровых клеток (НИОТ, НеНИОТ, ингибиторы интегразы и слияния, блокаторы рецепторов), либо ведет к формированию вирионов, неспособных инфицировать новые клетки (ИП), но не может остановить продукцию вируса и вирусных компонентов в уже инфицированных клетках или к гибели этих клеток. Таким образом, антиретровирусные препараты не способны кардинально и быстро уменьшить вирусную нагрузку в СМЖ, так как основными источниками вируса в ЦНС являются клетки макрофагального звена, содержащие провирусную ДНК, обладающие длительным периодом

жизни и способными быть источником новых вирионов на фоне ВААРТ продолжительное время. Вероятно, в клетках ЦНС, несмотря на терапию, может длительно продолжаться достаточно активная продукция вирусов и токсичных вирусных белков, пока пул инфицированных клеток ЦНС не уменьшится со временем за счет апоптоза. Соответственно, чем больше пул инфицированных клеток ЦНС, тем длительнее будет протекать освобождение ткани ЦНС от вирусов на фоне ВААРТ, и тем глубже и устойчивее к терапии будут нарушения нейрокогнитивных функций. Для радикального подавления репликации вируса в клетках ЦНС и других длительно живущих клетках организма необходимы новые классы препаратов, блокирующих этапы синтеза вирусных белков в клетке либо способствующих уничтожению провирусной ДНК, интегрированной в человеческий геном [194].

При изучении нуклеотидных последовательностей гена *pol* ВИЧ в парных образцах крови и СМЖ было установлено, что у вирусов, определяемых в крови и СМЖ, могут наблюдаться генетические различия, в том числе связанные с лекарственной устойчивостью. С увеличением продолжительности ВИЧ-инфекции количество однонуклеотидных замен, отличающих геном вирусов в СМЖ от циркулирующих в крови, увеличивалось. Возможно, это свидетельствует о независимой эволюции субпопуляции ВИЧ, относительно изолированной в ткани ЦНС из-за наличия гематоэнцефалического барьера. Эволюционный отбор вирусов может идти, в том числе, по пути формирования фармакорезистентных вариантов в этом отделе организма на фоне недостаточной концентрации антиретровирусных препаратов в ткани мозга из-за неполного проникновения через ГЭБ или других особенностей фармакокинетики.

Выявленные в нашем исследовании и по литературным данным случаи расхождения результатов тестирования лекарственной устойчивости ВИЧ в крови и СМЖ демонстрируют, что ЦНС может быть резервуаром формирования и архивирования лекарственноустойчивых вариантов ВИЧ [92, 94, 93, 121]. У ряда пациентов мутации ВИЧ, ассоциированные с развитием

фармакорезистентности ВИЧ, выявлялись изолированно в образцах СМЖ. Учитывая, что ГЭБ обладает избирательной проницаемостью для различных антиретровирусных препаратов, риск формирования резистентных вариантов ВИЧ в ЦНС значительно возрастает. При недостаточной концентрации АРВП в ткани мозга мы можем ожидать формирования местных устойчивых вариантов вируса, которые с течением времени смогут перейти ГЭБ и распространиться по всему организму. Риск формирования резистентности особенно высок у больных с длительной активной репликацией ВИЧ на фоне ВААРТ. С этой точки зрения к группе риска, в том числе, относятся ВИЧ-инфицированные пациенты с симптомами поражения ЦНС. По результатам нашего исследования у таких больных наблюдается высокая вирусная нагрузка в СМЖ, то есть активная репликация ВИЧ в ткани ЦНС. Наши данные также свидетельствуют о том, что супрессия ВИЧ в СМЖ на фоне ВААРТ наступает медленнее, чем в крови. Частота образования мутаций у ВИЧ - 1-10 нуклеотидных замен на геном, и замещение чувствительного варианта вируса на резистентный может происходить за 2 недели [198, 236]. Соответственно, чем дольше вирус активно реплицируется на фоне приема АРВП, тем выше риск появления и закрепления мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью [124, 133, 175, 92]. С этой точки зрения длительное выявление определяемого количества ВИЧ в СМЖ на фоне приема ВААРТ – прогностический признак высокой вероятности формирования резистентного варианта ВИЧ в ЦНС. Таким образом, пациенты с ВИЧ-ассоциированным поражением ЦНС относятся к группе риска, так как высокая вирусная нагрузка ВИЧ в СМЖ у таких больных, как по нашим, так и по литературным данным [89, 92], медленно снижается на фоне ВААРТ, что значительно повышает риск появления и закрепления мутаций лекарственной устойчивости.

Результаты тестирования лекарственной устойчивости ВИЧ в СМЖ у пациентов в нашем исследовании не требовали замены препаратов или назначения схем ВААРТ второй линии, так как степень снижения чувствительности ВИЧ к АРВП в СМЖ по сравнению с кровью не достигала

клинически значимого уровня. Однако нужно учитывать, что при присоединении других мутаций, связанных с фармакорезистентностью, чувствительность ВИЧ к препаратам будет снижаться. Таким образом, риск формирования лекарственно устойчивых генетических вариантов ВИЧ в ЦНС у таких пациентов повышен. В литературе встречаются данные о случаях значительного снижения чувствительности к антиретровирусным препаратам у вирусов в СМЖ по сравнению с кровью.

Основным признаком наличия лекарственной устойчивости ВИЧ у пациента является вирусологический неуспех терапии, выражающийся в неполной супрессии вируса в крови на фоне ВААРТ через 6 месяцев после начала лечения. Соответственно, при первичном формировании фармакорезистентного варианта ВИЧ в ЦНС, мы, вероятно, будем наблюдать отсутствие положительной динамики неврологических расстройств, либо ухудшение со стороны нейрокогнитивных функций из-за продолжающейся репликации ВИЧ в ЦНС на фоне ВААРТ через 6 месяцев после начала терапии [256]. У пациентов с подобными клиническими признаками исследование вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ может быть рекомендовано для оценки вирусологической эффективности антиретровирусной терапии в ткани ЦНС. Результаты исследования могут быть показанием к определению профиля фармакорезистентности ВИЧ в СМЖ, если обнаружено отсутствие супрессии ВИЧ в образце СМЖ через 6 месяцев после начала терапии.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что вирусная нагрузка ВИЧ в СМЖ у пациентов, не принимавших АРВП, коррелирует с количеством ВИЧ в крови ($r=0,3$, $p<0,01$) и в среднем ниже показателя в крови на 1,5 lg копий РНК/мл. Между количеством ВИЧ в СМЖ и содержанием $CD4^+$ -лимфоцитов в крови не выявлено статистически значимой корреляционной связи ($p>0,05$).
2. В отсутствие терапии у больных с клиническими признаками поражения ЦНС вирусная нагрузка ВИЧ в СМЖ в среднем на 1,4 lg копий РНК/мл выше, чем у пациентов без нарушения функций ЦНС, а разница между концентрацией ВИЧ в крови и СМЖ составляет 0,8 lg и 1,9 lg копий РНК/мл соответственно ($p<0,0001$). Статистически значимой связи между содержанием $CD4^+$ -лимфоцитов в крови, подтипом ВИЧ и наличием клинических признаков поражения ЦНС не выявлено.
3. Выявление уровня вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ $\geq 4,00$ lg копий РНК/мл у не принимавших АРВП больных обладает диагностической чувствительностью 76% и диагностической специфичностью 84% в отношении наличия у пациента ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС.
4. При сравнении аминокислотных последовательностей, кодируемых геном *pol* ВИЧ и полученных при анализе парных образцов крови и СМЖ, обнаружены точечные замены, количество которых растет с увеличением продолжительности заболевания ВИЧ-инфекцией ($p<0,0001$), что свидетельствует о генетической дивергенции вирусов.
5. Установлено, что у 6% (6/108) пациентов профили лекарственной устойчивости субпопуляций ВИЧ, циркулирующих в крови и СМЖ, различались между собой.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для подтверждающей диагностики ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС у нелеченых больных с ВИЧ-инфекцией рекомендуется исследование

вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ. Количество ВИЧ в спинномозговой жидкости, равное или превышающее 4,00 lg копий РНК/мл, свидетельствует о высокой вероятности наличия ВИЧ-ассоциированного поражения ЦНС.

2. При отсутствии улучшения нейрокогнитивных функций или при появлении неврологических нарушений у пациента на фоне терапии через 24 недели после ее начала рекомендуется определение вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ для оценки вирусологической эффективности антиретровирусной терапии в ткани ЦНС. Результаты исследования могут быть показанием к определению профиля фармакорезистентности ВИЧ в СМЖ, если обнаружено отсутствие супрессии ВИЧ в образце СМЖ через 6 месяцев после начала терапии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Особенности патогенеза ВИЧ-ассоциированных неврологических расстройств остаются недостаточно изученными. Отсутствует диагностический алгоритм и система мониторинга нейрокогнитивных нарушений у ВИЧ-инфицированных больных. С этих позиций важной исследовательской задачей представляется обоснование перечня показаний для спинномозгового пунктирования ВИЧ-инфицированных пациентов и разработка спектра клинико-диагностических исследований образцов СМЖ для оценки степени поражения ЦНС при ВИЧ-инфекции. Итоги выполненной работы указывают на необходимость валидации и регистрации тест-систем для молекулярно-биологической диагностики ВИЧ в образцах СМЖ.

Учитывая медленную положительную динамику нейрокогнитивных нарушений у больных на фоне ВААРТ и возможные отличия в пенетрации антиретровирусных препаратов через гематоэнцефалический барьер, существует потребность в разработке алгоритма оценки вирусологической эффективности ВААРТ в ткани ЦНС. Для решения этой проблемы необходимо провести проспективное исследование с изучением парных образцов крови и

СМЖ у больных в динамике до и на фоне ВААРТ. Высокая степень ассоциации уровня вирусной нагрузки ВИЧ в СМЖ с наличием признаков поражения ЦНС требует дальнейшего изучения в качестве показателя для назначения ВААРТ.

Перспективным представляется изучение тропизма ВИЧ в образцах СМЖ, как возможного фактора распространения вируса в клетках макрофагального ряда ЦНС – в первую очередь микроглии. Информативным может оказаться определение в образцах СМЖ уровней цитокинов (TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6 и др), неоптерина, нейрофиламентов, концентрации антиретровирусных препаратов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АРВП – антиретровирусные препараты
- ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- ДИ – доверительный интервал
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИИ – ингибиторы интегразы
- ИП – ингибиторы протеазы
- ИС - ингибиторы слияния
- НеНИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
- НИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
- ПИН – потребители инъекционных наркотиков
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СМЖ – спинномозговая жидкость
- СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита
- ЦНС – центральная нервная система
- ЮНЭЙДС - Объединённая программа Организации Объединённых Наций по ВИЧ/СПИД (UNAIDS – Joint United Nations Programme on HIV/AIDS)
- ЗТС – lamivudine (ламивудин)
- АВС – abacavir (абакавир)
- АТV/r – atazanavir/ritonavir (атазанавир, бустированный ритонавиром)
- AUC – Area Under The Curve (площадь под ROC-кривой)
- CD – cluster of differentiation (маркеры клеточной дифференциации)
- CRF – Circulating Recombinant Form (циркулирующая рекомбинантная форма)

DC-SIGN - Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (молекулы межклеточной адгезии дендритных клеток 3-захватывающего неинтегрина)

ddI – didanosine (диданозин)

EFV – efavirenz (эфавиренз)

IDV/r – indinavir/ritonavir (индинавир, бустированный ритонавиром)

IL- interleukin (интерлейкин)

FPV/r – fosamprenavir/ritonavir (фосампренавир, бустированный ритонавиром)

LPV/r – lopinavir/ritonavir (калетра)

NFV – nelfinavir (нелфинавир)

NVP – nevirapine (невирапин)

OR – Odds Ratio (отношение шансов)

ROC-кривая – Receiver Operating Characteristic (кривая взаимной зависимости вероятностей ложноположительных и истинно положительных результатов)

RPV – rilpivirine (рилпивирин)

TNF- α – tumor necrosis factor alpha (фактор некроза опухоли альфа)

ZDV – zidovudine (азидотимидин)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] ГОСТ Р 53022.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. // Введ. 2008-12-18. - М.: Стандартинформ, 2009. — 23 с.
- [2] Анализ мутаций, связанных с лекарственной резистентностью, у нелеченных пациентов, зараженных различными генетическими формами ВИЧ 1 типа, распространенными в странах бывшего Советского Союза / Е. Вазкез де Парга, А. Г. Рахманова, Л. Перез-Альварез и др. // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. — 2009. — Т. 1, № 2. — С. 50–56.
- [3] Анализ субтипов и фармакорезистентных вариантов ВИЧ, циркулирующих среди ВИЧ-инфицированных пациентов Санкт-Петербурга / Н. Е. Дементьева, Н. В. Сизова, З. Н. Лисицина и др. // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. — 2011. — Т. 3, № 4. — С. 34–43.
- [4] Бартлетт, Д. Клинические аспекты ВИЧ-инфекции / Дж. Бартлетт, Дж. Галлант, П. Фам. — М.: Р.Валент, 2012. — 528 с.
- [5] Беляков, Н. А. Половой путь передачи ВИЧ в развитии эпидемии / Н. А. Беляков, Т. Н. Виноградова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. — 2011. — Т. 3, № 4. — С. 7–19.
- [6] Биологические свойства вариантов ВИЧ-1, циркулирующих среди наркоманов на территории России / Т. А. Ханина, Л. М. Селимова, Е. В. Казеннова и др. // Вопросы вирусологии. — 2005. — Т. 50, № 4. — С. 24–28.
- [7] Бобков, А. Ф. Как и когда это могло случиться: происхождение и эволюция ВИЧ / А. Ф. Бобков // Вестник Российского фонда фундаментальных исследований. — 2002. — № 1. — С. 58–64.
- [8] Бобкова, М. Р. Иммуитет и ВИЧ-инфекция / М. Р. Бобкова. — М.: Олимпия Пресс, 2006. — 240 с.

- [9] Бобкова, М. Р. Ингибиторы протеазы ВИЧ-1: особенности клеточного метаболизма и лекарственная устойчивость / М. Р. Бобкова // Терапевтический архив. — 2008. — Т. 10. — С. 77–80.
- [10] Бобкова, М. Р. Биология ВИЧ / М. Р. Бобкова // Вирус иммунодефицита человека - медицина: руководство для врачей / Под ред. Н. А. Белякова, А. Г. Рахмановой. — СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2010. — С. 17–42.
- [11] Бобкова, М. Р. Патофизиология ВИЧ-инфекции / М. Р. Бобкова // Вирус иммунодефицита человека - медицина: руководство для врачей / Под ред. Н. А. Белякова, А. Г. Рахмановой. — СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2010. — С. 43–70.
- [12] Бредбери, М. Концепция гематоэнцефалического барьера / М. Бредбери; Под ред. Г. Н. Кассиль; Перевод с англ. В. И. Кандрора. — М.: Медицина, 1983. — 612 с.
- [13] Варианты вируса иммунодефицита человека типа 1, обнаруживаемые в России среди инфицированных половым путем / А. Л. Суханова, Е. В. Казеннова, М. Р. Бобкова и др. // Вопросы вирусологии. — 2004. — Т. 49, № 1. — С. 4–7.
- [14] Вирус иммунодефицита человека - медицина: руководство для врачей / Под ред. Н. А. Белякова, А. Г. Рахмановой. — СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2010. — 752 с.
- [15] ВИЧ-инфекция в Санкт-Петербурге / Под ред. Белякова Н. А. и Рассохина В. В. // ВИЧ / СПИД. Спутник специалиста. Информационно-аналитический бюллетень. — 2012. — № 1 — 79 с.
- [16] Кассиль, Г. Н. Гематоэнцефалический барьер. Анатомия, физиология, методы исследования, клиника. / Г. Н. Кассиль. — М.: Акад. наук СССР, 1963. — 408 с.
- [17] Лукашев, В. В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ: учебное пособие / В. В. Лукашев. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. — 256 с.

[18] Методические рекомендации Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 6 августа 2007 г. № 5956-РХ «Определение чувствительности вируса иммунодефицита человека к лекарственным препаратам». — Москва, 2007. — 11 с.

[19] Методическое письмо Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 10 ноября 2006 г. № 5922-РХ «Правила постановки диагноза ВИЧ-инфекции». — Москва, 2006. — 20 с.

[20] Механизмы поражения головного мозга при ВИЧ-инфекции / Н. А. Беляков, С. В. Медведев, Т. Н. Трофимова и др. // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2012. — № 9. — С. 4–12.

[21] Молекулярная эпидемиология ВИЧ-1 в Московской области / А. В. Гилязова, П. В. Зенин, А. Ю. Пронин и др. // Вопросы вирусологии. — 2010. — Т. 55, № 5. — С. 25–29.

[22] Молекулярно-вирусологические особенности эпидемии ВИЧ-инфекции в России и других странах СНГ / А. Ф. Бобков, Е. В. Казеннова, Л. М. Селимова и др. // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2003. — № 12. — С. 83–85.

[23] Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в Череповце Вологодской области: второй случай эпидемической вспышки, вызванной рекомбинантом gag A/env В / Е. В. Казеннова, А. В. Бронникова, С. Н. Кузин и др. // Вопросы вирусологии. — 2008. — Т. 53, № 5. — С. 23–27.

[24] Молекулярно-генетическая характеристика ВИЧ-1 на территории России / А. Ф. Бобков, Е. В. Казеннова, М. Р. Бобкова и др. // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2002. — № 8. — С. 40–42.

[25] Мониторинг распространения генетических вариантов ВИЧ-1 на территории России / Л. В. Урываев, М. Р. Бобкова, М. М. Гараев и др. // Инфекция и иммунитет. — 2012. — Т. 2, № 1-2. — С. 427–428.

[26] Онищенко, Г. Г. ВИЧ-инфекция – проблема человечества / Г. Г. Онищенко // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. — 2009. — Т. 1, № 1. — С. 5–9.

[27] Опыт изучения резистентности к антиретровирусным препаратам у ВИЧ-инфицированных в Дальневосточном федеральном округе / В. О. Котова, Л. А. Балахонцева, А. Н. Иванов, О. Е. Троценко // Инфекция и иммунитет. — 2012. — Т. 2, № 1-2. — С. 416.

[28] Покровский, В. И. ВИЧ-инфекция и СПИД / В. И. Покровский. — М.: Издательская группа "ГЭОТАР-Медиа", 2010. — 192 с.

[29] Покровский, В. В. ВИЧ/СПИД в России: ситуация и прогноз / В. В. Покровский // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2008. — № 3. — С. 4–7.

[30] Покровский, В. И. Клиническая классификация ВИЧ-инфекции / В. И. Покровский, В. В. Покровский, О. Г. Юрин // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2001. — Т. 1. — С. 7–10.

[31] Проблемы субтипирования ВИЧ-1 на основе анализа гена *pol* и способы их разрешения / Е. В. Казеннова, И. А. Лаповок, А. В. Васильев и др. // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. — 2010. — Т. 2, № 3. — С. 42–48.

[32] Распространенность лекарственно-устойчивых штаммов ВИЧ у ВИЧ-инфицированных Дальневосточного федерального округа / В. О. Котова, Л. А. Балахонцева, А. Н. Иванов, О. Е. Троценко // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. — 2012. — № 21. — С. 89–92.

[33] Распространенность первичной резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам у ВИЧ-инфицированных пациентов в Москве и Московской области / Е. В. Богословская, Г. А. Шипулин, Л. Ю. Башкирова и др. // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2007. — № 6. — С. 39–42.

[34] Рахманова, А. Г. Антиретровирусная терапия (АРВТ) ВИЧ-инфекции в Санкт-Петербурге и перспективы ее совершенствования / А. Г. Рахманова, Н. Г. Захарова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. — 2011. — Т. 3, № 4. — С. 44–50.

[35] Формирование резистентности к высокоактивной антиретровирусной терапии у ВИЧ-инфицированных пациентов / А. Г. Рахманова, Н.Г. Захарова, С.Э. Торопов и др. // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. — 2012. — Т. 4, № 2. — С. 55–63.

[36] Abbott, N. J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability / N. J. Abbott // *J. Anat.* — 2002. — Vol. 200, no. 6. — P. 629–638.

[37] Absence of glial α -dystrobrevin causes abnormalities of the blood-brain barrier and progressive brain edema / C. F. Lien, S. K. Mohanta, M. Frontczak-Baniewicz et al. // *J. Biol. Chem.* — 2012. — Vol. 287, no. 49. — P. 41374–41385.

[38] Activation of matrix-metalloproteinase-2 and membrane-type-1-matrix-metalloproteinase in endothelial cells and induction of vascular permeability in vivo by human immunodeficiency virus-1 Tat protein and basic fibroblast growth factor / E. Toschi, G. Barillari, C. Sgadari et al. // *Mol. Biol. Cell.* — 2001. — Vol. 12, no. 10. — P. 2934–2946.

[39] Alexaki, A. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence / A. Alexaki, Y. Liu, B. Wigdahl // *Curr. HIV Res.* — 2008. — Vol. 6, no. 5. — P. 388–400.

[40] Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gp160 sequences from a patient with HIV dementia: evidence for monocyte trafficking into brain / Y. Liu, X. P. Tang, J. C. McArthur et al. // *J. Neurovirol.* — 2000. — Vol. 6 Suppl 1. — P. 70–81.

[41] Annunziata, P. Blood-brain barrier changes during invasion of the central nervous system by HIV-1. Old and new insights into the mechanism / P. Annunziata // *J. Neurol.* — 2003. — Vol. 250, no. 8. — P. 901–906.

[42] Antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in HIV-1 associated neurocognitive disorder: a cross-sectional cohort study / P. Lackner, B. Kuenz, M. Reindl et al. // *J Neuroinflammation.* — 2010. — Vol. 7. — P. 79.

[43] Antiretroviral drug concentrations in semen of HIV-infected men: differential penetration of indinavir, ritonavir and saquinavir / S. Taylor, D. J. Back,

S. M. Drake et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2001. — Vol. 48, no. 3. — P. 351–354.

[44] Antiretroviral therapy CNS penetration and HIV-1-associated CNS disease / L. Garvey, A. Winston, J. Walsh et al. // *Neurology.* — 2011. — Vol. 76, no. 8. — P. 693–700.

[45] Armulik, A. Endothelial/pericyte interactions / A. Armulik, A. Abramsson, C. Betsholtz // *Circ. Res.* — 2005. — Vol. 97, no. 6. — P. 512–523.

[46] Association of antiretroviral therapy with detection of HIV-1 RNA and DNA in the anorectal mucosa of homosexual men / T. M. Lampinen, C. W. Critchlow, J. M. Kuypers et al. // *AIDS.* — 2000. — Vol. 14, no. 5. — P. 69–75.

[47] Association of thrombospondin-1 with osteogenic differentiation of retinal pericytes in vitro / A. E. Canfield, A. B. Sutton, J. A. Hoyland, A. M. Schor // *J. Cell. Sci.* — 1996. — Vol. 109 (Pt 2). — P. 343–353.

[48] Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease / A. T. Argaw, L. Asp, J. Zhang et al. // *J. Clin. Invest.* — 2012. — Vol. 122, no. 7. — P. 2454–2468.

[49] Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow / T. Takano, G. F. Tian, W. Peng et al. // *Nat. Neurosci.* — 2006. — Vol. 9, no. 2. — P. 260–267.

[50] Axonal transport of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein glycoprotein 120 is found in association with neuronal apoptosis / A. Bachis, S. A. Aden, R. L. Nosheny et al. // *J. Neurosci.* — 2006. — Vol. 26, no. 25. — P. 6771–6780.

[51] Banks, W. A. Passage of cytokines across the blood-brain barrier / W. A. Banks, A. J. Kastin, R. D. Broadwell // *Neuroimmunomodulation.* — 1995. — Vol. 2, no. 4. — P. 241–248.

[52] Banks, W. A. Permeability of the blood-brain barrier to HIV-1 Tat / W. A. Banks, S. M. Robinson, A. Nath // *Exp. Neurol.* — 2005. — Vol. 193, no. 1. — P. 218–227.

[53] Baribaud, F. The role of DC-SIGN and DC-SIGNR in HIV and Ebola virus infection: can potential therapeutics block virus transmission and dissemination? / F. Baribaud, R. W. Doms, S. Pohlmann // *Expert Opin. Ther. Targets*. — 2002. — Vol. 6, no. 4. — P. 423–431.

[54] Bissel, S. J. Human immunodeficiency virus infection of the brain: pitfalls in evaluating infected/affected cell populations / S. J. Bissel, C. A. Wiley // *Brain Pathol.* — 2004. — Vol. 14, no. 1. — P. 97–108.

[55] Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis / L. M. Dallasta, L. A. Pisarov, J. E. Esplen et al. // *Am. J. Pathol.* — 1999. — Vol. 155, no. 6. — P. 1915–1927.

[56] Brack-Werner, R. Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis / R. Brack-Werner // *AIDS*. — 1999. — Vol. 13, no. 1. — P. 1–22.

[57] Brain-derived cells contain a specific binding site for Gp120 which is not the CD4 antigen / M. R. Kozlowski, P. Sandler, P. F. Lin, A. Watson // *Brain Res.* — 1991. — Vol. 553, no. 2. — P. 300–304.

[58] Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles / G. R. Gordon, H. B. Choi, R. L. Rungta et al. // *Nature*. — 2008. — Vol. 456, no. 7223. — P. 745–749.

[59] Breastmilk RNA viral load in HIV-infected South African women: effects of subclinical mastitis and infant feeding / J. F. Willumsen, S. M. Filteau, A. Coutoudis et al. // *AIDS*. — 2003. — Vol. 17, no. 3. — P. 407–414.

[60] Cali, C. CXCR4-mediated glutamate exocytosis from astrocytes / C. Cali, P. Bezzi // *J. Neuroimmunol.* — 2010. — Vol. 224, no. 1-2. — P. 13–21.

[61] CCL2 disrupts the adherens junction: implications for neuroinflammation / T. K. Roberts, E. A. Eugenin, L. Lopez et al. // *Lab. Invest.* — 2012. — Vol. 92, no. 8. — P. 1213–1233.

[62] CCR5-, DC-SIGN-dependent endocytosis and delayed reverse transcription after human immunodeficiency virus type 1 infection in human

astrocytes / K. Deiva, A. Khiati, C. Hery et al. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. — 2006. — Vol. 22, no. 11. — P. 1152–1161.

[63] CD4-independent, CCR5-dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent simian immunodeficiency virus strain / A. L. Edinger, J. L. Mankowski, B. J. Doranz et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1997. — Vol. 94, no. 26. — P. 14742–14747.

[64] CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor / Y. Liu, H. Liu, B. O. Kim et al. // *J. Virol.* — 2004. — Vol. 78, no. 8. — P. 4120–4133.

[65] CD4 nadir is a predictor of HIV neurocognitive impairment in the era of combination antiretroviral therapy / R. J. Ellis, J. Badiee, F. Vaida et al. // *AIDS*. — 2011. — Vol. 25, no. 14. — P. 1747–1751.

[66] Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells / M. D. Bobardt, U. Chatterji, S. Selvarajah et al. // *J. Virol.* — 2007. — Vol. 81, no. 1. — P. 395–405.

[67] Cell-free virus in breast milk of HIV-1-seropositive women / K. Pillay, A. Coutoudis, D. York et al. // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* — 2000. — Vol. 24, no. 4. — P. 330–336.

[68] Cellular localization of the chemokine receptor CCR5. Correlation to cellular targets of HIV-1 infection / J. B. Rottman, K. P. Ganley, K. Williams et al. // *Am. J. Pathol.* — 1997. — Vol. 151, no. 5. — P. 1341–1351.

[69] Cerebrospinal-fluid HIV-1 RNA and drug concentrations after treatment with lamivudine plus zidovudine or stavudine / N. A. Foudraine, R. M. Hoetelmans, J. M. Lange et al. // *Lancet*. — 1998. — Vol. 351, no. 9115. — P. 1547–1551.

[70] Cerebrospinal fluid HIV-1 RNA levels in asymptomatic patients with early stage chronic HIV-1 infection: support for the hypothesis of local virus replication / F. Garcia, G. Niebla, J. Romeu et al. // *AIDS*. — 1999. — Vol. 13, no. 12. — P. 1491–1496.

[71] Cerebrospinal fluid HIV escape associated with progressive neurologic dysfunction in patients on antiretroviral therapy with well controlled plasma viral

load / M. J. Peluso, F. Ferretti, J. Peterson et al. // *AIDS*. — 2012. — Vol. 26, no. 14. — P. 1765–1774.

[72] Cervical shedding of HIV-1 RNA among women with low levels of viremia while receiving highly active antiretroviral therapy / M. N. Neely, L. Benning, J. Xu et al. // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* — 2007. — Vol. 44, no. 1. — P. 38–42.

[73] Changes in cognition during antiretroviral therapy: comparison of 2 different ranking systems to measure antiretroviral drug efficacy on HIV-associated neurocognitive disorders / V. Tozzi, P. Balestra, M. F. Salvatori et al. // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* — 2009. — Vol. 52, no. 1. — P. 56–63.

[74] Characterization of cultured microglia that can be infected by HIV-1 / A. V. Albright, J. T. Shieh, M. J. O'Connor, F. Gonzalez-Scarano // *J. Neurovirol.* — 2000. — Vol. 6 Suppl 1. — P. 53–60.

[75] Characterization of monocyte maturation/differentiation that facilitates their transmigration across the blood-brain barrier and infection by HIV: implications for NeuroAIDS / C. M. Buckner, T. M. Calderon, D. W. Williams et al. // *Cell. Immunol.* — 2011. — Vol. 267, no. 2. — P. 109–123.

[76] Clapham, P. R. HIV-1 receptors and cell tropism / P. R. Clapham, A. McKnight // *Br. Med. Bull.* — 2001. — Vol. 58. — P. 43–59.

[77] Cliniconeuropathologic correlates of human immunodeficiency virus in the era of antiretroviral therapy / I. Everall, F. Vaida, N. Khanlou et al. // *J. Neurovirol.* — 2009. — Vol. 15, no. 5-6. — P. 360–370.

[78] CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity / P. Dore-Duffy, A. Katychhev, X. Wang, E. Van Buren // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2006. — Vol. 26, no. 5. — P. 613–624.

[79] Cognitive dysfunction in HIV patients despite long-standing suppression of viremia / S. Simioni, M. Cavassini, J. M. Annoni et al. // *AIDS*. — 2010. — Vol. 24, no. 9. — P. 1243–1250.

[80] Coleman, C. M. Cellular and viral mechanisms of HIV-1 transmission mediated by dendritic cells / C. M. Coleman, C. S. Gelais, L. Wu // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2013. — Vol. 762. — P. 109–130.

[81] Comparison of HIV-1 pol and env sequences of blood, CSF, brain and spleen isolates collected ante-mortem and post-mortem / E. C. Caragounis, M. Gisslen, M. Lindh et al. // *Acta Neurol. Scand.* — 2008. — Vol. 117, no. 2. — P. 108–116.

[82] Compartmentalization and clonal amplification of HIV-1 variants in the cerebrospinal fluid during primary infection / G. Schnell, R. W. Price, R. Swanstrom, S. Spudich // *J. Virol.* — 2010. — Vol. 84, no. 5. — P. 2395–2407.

[83] Contribution of CNS cells in NeuroAIDS / A. S. Verma, U. P. Singh, P. D. Dwivedi, A. Singh // *J Pharm Bioallied Sci.* — 2010. — Vol. 2, no. 4. — P. 300–306.

[84] Cross-sectional characterization of HIV-1 env compartmentalization in cerebrospinal fluid over the full disease course / P. R. Harrington, G. Schnell, S. L. Letendre et al. // *AIDS.* — 2009. — Vol. 23, no. 8. — P. 907–915.

[85] CSF, plasma viral load and HIV associated dementia / K. Robertson, S. Fiscus, C. Kapoor et al. // *J. Neurovirol.* — 1998. — Vol. 4, no. 1. — P. 90–94.

[86] Cytokine patterns in adults with AIDS / K. Alonso, P. Pontiggia, R. Medenica, S. Rizzo // *Immunol. Invest.* — 1997. — Vol. 26, no. 3. — P. 341–350.

[87] Cytotoxic effect of HIV-1 gp120 on primary cultured human retinal capillary endothelial cells / H. Lin, W. Chen, L. Luo et al. // *Mol. Vis.* — 2011. — Vol. 17. — P. 3450–3457.

[88] Dahiya, S. Deployment of the human immunodeficiency virus type 1 protein arsenal: combating the host to enhance viral transcription and providing targets for therapeutic development / S. Dahiya, M. R. Nonnemacher, B. Wigdahl // *J. Gen. Virol.* — 2012. — Vol. 93, no. Pt 6. — P. 1151–1172.

[89] Delayed central nervous system virus suppression during highly active antiretroviral therapy is associated with HIV encephalopathy, but not with viral drug

resistance or poor central nervous system drug penetration / C. Eggers, K. Hertogs, H. J. Sturenburg et al. // *AIDS*. — 2003. — Vol. 17, no. 13. — P. 1897–1906.

[90] Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma / A. G. Marcelin, R. Tubiana, S. Lambert-Niclot et al. // *AIDS*. — 2008. — Vol. 22, no. 13. — P. 1677–1679.

[91] Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma on a 2002-2011 survey / S. Lambert-Niclot, R. Tubiana, C. Beaudoux et al. // *AIDS*. — 2012. — Vol. 26, no. 8. — P. 971–975.

[92] Discordance between cerebral spinal fluid and plasma HIV replication in patients with neurological symptoms who are receiving suppressive antiretroviral therapy / A. Canestri, F. X. Lescure, S. Jaureguiberry et al. // *Clin. Infect. Dis.* — 2010. — Vol. 50, no. 5. — P. 773–778.

[93] Discordant genotypic resistance and HIV-1 genetic diversity from paired plasma and cerebrospinal fluid samples in Chinese settings / L. Liu, Y. Zhang, F. Wei et al. // *J. Neurovirol.* — 2013. — Vol. 19, no. 2. — P. 131–136.

[94] Discordant Human Immunodeficiency Virus Type 1 drug resistance mutations, including K103N, observed in cerebrospinal fluid and plasma / K. T. Tashima, T. P. Flanigan, J. Kurpewski et al. // *Clin. Infect. Dis.* — 2002. — Vol. 35, no. 1. — P. 82–83.

[95] Dynamics of cognitive change in impaired HIV-positive patients initiating antiretroviral therapy / L. A. Cysique, F. Vaida, S. Letendre et al. // *Neurology*. — 2009. — Vol. 73, no. 5. — P. 342–348.

[96] Efavirenz concentrations in CSF exceed IC50 for wild-type HIV / B. M. Best, P. P. Koopmans, S. L. Letendre et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2011. — Vol. 66, no. 2. — P. 354–357.

[97] Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy / A. M. Geretti, L. Harrison, H. Green et al. // *Clin. Infect. Dis.* — 2009. — Vol. 48, no. 9. — P. 1296–1305.

[98] Effects of central nervous system antiretroviral penetration on cognitive functioning in the ALLRT cohort / M. Smurzynski, K. Wu, S. Letendre et al. // *AIDS*. — 2011. — Vol. 25, no. 3. — P. 357–365.

[99] Effects of formulation and dosing strategy on amprenavir concentrations in the seminal plasma of human immunodeficiency virus type 1-infected men / N. I. Chaudry, J. J. Eron, O. J. Naderer et al. // *Clin. Infect. Dis.* — 2002. — Vol. 35, no. 6. — P. 760–762.

[100] Elevated cerebrospinal fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 correlate with HIV-1 encephalitis and local viral replication / P. Cinque, L. Vago, M. Mengozzi et al. // *AIDS*. — 1998. — Vol. 12, no. 11. — P. 1327–1332.

[101] Ene, L. How much do antiretroviral drugs penetrate into the central nervous system? / L. Ene, D. Duiculescu, S. M. Ruta // *J Med Life*. — 2011. — Vol. 4, no. 4. — P. 432–439.

[102] Epidemiology of transmitted drug resistance in chronically HIV-infected patients in Germany: the RESINA study 2001-2009 / M. Oette, S. Reuter, R. Kaiser et al. // *Intervirology*. — 2012. — Vol. 55, no. 2. — P. 154–159.

[103] Eugenin, E. A. Gap junctions mediate human immunodeficiency virus-bystander killing in astrocytes / E. A. Eugenin, J. W. Berman // *J. Neurosci.* — 2007. — Vol. 27, no. 47. — P. 12844–12850.

[104] European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing: 2011 update / A. M. Vandamme, R. J. Camacho, F. Ceccherini-Silberstein et al. // *AIDS Rev.* — 2011. — Vol. 13, no. 2. — P. 77–108.

[105] Evaluation of HIV RNA and markers of immune activation as predictors of HIV-associated dementia / J. J. Sevigny, S. M. Albert, M. P. McDermott et al. // *Neurology*. — 2004. — Vol. 63, no. 11. — P. 2084–2090.

[106] Evidence for independent development of resistance to HIV-1 reverse transcriptase inhibitors in the cerebrospinal fluid / P. H. Cunningham, D. G. Smith, C. Satchell et al. // *AIDS*. — 2000. — Vol. 14, no. 13. — P. 1949–1954.

[107] Evidence of a source of HIV type 1 within the central nervous system by ultraintensive sampling of cerebrospinal fluid and plasma / D. W. Haas,

L. A. Clough, B. W. Johnson et al. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. — 2000. — Vol. 16, no. 15. — P. 1491–1502.

[108] Evidence of genotypic resistance diversity of archived and circulating viral strains in blood and semen of pre-treated HIV-infected men / J. Ghosn, J. P. Viard, C. Katlama et al. // *AIDS*. — 2004. — Vol. 18, no. 3. — P. 447–457.

[109] Evolution of transmitted HIV-1 drug resistance in HIV-1-infected patients in Italy from 2000 to 2010 / M. Colafigli, C. Torti, E. M. Treçarichi et al. // *Clin. Microbiol. Infect.* — 2012. — Vol. 18, no. 8. — P. 299–304.

[110] Expression of mannose binding lectin in HIV-1-infected brain: implications for HIV-related neuronal damage and neuroAIDS / K. K. Singh, S. Nathamu, A. Adame et al. // *Neurobehav HIV Med.* — 2011. — Vol. 3. — P. 41–52.

[111] Extensive astrocyte infection is prominent in human immunodeficiency virus-associated dementia / M. J. Churchill, S. L. Wesselingh, D. Cowley et al. // *Ann. Neurol.* — 2009. — Vol. 66, no. 2. — P. 253–258.

[112] Eyre, R. C. Multiple drug resistance mutations in human immunodeficiency virus in semen but not blood of a man on antiretroviral therapy / R. C. Eyre, G. Zheng, A. A. Kiessling // *Urology*. — 2000. — Vol. 55, no. 4. — P. 591.

[113] Factors influencing virological response to antiretroviral drugs in cerebrospinal fluid of advanced HIV-1-infected patients / A. Antinori, M. L. Giancola, S. Grisetti et al. // *AIDS*. — 2002. — Vol. 16, no. 14. — P. 1867–1876.

[114] Fauci, A. S. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis / A. S. Fauci // *Science*. — 1988. — Vol. 239, no. 4840. — P. 617–622.

[115] Fidelity of two retroviral reverse transcriptases during DNA-dependent DNA synthesis in vitro / J. D. Roberts, B. D. Preston, L. A. Johnston et al. // *Mol. Cell. Biol.* — 1989. — Vol. 9, no. 2. — P. 469–476.

[116] From hematopoiesis to neuropoiesis: evidence of overlapping genetic programs / A. V. Terskikh, M. C. Easterday, L. Li et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2001. — Vol. 98, no. 14. — P. 7934–7939.

[117] Gabuzda, D. Chemokine receptors and virus entry in the central nervous system / D. Gabuzda, J. Wang // *J. Neurovirol.* — 1999. — Vol. 5, no. 6. — P. 643–658.

[118] Gabuzda, D. Chemokine receptors and mechanisms of cell death in HIV neuropathogenesis / D. Gabuzda, J. Wang // *J. Neurovirol.* — 2000. — Vol. 6 Suppl 1. — P. 24–32.

[119] Genetic and functional analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 env genes derived from brain and blood of patients with AIDS / A. Ohagen, A. Devitt, K. J. Kunstman et al. // *J. Virol.* — 2003. — Vol. 77, no. 22. — P. 12336–12345.

[120] Genetic and functional heterogeneity of CNS-derived tat alleles from patients with HIV-associated dementia / D. Cowley, L. R. Gray, S. L. Wesselingh et al. // *J. Neurovirol.* — 2011. — Vol. 17, no. 1. — P. 70–81.

[121] Genetic composition of human immunodeficiency virus type 1 in cerebrospinal fluid and blood without treatment and during failing antiretroviral therapy / M. C. Strain, S. Letendre, S. K. Pillai et al. // *J. Virol.* — 2005. — Vol. 79, no. 3. — P. 1772–1788.

[122] Genetic differences between blood- and brain-derived viral sequences from human immunodeficiency virus type 1-infected patients: evidence of conserved elements in the V3 region of the envelope protein of brain-derived sequences / B. T. Korber, K. J. Kunstman, B. K. Patterson et al. // *J. Virol.* — 1994. — Vol. 68, no. 11. — P. 7467–7481.

[123] Genital tract HIV-1 RNA shedding among women with below detectable plasma viral load / S. Cu-Uvin, A. K. DeLong, K. K. Venkatesh et al. // *AIDS.* — 2010. — Vol. 24, no. 16. — P. 2489–2497.

[124] Genotypic analysis of HIV-1 drug resistance at the limit of detection: virus production without evolution in treated adults with undetectable HIV loads /

T. L. Kieffer, M. M. Finucane, R. E. Nettles et al. // *J. Infect. Dis.* — 2004. — Vol. 189, no. 8. — P. 1452–1465.

[125] Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1 / A. Bajetto, R. Bonavia, S. Barbero et al. // *J. Neurochem.* — 1999. — Vol. 73, no. 6. — P. 2348–2357.

[126] Glial cell responses to herpesvirus infections: role in defense and immunopathogenesis / J. R. Lokensgard, M. C. Cheeran, S. Hu et al. // *J. Infect. Dis.* — 2002. — Vol. 186 Suppl 2. — P. S171–179.

[127] Global analysis of sequence diversity within HIV-1 subtypes across geographic regions / A. Huang, J. W. Hogan, S. Istrail et al. // *Future Virol.* — 2012. — Vol. 7, no. 5. — P. 505–517.

[128] Guillemin, G. J. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification / G. J. Guillemin, B. J. Brew // *J. Leukoc. Biol.* — 2004. — Vol. 75, no. 3. — P. 388–397.

[129] Hao, H. N. HIV infection of fetal human astrocytes: the potential role of a receptor-mediated endocytic pathway / H. N. Hao, W. D. Lyman // *Brain Res.* — 1999. — Vol. 823, no. 1-2. — P. 24–32.

[130] Higher concentration of HIV RNA in rectal mucosa secretions than in blood and seminal plasma, among men who have sex with men, independent of antiretroviral therapy / R. A. Zuckerman, W. L. Whittington, C. L. Celum et al. // *J. Infect. Dis.* — 2004. — Vol. 190, no. 1. — P. 156–161.

[131] HIV-1 and recombinant gp120 affect the survival and differentiation of human vessel wall-derived mesenchymal stem cells / D. Gibellini, F. Alviano, A. Miserocchi et al. // *Retrovirology.* — 2011. — Vol. 8. — P. 40.

[132] HIV-1 clade-specific differences in the induction of neuropathogenesis / V. R. Rao, A. R. Sas, E. A. Eugenin et al. // *J. Neurosci.* — 2008. — Vol. 28, no. 40. — P. 10010–10016.

[133] HIV-1 drug resistance profiles in children and adults with viral load of <50 copies/ml receiving combination therapy / M. Hermankova, S. C. Ray, C. Ruff et al. // *JAMA.* — 2001. — Vol. 286, no. 2. — P. 196–207.

[134] HIV-1 interaction with human mannose receptor (hMR) induces production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) through hMR-mediated intracellular signaling in astrocytes / A. Lopez-Herrera, Y. Liu, M. T. Rugeles, J. J. He // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2005. — Vol. 1741, no. 1-2. — P. 55–64.

[135] HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread / N. Sol-Foulon, A. Moris, C. Nobile et al. // *Immunity.* — 2002. — Vol. 16, no. 1. — P. 145–155.

[136] HIV-1 neuropathogenesis: therapeutic strategies against neuronal loss induced by gp120/Tat glycoprotein in the central nervous system] / J. J. Merino, M. L. Montes, A. Blanco et al. // *Rev Neurol.* — 2011. — Vol. 52, no. 2. — P. 101–111.

[137] HIV-1 viral escape in cerebrospinal fluid of subjects on suppressive antiretroviral treatment / A. Eden, D. Fuchs, L. Hagberg et al. // *J. Infect. Dis.* — 2010. — Vol. 202, no. 12. — P. 1819–1825.

[138] HIV-associated central nervous system diseases in the recent combination antiretroviral therapy era / L. Garvey, A. Winston, J. Walsh et al. // *Eur. J. Neurol.* — 2011. — Vol. 18, no. 3. — P. 527–534.

[139] HIV-associated neurocognitive disorders before and during the era of combination antiretroviral therapy: differences in rates, nature, and predictors. / Robert K. Heaton, Donald R. Franklin, Ronald J. Ellis et al. // *J Neurovirol.* — 2011. — Vol. 17, no. 1. — P. 3–16.

[140] HIV detection in amniotic fluid samples. Amniocentesis can be performed in HIV pregnant women? / V. Maiques, A. Garcia-Tejedor, A. Perales et al. // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* — 2003. — Vol. 108, no. 2. — P. 137–141.

[141] HIV encephalitis despite suppressed viraemia: a case of compartmentalized viral escape / R. Bingham, N. Ahmed, P. Rangi et al. // *Int J STD AIDS.* — 2011. — Vol. 22, no. 10. — P. 608–609.

[142] HIV genetic diversity between plasma and cerebrospinal fluid in patients with HIV encephalitis / C. Soulie, S. Fourati, S. Lambert-Niclot et al. // *AIDS*. — 2010. — Vol. 24, no. 15. — P. 2412–2414.

[143] HIV Migration Between Blood and Cerebrospinal Fluid or Semen Over Time / A. Chaillon, S. Gianella, J. O. Wertheim et al. // *J. Infect. Dis.* — 2014.

[144] HIV subtype D is associated with dementia, compared with subtype A, in immunosuppressed individuals at risk of cognitive impairment in Kampala, Uganda / N. Sacktor, N. Nakasujja, R. L. Skolasky et al. // *Clin. Infect. Dis.* — 2009. — Vol. 49, no. 5. — P. 780–786.

[145] HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview / E. Fanales-Belasio, M. Raimondo, B. Suligoj, S. Butto // *Ann. Ist. Super. Sanita.* — 2010. — Vol. 46, no. 1. — P. 5–14.

[146] Hladik, F. Preventing mucosal HIV transmission with topical microbicides: challenges and opportunities / F. Hladik, G. F. Doncel // *Antiviral Res.* — 2010. — Vol. 88 Suppl 1. — P. 3–9.

[147] Human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders: Mind the gap / J. C. McArthur, J. Steiner, N. Sacktor, A. Nath // *Ann. Neurol.* — 2010. — Vol. 67, no. 6. — P. 699–714.

[148] Human immunodeficiency virus infection of human astrocytes disrupts blood-brain barrier integrity by a gap junction-dependent mechanism / E. A. Eugenin, J. E. Clements, M. C. Zink, J. W. Berman // *J. Neurosci.* — 2011. — Vol. 31, no. 26. — P. 9456–9465.

[149] Human immunodeficiency virus isolated from amniotic fluid / D. C. Mundy, R. F. Schinazi, A. R. Gerber et al. // *Lancet*. — 1987. — Vol. 2, no. 8556. — P. 459–460.

[150] Human immunodeficiency virus load in breast milk, mastitis, and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 / R. D. Semba, N. Kumwenda, D. R. Hoover et al. // *J. Infect. Dis.* — 1999. — Vol. 180, no. 1. — P. 93–98.

[151] Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database / S. Y. Rhee, M. J. Gonzales, R. Kantor et al. // *Nucleic Acids Res.* — 2003. — Vol. 31, no. 1. — P. 298–303.

[152] Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway / N. Q. Liu, A. S. Lossinsky, W. Popik et al. // *J. Virol.* — 2002. — Vol. 76, no. 13. — P. 6689–6700.

[153] Human immunodeficiency virus type 1 Tat and methamphetamine affect the release and activation of matrix-degrading proteinases / K. Conant, C. St Hillaire, C. Anderson et al. // *J. Neurovirol.* — 2004. — Vol. 10, no. 1. — P. 21–28.

[154] Iadecola, C. Glial regulation of the cerebral microvasculature / C. Iadecola, M. Nedergaard // *Nat. Neurosci.* — 2007. — Vol. 10, no. 11. — P. 1369–1376.

[155] Identification of ongoing human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication in residual viremia during recombinant HIV-1 poxvirus immunizations in patients with clinically undetectable viral loads on durable suppressive highly active antiretroviral therapy / C. Shiu, C. K. Cunningham, T. Greenough et al. // *J. Virol.* — 2009. — Vol. 83, no. 19. — P. 9731–9742.

[156] Impact of HAART and CNS-penetrating antiretroviral regimens on HIV encephalopathy among perinatally infected children and adolescents / K. Patel, X. Ming, P. L. Williams et al. // *AIDS.* — 2009. — Vol. 23, no. 14. — P. 1893–1901.

[157] Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS / H. W. Kestler, D. J. Ringler, K. Mori et al. // *Cell.* — 1991. — Vol. 65, no. 4. — P. 651–662.

[158] In vivo and in vitro infection of the astrocyte by HIV-1 / K. Conant, C. Tornatore, W. Atwood et al. // *Adv. Neuroimmunol.* — 1994. — Vol. 4, no. 3. — P. 287–289.

[159] Incidence and impact on mortality of severe neurocognitive disorders in persons with and without HIV infection: a Danish nationwide cohort study /

F. X. Lescure, L. H. Omland, F. N. Engsig et al. // *Clin. Infect. Dis.* — 2011. — Vol. 52, no. 2. — P. 235–243.

[160] Increased activity of matrix metalloproteinases in the cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated neurological diseases / G. M. Liuzzi, C. M. Mastroianni, M. P. Santacroce et al. // *J. Neurovirol.* — 2000. — Vol. 6, no. 2. — P. 156–163.

[161] Independent evolution of human immunodeficiency virus (HIV) drug resistance mutations in diverse areas of the brain in HIV-infected patients, with and without dementia, on antiretroviral treatment / T. K. Smit, B. J. Brew, W. Tourtellotte et al. // *J. Virol.* — 2004. — Vol. 78, no. 18. — P. 10133–10148.

[162] Intercompartmental recombination of HIV-1 contributes to env intrahost diversity and modulates viral tropism and sensitivity to entry inhibitors / R. J. Brown, P. J. Peters, C. Caron et al. // *J. Virol.* — 2011. — Vol. 85, no. 12. — P. 6024–6037.

[163] Investigation of HIV in amniotic fluid from HIV-infected pregnant women at full term / B. K. Mohlala, T. J. Tucker, M. J. Besser et al. // *J. Infect. Dis.* — 2005. — Vol. 192, no. 3. — P. 488–491.

[164] Ioannidis, J. P. Long-term productive human immunodeficiency virus-1 infection in human infant microglia / J. P. Ioannidis, S. Reichlin, P. R. Skolnik // *Am. J. Pathol.* — 1995. — Vol. 147, no. 5. — P. 1200–1206.

[165] Isolated human astrocytes are not susceptible to infection by M- and T-tropic HIV-1 strains despite functional expression of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 / A. Boutet, H. Salim, Y. Taoufik et al. // *Glia.* — 2001. — Vol. 34, no. 3. — P. 165–177.

[166] Isolation and long-term culture of primary ocular human immunodeficiency virus type 1 isolates in primary astrocytes / M. Canki, M. J. Potash, G. Bentsman et al. // *J. Neurovirol.* — 1997. — Vol. 3, no. 1. — P. 10–15.

[167] Ji, X. Mannose binding lectin (MBL) and HIV / X. Ji, H. Gewurz, G. T. Spear // *Mol. Immunol.* — 2005. — Vol. 42, no. 2. — P. 145–152.

[168] Kassutto, S. Primary HIV type 1 infection / S. Kassutto, E. S. Rosenberg // *Clin. Infect. Dis.* — 2004. — Vol. 38, no. 10. — P. 1447–1453.

[169] Kaul, M. Chemokines and activated macrophages in HIV gp120-induced neuronal apoptosis / M. Kaul, S. A. Lipton // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1999. — Vol. 96, no. 14. — P. 8212–8216.

[170] Kaushic, C. HIV-1 infection in the female reproductive tract: role of interactions between HIV-1 and genital epithelial cells / C. Kaushic // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 2011. — Vol. 65, no. 3. — P. 253–260.

[171] Kolson, D. L. The effects of human immunodeficiency virus in the central nervous system / D. L. Kolson, E. Lavi, F. Gonzalez-Scarano // *Adv. Virus Res.* — 1998. — Vol. 50. — P. 1–47.

[172] Korn, J. Neuroectodermal origin of brain pericytes and vascular smooth muscle cells / J. Korn, B. Christ, H. Kurz // *J. Comp. Neurol.* — 2002. — Vol. 442, no. 1. — P. 78–88.

[173] Kumar, S. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers / S. Kumar, K. Tamura, M. Nei // *Comput. Appl. Biosci.* — 1994. — Vol. 10, no. 2. — P. 189–191.

[174] Kusuhara, H. Active efflux across the blood-brain barrier: role of the solute carrier family / H. Kusuhara, Y. Sugiyama // *NeuroRx.* — 2005. — Vol. 2, no. 1. — P. 73–85.

[175] Lack of evidence for protease evolution in HIV-1-infected patients after 2 years of successful highly active antiretroviral therapy / M. Parera, A. Ibanez, B. Clotet, M. A. Martinez // *J. Infect. Dis.* — 2004. — Vol. 189, no. 8. — P. 1444–1451.

[176] Letendre, S. Central nervous system complications in HIV disease: HIV-associated neurocognitive disorder / S. Letendre // *Top Antivir Med.* — 2011. — Vol. 19, no. 4. — P. 137–142.

[177] Limited penetration of lopinavir and ritonavir in the genital tract of men infected with HIV-1 in Brazil / T. R. Vergara, R. C. Estrela, G. Suarez-Kurtz et al. // *Ther Drug Monit.* — 2006. — Vol. 28, no. 2. — P. 175–179.

[178] Limited penetration of lopinavir into seminal plasma of HIV-1-infected men / S. U. Sankatsing, J. Droste, D. Burger et al. // *AIDS*. — 2002. — Vol. 16, no. 12. — P. 1698–1700.

[179] Localization of HIV-1 co-receptors CCR5 and CXCR4 in the brain of children with AIDS / A. V. Vallat, U. De Girolami, J. He et al. // *Am. J. Pathol.* — 1998. — Vol. 152, no. 1. — P. 167–178.

[180] Loss of the N-linked glycosylation site at position 386 in the HIV envelope V4 region enhances macrophage tropism and is associated with dementia / R. L. Dunfee, E. R. Thomas, J. Wang et al. // *Virology*. — 2007. — Vol. 367, no. 1. — P. 222–234.

[181] Louboutin, J. P. Blood-brain barrier abnormalities caused by HIV-1 gp120: mechanistic and therapeutic implications / J. P. Louboutin, D. S. Strayer // *ScientificWorldJournal*. — 2012. — Vol. 2012. — P. 482575.

[182] Lymphoproliferative immune function in the Sydney Blood Bank Cohort, infected with natural nef/long terminal repeat mutants, and in other long-term survivors of transfusion-acquired HIV-1 infection / W. B. Dyer, A. F. Geczy, S. J. Kent et al. // *AIDS*. — 1997. — Vol. 11, no. 13. — P. 1565–1574.

[183] Ma, M. Characterization of a novel binding site for the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein gp120 on human fetal astrocytes / M. Ma, J. D. Geiger, A. Nath // *J. Virol.* — 1994. — Vol. 68, no. 10. — P. 6824–6828.

[184] Mayr, E. *Evolution as a process* / E. Mayr / Ed. by J. Huxley, A. C. Hardy, E. B. Ford. — Allen & Unwin, 1954. — P. 157–180.

[185] McArthur, J. C. HIV-associated neurocognitive disorders: is there a hidden epidemic? / J. C. McArthur, B. J. Brew // *AIDS*. — 2010. — Vol. 24, no. 9. — P. 1367–1370.

[186] McCarthy, M. HIV-1 strain-associated variability in infection of primary neuroglia / M. McCarthy, J. He, C. Wood // *J. Neurovirol.* — 1998. — Vol. 4, no. 1. — P. 80–89.

[187] MEGA-CC: computing core of molecular evolutionary genetics analysis program for automated and iterative data analysis / S. Kumar, G. Stecher, D. Peterson, K. Tamura // *Bioinformatics*. — 2012. — Vol. 28, no. 20. — P. 2685–2686.

[188] MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar // *Mol. Biol. Evol.* — 2007. — Vol. 24, no. 8. — P. 1596–1599.

[189] Monocyte maturation, HIV susceptibility, and transmigration across the blood brain barrier are critical in HIV neuropathogenesis / D. W. Williams, E. A. Eugenin, T. M. Calderon, J. W. Berman // *J. Leukoc. Biol.* — 2012. — Vol. 91, no. 3. — P. 401–415.

[190] Moses, A. V. HIV infection of human brain capillary endothelial cells—implications for AIDS dementia / A. V. Moses, J. A. Nelson // *Adv. Neuroimmunol.* — 1994. — Vol. 4, no. 3. — P. 239–247.

[191] Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease / C. E. Johanson, J. A. Duncan, P. M. Klinge et al. // *Cerebrospinal Fluid Res.* — 2008. — Vol. 5. — P. 10.

[192] Murray, J. M. Timing of the components of the HIV life cycle in productively infected CD4+ T cells in a population of HIV-infected individuals / J. M. Murray, A. D. Kelleher, D. A. Cooper // *J. Virol.* — 2011. — Vol. 85, no. 20. — P. 10798–10805.

[193] Nakagawa, S. Infection of human pericytes by HIV-1 disrupts the integrity of the blood-brain barrier / S. Nakagawa, V. Castro, M. Toborek // *J. Cell. Mol. Med.* — 2012. — Vol. 16, no. 12. — P. 2950–2957.

[194] Nath, A. Eradication of HIV from the brain: reasons for pause / A. Nath, J. E. Clements // *AIDS*. — 2011. — Vol. 25, no. 5. — P. 577–580.

[195] Neurological symptoms during primary human immunodeficiency virus (HIV) infection correlate with high levels of HIV RNA in cerebrospinal fluid / G. Tambussi, A. Gori, B. Capiluppi et al. // *Clin. Infect. Dis.* — 2000. — Vol. 30, no. 6. — P. 962–965.

[196] Neurotoxicity of HIV-1 proteins gp120 and Tat in the rat striatum / A. K. Bansal, C. F. Mactutus, A. Nath et al. // *Brain Res.* — 2000. — Vol. 879, no. 1-2. — P. 42–49.

[197] Neurovirological correlation with HIV-associated neurocognitive disorders and encephalitis in a HAART-era cohort / B. B. Gelman, J. G. Lisinicchia, S. Morgello et al. // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* — 2013. — Vol. 62, no. 5. — P. 487–495.

[198] Nowak, M. HIV mutation rate / M. Nowak // *Nature.* — 1990. — Vol. 347, no. 6293. — P. 522.

[199] Ongoing HIV replication in cerebrospinal fluid under successful monotherapy / M. Bierhoff, C. A. Boucher, A. Fibriani, R. W. Ten Kate // *Antivir. Ther. (Lond.).* — 2013.

[200] Origin of microglia / C. Kaur, A. J. Hao, C. H. Wu, E. A. Ling // *Microsc. Res. Tech.* — 2001. — Vol. 54, no. 1. — P. 2–9.

[201] Penetration of efavirenz into the male genital tract: drug concentrations and antiviral activity in semen and blood of HIV-1-infected men / S. Taylor, H. Reynolds, C. A. Sabin et al. // *AIDS.* — 2001. — Vol. 15, no. 15. — P. 2051–2053.

[202] Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury / P. Dore-Duffy, C. Owen, R. Balabanov et al. // *Microvasc. Res.* — 2000. — Vol. 60, no. 1. — P. 55–69.

[203] Pericytes regulate the blood-brain barrier / A. Armulik, G. Genove, M. Mae et al. // *Nature.* — 2010. — Vol. 468, no. 7323. — P. 557–561.

[204] Persistent HIV RNA shedding in semen despite effective antiretroviral therapy / P. M. Sheth, C. Kovacs, K. S. Kemal et al. // *AIDS.* — 2009. — Vol. 23, no. 15. — P. 2050–2054.

[205] Pharmacokinetic and pharmacodynamic investigation of efavirenz in the semen and blood of human immunodeficiency virus type 1-infected men / Y. S. Reddy, S. K. Gotzkowsky, J. J. Eron et al. // *J. Infect. Dis.* — 2002. — Vol. 186, no. 9. — P. 1339–1343.

[206] Plasma and cerebrospinal fluid human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) RNA levels in HIV-related cognitive impairment / B. Stankoff, V. Calvez, S. Suarez et al. // *Eur. J. Neurol.* — 1999. — Vol. 6, no. 6. — P. 669–675.

[207] Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions / J. C. Saez, V. M. Berthoud, M. C. Branes et al. // *Physiol. Rev.* — 2003. — Vol. 83, no. 4. — P. 1359–1400.

[208] Preston, B. D. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase / B. D. Preston, B. J. Poiesz, L. A. Loeb // *Science.* — 1988. — Vol. 242, no. 4882. — P. 1168–1171.

[209] Primary isolated human brain microvascular endothelial cells express diverse HIV/SIV-associated chemokine coreceptors and DC-SIGN and L-SIGN / M. Mukhtar, S. Harley, P. Chen et al. // *Virology.* — 2002. — Vol. 297, no. 1. — P. 78–88.

[210] Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus / C. J. Miller, Q. Li, K. Abel et al. // *J. Virol.* — 2005. — Vol. 79, no. 14. — P. 9217–9227.

[211] Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis / B. Ramratnam, S. Bonhoeffer, J. Binley et al. // *Lancet.* — 1999. — Vol. 354, no. 9192. — P. 1782–1785.

[212] Replication of different clones of human immunodeficiency virus type 1 in primary fetal human astrocytes: enhancement of viral gene expression by Nef / M. Bencheikh, G. Bentsman, N. Sarkissian et al. // *J. Neurovirol.* — 1999. — Vol. 5, no. 2. — P. 115–124.

[213] Restriction of human immunodeficiency virus type 1 production in a human astrocytoma cell line is associated with a cellular block in Rev function / M. Neumann, B. K. Felber, A. Kleinschmidt et al. // *J. Virol.* — 1995. — Vol. 69, no. 4. — P. 2159–2167.

[214] Rosenberg, G. A. Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier / G. A. Rosenberg // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2012. — Vol. 32, no. 7. — P. 1139–1151.

[215] Rumbaugh, J. A. Developments in HIV neuropathogenesis / J. A. Rumbaugh, A. Nath // *Curr. Pharm. Des.* — 2006. — Vol. 12, no. 9. — P. 1023–1044.

[216] Saitou, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // *Mol. Biol. Evol.* — 1987. — Vol. 4, no. 4. — P. 406–425.

[217] Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1977. — Vol. 74, no. 12. — P. 5463–5467.

[218] Schweighardt, B. HIV type 1 infection of human astrocytes is restricted by inefficient viral entry / B. Schweighardt, W. J. Atwood // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* — 2001. — Vol. 17, no. 12. — P. 1133–1142.

[219] Shafer, R. W. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and protease mutation search engine for queries / R. W. Shafer, D. R. Jung, B. J. Betts // *Nat. Med.* — 2000. — Vol. 6, no. 11. — P. 1290–1292.

[220] Shattock, R. J. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection / R. J. Shattock, J. P. Moore // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2003. — Vol. 1, no. 1. — P. 25–34.

[221] Sierra, S. Basics of the virology of HIV-1 and its replication / S. Sierra, B. Kupfer, R. Kaiser // *J. Clin. Virol.* — 2005. — Vol. 34, no. 4. — P. 233–244.

[222] Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells / T. M. Reilly, R. Seldes, W. Luchetti, C. T. Brighton // *Clin. Orthop. Relat. Res.* — 1998. — no. 346. — P. 95–103.

[223] Smith, D. E. Peptide and peptide analog transport systems at the blood-CSF barrier / D. E. Smith, C. E. Johanson, R. F. Keep // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2004. — Vol. 56, no. 12. — P. 1765–1791.

[224] Tang, M. W. The HIVdb system for HIV-1 genotypic resistance interpretation / M. W. Tang, T. F. Liu, R. W. Shafer // *Intervirology.* — 2012. — Vol. 55, no. 2. — P. 98–101.

[225] Taylor, B. S. The challenge of HIV-1 subtype diversity / B. S. Taylor, S. M. Hammer // *N. Engl. J. Med.* — 2008. — Vol. 359, no. 18. — P. 1965–1966.

[226] Tebit, D. M. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease / D. M. Tebit, E. J. Arts // *Lancet Infect Dis.* — 2011. — Vol. 11, no. 1. — P. 45–56.

[227] Temporal and lateral dynamics of HIV shedding and elevated sodium in breast milk among HIV-positive mothers during the first 4 months of breast-feeding / K. Semrau, M. Ghosh, C. Kankasa et al. // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* — 2008. — Vol. 47, no. 3. — P. 320–328.

[228] The HIV Env variant N283 enhances macrophage tropism and is associated with brain infection and dementia / R. L. Dunfee, E. R. Thomas, P. R. Gorry et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2006. — Vol. 103, no. 41. — P. 15160–15165.

[229] The safety, plasma pharmacokinetics, and antiviral activity of subcutaneous enfuvirtide (T-20), a peptide inhibitor of gp41-mediated virus fusion, in HIV-infected adults / J. M. Kilby, J. P. Lalezari, J. J. Eron et al. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* — 2002. — Vol. 18, no. 10. — P. 685–693.

[230] Tokarev, A. Misdirection of membrane trafficking by HIV-1 Vpu and Nef: Keys to viral virulence and persistence / A. Tokarev, J. Guatelli // *Cell Logist.* — 2011. — Vol. 1, no. 3. — P. 90–102.

[231] Trans-infection but not infection from within endosomal compartments after cell-to-cell HIV-1 transfer to CD4+ T cells / M. Permanyer, E. Ballana, R. Badia et al. // *J Biol Chem.* — 2012.

[232] Transport of human immunodeficiency virus type 1 pseudoviruses across the blood-brain barrier: role of envelope proteins and adsorptive endocytosis / W. A. Banks, E. O. Freed, K. M. Wolf et al. // *J. Virol.* — 2001. — Vol. 75, no. 10. — P. 4681–4691.

[233] Treatment intensification has no effect on the HIV-1 central nervous system infection in patients on suppressive antiretroviral therapy / A. Yilmaz,

C. Verhofstede, A. D'Avolio et al. // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* — 2010. — Vol. 55, no. 5. — P. 590–596.

[234] Validation of the CNS Penetration-Effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system / S. Letendre, J. Marquie-Beck, E. Capparelli et al. // *Arch. Neurol.* — 2008. — Vol. 65, no. 1. — P. 65–70.

[235] Vijaykumar, T. S. Chloroquine mediated molecular tuning of astrocytes for enhanced permissiveness to HIV infection / T. S. Vijaykumar, A. Nath, A. Chauhan // *Virology.* — 2008. — Vol. 381, no. 1. — P. 1–5.

[236] Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection / X. Wei, S. K. Ghosh, M. E. Taylor et al. // *Nature.* — 1995. — Vol. 373, no. 6510. — P. 117–122.

[237] Winston, A. Superior neurocognitive function is associated with central nervous system antiretroviral drug penetration only in regimens containing more than three antiretroviral agents / A. Winston, L. Garvey, C. A. Sabin // *AIDS.* — 2011. — Vol. 25, no. 7. — P. 1014–1015.

[238] Wu, L. Biology of HIV mucosal transmission / L. Wu // *Curr Opin HIV AIDS.* — 2008. — Vol. 3, no. 5. — P. 534–540.

[239] Yang, Y. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease / Y. Yang, G. A. Rosenberg // *Stroke.* — 2011. — Vol. 42, no. 11. — P. 3323–3328.

[240] Zuckerkandl, E. Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity / E. Zuckerkandl, L.B. Pauling // *Horizons in Biochemistry* / Ed. by M. Kasha, B Pullman. — Academic Press, New York, 1962. — P. 189–225.

[241] Глобальный доклад: доклад ЮНЭЙДС о глобальной эпидемии СПИДа [Электронный ресурс] / Организация Объединенных Наций по ВИЧ/СПИДу (ЮНЭЙДС). — 2012. — URL:http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_with_annexes_ru.pdf (дата обращения: 23.03.2013).

[242] Как прийти к цели "ноль": Быстрее. Разумнее. Лучше. [Электронный ресурс] : доклад ЮНЭЙДС к Всемирному дню борьбы со СПИДом / Организация Объединенных Наций по ВИЧ/СПИДу (ЮНЭЙДС). — 2011. —

URL:http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2011/JC2216_WorldAIDSday_report_2011_ru.pdf (дата обращения: 23.03.2013).

[243] Количество ВИЧ-инфицированных в России за 2012 год [Электронный ресурс]: информационный бюллетень / Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом [Электронный ресурс]. — № 35. — URL: <http://www.hivrussia.org/stat/2012-3.shtml> (дата обращения: 20.04.2013).

[244] Abbott RealTime HIV-1: manual. [Electronic resource]. — URL: <http://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/bloodbloodproducts/approvedproducts/premarketapprovals/pmas/ucm091193.pdf> (дата обращения 05.11.2013).

[245] Central nervous system compartmentalization of HIV-1 subtype C variants early and late in infection in young children [Electronic resource] / C. B. Sturdevant, A. Dow, C. B. Jabara et al. // *PLoS Pathog.* — 2012. — Vol. 8, no. 12. — P. e1003094.

[246] CNS penetration effectiveness of cART and neuropsychological outcomes: Cross-sectional results from the OHTN cohort study. [Electronic resource] / S.B. Rourke, A. Carvalhal, A.R. Zipursky et al. // Paper presented at the 19th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. — Washington, USA, 2012. — URL:<http://www.retroconference.org/2012b/Abstracts/43836.htm> (дата обращения 05.02.2013).

[247] Comparative performance of the REGA subtyping tool version 2 versus version 1 [Electronic resource] / A. B. Abecasis, Y. Wang, P. Libin et al. // *Infect. Genet. Evol.* — 2010. — Vol. 10, no. 3. — P. 380–385. — URL:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134809002159> (дата обращения 25.03.2013).

[248] Correlates of CSF Viral Loads in 1221 Volunteers of the CHARTER Cohort. [Electronic resource] / S. Letendre, C. FitzSimons, R. Ellis et al. // Paper presented at the 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. — San Francisco, USA, 2010. — URL:<http://retroconference.org/2010/Abstracts/38339.htm> (дата обращения 31.07.2012).

[249] Correlates of time-to-loss-of-viral-response in CSF and plasma in the CHARTER cohort. [Electronic resource] / S. Letendre, R. Ellis, R. Deutsch et al. // Paper presented at the 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. — San Francisco, USA, 2010. — URL:<http://retroconference.org/2010/PDFs/430.pdf> (дата обращения 05.02.2013).

[250] Does cART with greater CNS penetration prevent the development of CNS opportunistic diseases? [Electronic resource] / L. Garvey, A. Winston, C. Sabin, the UK CHIC Study Group // Paper presented at the 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. — San Francisco, USA, 2010. — URL:<http://retroconference.org/2010/Abstracts/38931.htm> (дата обращения: 23.03.2013).

[251] Earlier initiation of antiretroviral therapy results in better neurocognitive functioning. [Electronic resource] / T.D. Marcotte, M. Ghate, R. Deutsch et al. // Paper presented at the 19th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. — Washington, USA, 2012. — URL:<http://www.retroconference.org/2012b/PDFs/485.pdf> (дата обращения: 23.03.2013).

[252] Examining the impact of CNS penetration effectiveness of combination antiretroviral treatment (cART) on neuropsychological outcomes in persons living with HIV: findings from the Ontario HIV Treatment Network (OHTN) cohort study. [Electronic resource] / S.B. Rourke, A. Carvalhal, A.R. Zipursky et al. // Paper presented at the 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. — Rome, Italy, 2011. — URL:(дата обращения: 23.03.2013).

[253] Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation [Electronic resource] / A. Nazli, O. Chan, W. N. Dobson-Belaire et al. // PLoS Pathog. — 2010. — Vol. 6, no. 4. — P. e1000852.

[254] Genetic characterization of diverse HIV-1 strains circulating in Russia. [Electronic resource] / N. Marlowe, P. Swanson, L. Fang et al. // Paper presented at the 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. — San Francisco, USA, 2010. — URL:<http://retroconference.org/2010/PDFs/439.pdf> (дата обращения: 23.03.2013).

[255] Genotypic analyses of HIV in antiretroviral drug-naive patients from Moscow and Moscow region, Russia. [Electronic resource] / M. Nosik, R. Ryzhov, A. Kravtchenko et al. // Paper presented at the 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. — Rome, Italy, 2011. — URL:<http://pag.ias2011.org/Abstracts.aspx?AID=555> (дата обращения: 23.03.2013).

[256] Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents / A working group of the office of AIDS research advisory council (OARAC). [Electronic resource]. — <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf> (Дата обращения 27.11.2013).

[257] High frequency of neurocognitive disorders in older HIV-infected patients despite a sustained virological and immunological response on cART: The sigma study. [Electronic resource] / A. Dulioust, N. Lerolle, P. Dolphin et al. // Paper presented at the 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. — Montreal, Canada, 2009. — URL:<http://retroconference.org/2009/Abstracts/34961.htm> (дата обращения: 23.03.2013).

[258] High prevalence of mild neurocognitive disorders in HIV-infected patients, ANRS CO3 aquitaine cohort. [Electronic resource] / F. Bonnet, H. Amieva, M. Bruyand et al. // Paper presented at the 16th Conference on Retroviruses and

Opportunistic Infections. — Montreal, Canada, 2009. — URL:<http://retroconference.org/2009/Abstracts/34643.htm> (дата обращения: 23.03.2013).

[259] HIV-associated neurocognitive impairment remains prevalent in the era of combination ART: The CHARTER study. [Electronic resource] / R. Heaton, D. Franklin, D. Clifford et al. // Paper presented at the 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. — Montreal, Canada, 2009. — URL:<http://retroconference.org/2009/Abstracts/35664.htm> (дата обращения: 23.03.2013).

[260] HIV gp120 binds to mannose receptor on vaginal epithelial cells and induces production of matrix metalloproteinases [Electronic resource] / S. E. Fanibunda, D. N. Modi, J. S. Gokral, A. H. Bandivdekar // PLoS ONE. — 2011. — Vol. 6, no. 11. — P. e28014.

[261] HIV sequence database. [Electronic resource] // Los Alamos National Laboratory. — URL: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HelpDocs/subtypes-more.html> (дата обращения 20.04.2013).

[262] Les personnes seropositives ne souffrant d'aucune autre mst et suivant un traitement antiretroviral efficace ne transmettent pas le vih par voie sexuelle / P. Vernaa, B. Hirschel, E. Bernasconi, M. Flepp // Bulletin des medecins suisses. — 2008. — Vol. 89, no. 5. — P. 165–169. — URL: http://www.edwinjbernard.com/pdfs/Swiss%20Commission%20statement_May%202008_translation%20EN.pdf (дата обращения 21.04.2013).

[263] Nakagomi, T. Neural stem cells after brain injury: do they originate developmentally from neural tube, neural crest, or both? [Electronic resource] / T. Nakagomi, T. Matsuyama // Stem Cell Studies. — 2011. — Vol. 1, no. 1. — P. e21. — URL: <http://www.pagepress.org/journals/index.php/scs/article/view/scs.2011.e21>.

[264] Neuradapt: A prospective study concerning HIV-related neurocognitive impairment. [Electronic resource] / M. Vassallo, A.H. Langton, C. Pradier et al. // Paper presented at the 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.

— Montreal, Canada, 2009. —

URL:<http://www.retroconference.org/2009/Abstracts/34781.htm> (дата обращения: 23.03.2013).

[265] Neurocognitive impairment in a romanian cohort of children and young adults infected with HIV-1 clade F. [Electronic resource] / D. Duiculescu, L. Ene, R. Burlacu et al. // Paper presented at the 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. — Montreal, Canada, 2009. — URL:<http://retroconference.org/2009/Abstracts/35022.htm> (дата обращения: 23.03.2013).

[266] Persistent HIV in the central nervous system during treatment is associated with worse ART penetration and cognitive impairment. [Electronic resource] / S. Letendre, D. McClernon, R. Ellis et al. // Paper presented at the 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. — Montreal, Canada, 2009. — URL:(дата обращения: 23.03.2013).

[267] Substantial multiclass transmitted drug resistance and drug-relevant polymorphisms among treatment-naive youth: a multicenter adolescent medicine trials network for HIV/AIDS interventions (ATN) study. [Electronic resource] / A. Agwu, J. Bethel, L. Hightow-Weidman et al. // Paper presented at the 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. — Roma, 2011. — URL:<http://pag.ias2011.org/Abstracts.aspx?AID=2979> (дата обращения: 23.03.2013).

[268] Time trends in drug resistant HIV-1 infections in the United Kingdom up to 2009: multicentre observational study [Electronic resource] / D. Dolling, C. Sabin, V. Delpuch et al. // BMJ. — 2012. — Vol. 345. — P. e5253. — URL:<http://www.bmj.com/content/345/bmj.e5253> (дата обращения 24.03.2013).

[269] Transmitted antiretroviral drug resistance in New York State, 2006-2008: results from a new surveillance system [Electronic resource] / A. C. Readhead, D. E. Gordon, Z. Wang et al. // PLoS ONE. — 2012. — Vol. 7, no. 8. — P. e40533. — [PubMed

Central:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3412856PMC3412856>]

[DOI:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040533>]
[PubMed:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22879878>].

[270] Transmitted drug resistance among newly diagnosed HIV-1 infected individuals in three Central American countries. [Electronic resource] / W. Murillo, S. Morales, G. Paz-Bailey et al. // Paper presented at the 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. — Rome, Italy, 2011. — URL:<http://pag.ias2011.org/Abstracts.aspx?AID=955> (дата обращения: 23.03.2013).

[271] Trends of epidemiological networks and primary resistance in ART-naive HIV-1 individuals of a large italian cohort over the 1997-2008 period. [Electronic resource] / F.R. Simonetti, A Lai, M. Franzetti et al. // Paper presented at the 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. — Rome, Italy, 2011. — URL:<http://pag.ias2011.org/Abstracts.aspx?AID=4074> (дата обращения: 23.03.2013).

[272] ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System. Version 2: user's manual. [Electronic resource]. — URL: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_041134.pdf (дата обращения 05.11.2013).