В исследовании DOLULAM ultra-deep sequencing analysis провели исследование на наличие мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью (RAM) **перед переходом** на двойную схему (DTG + 3TC) в выборке из 27 пациентов. В самом же пилотном исследовании DOLULAM за год, а затем и за 2 не было обнаружено ни одной вирусологической неудачи. Во вложении ниже написал основное из наиболее интересного, на мой взгляд, по этому исследованию:

*Критерии выборки данной французской группы:*

1. наличие подавленной ВН на протяжении не менее последних 12 мес. (медиана составила 6,4 года);
2. критерий супрессии ВН - менее 50 копий/мл;
3. неизменный режим терапии последние 12 мес.

*63% мутаций M184V/I, на самом деле, там получили суммарно, используя следующие 4 вида анализов:*

а) анализ РНК (соответственно в плазме крови) из истории болезни (медиана последнего такого анализа у пациента составила 7,9 года назад) был доступен у 18 из 27 пациентов (Сэнгер);

б) анализ ДНК (соответственно вмононуклеарных клетках крови) из истории болезни (медиана последнего такого анализа у пациента составила 3,4 года назад) был доступен у 14 из 27 пациентов (Сэнгер);

в) секвенирование ДНК (определение последовательности нуклеотидов участка генома в мононуклеарных клетках крови) также методом Сэнгера (классический устоявшийся метод, позволяющий определять те варианты геномов с мутациями, доля которых, как правило, выше 20% в популяции вируса, но не позволяющий определять их количество в популяции) удалось провести у всех 27 пациентов при переходе на двойную;

г) исследование ДНК с использованием секвенирования следующего поколения NGS (next-generation sequencing [современный метод секвенирования ДНК, позволяющий определять количество мутантных вариантов в популяции в количестве от 1% в популяции, т.е. включая минорные варианты мутантов (содержание менее 20% в популяции)] удалось провести у 22 пациентов в гене обратной транскриптазы (ОТ) и у 19 пациентов в гене интегразы при переходе на двойную.

*Небольшие ремарки:*

1) анализ ДНК хорош тем, что он позволяет определить вирусы, ушедшие в клеточный «архив» (в клеточные резервуары), но не детектируемые в популяции в настоящий момент, либо определить варианты вируса при неопределяемой ВН

2) Мутация ОТ M184V обозначает, что произошла мутация в 184 кодоне (последовательность из трех нуклеотидов – триплет) гена ОТ, кодирующем аминокислоту Метионин (М) которая привела к изменению на кодон, кодирующий аминокислоту Валин (V);

3) Мутация ОТ M184I обозначает, что произошла мутация в 184 кодоне гена ОТ, кодирующем аминокислоту Метионин (М), которая привела к изменению на кодон, кодирующий аминокислоту Изолейцин (I).

*Выпишу некоторые интересные, на мой взгляд, результаты исследования:*

1. При анализе РНК (самом раннем из истории болезни – в том числе на этапе вирусологической неудачи в прошлом) в 184 кодоне (ген ОТ) у всех 8 из 18 доступных для анализа пациентов была зафиксирована мутация M184V (а не M184I);
2. При анализе ДНК из истории болезни в 184 кодоне было зафиксировано 2 мутации M184Iи одна M184V из 14доступных для анализа пациентов (при чем ни одной из 8 мутаций M184V, полученных при анализе РНК среди этих трех не было);
3. При анализе ДНК при переходе на двойную схему по методу Сэнгера в 184 кодоне было зафиксировано 4 мутации M184Vи одна M184I (при чем 2 мутации M184Vиз 4-х совпали с анализом РНК, одна с анализом ДНК и еще одна у пациента без данных из истории болезни по обоим анализам, а одна мутация M184I совпала с анализом ДНК из истории болезни)
4. При анализе ДНК методом NG Sпри переходе на двойную схему в 184 кодоне удалось зафиксировать 3 мутации M184V и 9 мутаций M184I, из них 3 M184V + M184I, среди 3-х M184V2 варианта были мажорными/основными (64% и 34,8% содержание мутанта M184V против дикого штамма M184), а один вариант минорный (15,2% содержание данного мутанта), среди 9 мутаций M184I 2 варианта мажорных (99% и 22,1%) и 7 минорных (менее 20%). 5 вариантов было вновь выявленных (ни один из 3-х предыдущих Сэнгеров не показал (либо не было возможным измерить) мутации M184V/I, из них все 5 были минорными.
5. При анализе ДНК методом NGSпри переходе на двойную схему в гене интегразы удалось зафиксировать 6 мутаций (из них 4 минорных, 2 мажорных).

*Интересные, на мой взгляд, выводы из результатов исследования:*

1. Наличие мутаций M184V/I у лиц с подавленной ранее ВН при применении DTG + 3TC не приводило к вирусологической неудаче;
2. Причем даже наличие в подавляющем большинстве мутации M184I (у одного из пациентов ее содержание составляло 99%) не приводило к неудаче. Правда ув одном из 2-х случаев блипов (на 12 и 36 неделе, 52 и 66 копий/мл соответственно) у одного из этих пациентов была мутация M184V в мажоре.
3. Действие п.1, скорее всего объясняется тем, что:

а) у лиц с уже подавленной нагрузкой само количество лекарственно устойчивых мутантов M184V/I настолько мало (особенно у миноров), что даже с учетом 100-кратной (M184I) и 200-кратной (M184V) резистентности к ламивудину его запаса концентрации в организме при применении стандартной дозировки хватало, чтобы гасить их активность;

б) низкий фитнес (репликационная способность) данных мутантов;

низкая частота изменчивости данных мутантов (из-за высокой точности медленной мутантной ОТ, как уже писал в предыдущем посте).

1. Среди 18-и обследованных методом NGS у 14 (78%) ,были зафиксированы мутации, вызванные белковым клеточным ферментом-защитником APOBEC 3G (M184I, E138K, M230I).
2. APOBEC 3G – белок клетки человека, находящийся в цитоплазме и выполняющий функцию фермента. Его основная функция распознать чужеродные РНК/ДНК за счет нехарактерной последовательности их геномов, а затем предотвратить их репликацию. Предотвращение репликации в случае ВИЧ достигается следующим образом:

* вначале APOBEC 3G (A3G) прикрепляется к РНК ВИЧ;
* затем на этапе обратной транскрипции на минус-цепи ДНК производит дезаминирование цитидина (С), превращая тем самым его в уридин (U) на большом количестве участков минус-цепи ДНК;
* затем происходит построение плюс-цепи ДНК, с комплементарным уридину аденином (A);
* затем происходит интеграция двухцепочечной ДНК в ДНК клетки человека;
* затем в результате репарации на минус-цепи ДНК уридин заменяется на тимидин;
* затем происходит транскрипция РНК ВИЧ с минус-цепи ДНК, в результате которой вместо изначального гуанина (G) в РНК ВИЧ встает аденин (A);

в итоге происходит так называемая **гипермутация** ВИЧ, при которой многие G в РНК ВИЧ заменены на A и, следовательно, многие аминокислоты в результате трансляции с РНК ВИЧ будут другими, а некоторые вообще превратятся в стоп-кодоны, в результате чего либо произойдет остановка трансляции, лтибо будут образовываться дефектные белки ВИЧ, не способные к дальнейшей сборке вириона и выполнению своих функций (в случае ферментов ВИЧ: ОТ, интегразы, протеазы). В редких случаях образуются мутанты, способные к жизни, да еще и ставшие лекарственно устойчивыми (в тех кодонах, которые ответственны за устойчивый мутантный вариант и в которых такое изменение потенциально может быть достигнуто за счет замены G на A).

1. В данном исследовании, все геномы, где в результате секвенирования были зафиксированы гипермутации (большое количество замен G на A) или имелся в составе хотя бы один стоп-кодон были признаны дефектными;
2. Все геномы, где присутствовали мутации M184I явились в итоге дефектными. Т.е. мутация M184I явилась своиего рода маркером дефектности генома.
3. Из 6 обнаруженных мутаций интегразы ни одна серьезно воздействовать в единственном числе на DTG, в принципе, не могла, так что они не повлияли в итоге на вирусологический ответ пациентов в данном исследовании.
4. Выборка, конечно, не совсем большая (27 участников), но достаточно показательная в итоге.