

## HIV-AIDS a nádejná liečba

Infekcia HIV (vírus ľudskej imunodeficiencie) spôsobuje ochorenie imunitného systému, ktoré postupne eliminuje biele krvinky a tým efektívne znižuje obranyschopnosť ľudskeho organizmu voči iným baktériám/vírusom a infekciám/chorobám. HIV sa prenáša cez telesné tekutiny ako krv, materské mlieko či semeno. Sliny, pot a moč nie sú prenášače. Infekcia HIV pozostáva z troch štádií: akútnej infekcie, chronickej infekcie a AIDS (Syndróm získanej imunodeficiencie). AIDS reprezentuje najzávažnejšie štádium infekcie HIV, kedy vznikajú oportunistické infekcie a počet CD4 T-lymfocytov (typ bielych krviniek) v krvi klesá pod 200 na mm<sup>3</sup>. Bez liečby sa málokto s AIDS dožije viac ako tri roky. Adekvátnou liečbou sa dá život predĺžiť, či predísť progresii ochorenia do AIDS. Antiretrovirálna liečba (ART) je najčastejšie aplikovaná forma liečby pri pacientoch s AIDS. Zabraňuje replikácii vírusu, čím dáva imunitnému systému príležitosť na obnovu. Lenže kvôli vysokému počtu aktívnych kópií HIV v ľudskom tele, často dochádza k nadobudnutiu rezistencie voči liečbe, ktorú človek každodenne podstupuje. V takých prípadoch sa používa vysokoaktívna antiretrovirálna liečba (HAART), ktorá kombinuje viaceré antiretrovirálne lieky, a tak znižuje šancu nadobudnutia rezistencie voči liečbe. Veľký počet infikovaných CD4 buniek v tele taktiež znamená, že po pozastavení liečby sa vírus v tele začne replikovať. V dnešnej dobe nedokážeme AIDS vyliečiť, iba kontrolovať a zmierniť jeho dôsledky. Začínajú sa črtat' možnosti v rámci experimentálnej liečby, a to najmä v oblasti kmeňových buniek a CRISPR/CAS9 technológie. Oba spôsoby sú pre liečbu HIV/AIDS veľmi relevantné, aj keď kontroverzné.

Pluripotentné kmeňové bunky sú nediferencované, preto sa môžu stať akýmikoľvek bunkami, aj T-lymfocytmi, ktorých majú HIV-pozitívni ľudia nedostatok. Ich potenciálne využitie spočíva v tvorbe nových buniek s genetickými modifikáciami a ich následnou transplantáciou do ľudskeho organizmu. Hütterov výskum sústredený na liečbu HIV/AIDS transplantáciou vybraných alebo transgénnych krvotvorných kmeňových buniek skúmal role receptorov chemokínov (CCR5) v HIV-1 ochorení. CCR5 sú receptory cytokínov, molekúl zodpovedných za prenos informácií

medzi bunkami. Ľudia s CCR5-delta32 deléciou, tí bez CCR5 receptoru, sú oveľa odolnejší voči HIV-1, pretože infekcia HIV závisí na prítomnosti CCR5 receptoru. CCR5-delta32 mutácia sa nachádza najčastejšie v kaukazskej populácii v severovýchodných častiach Európy. CCR5 je pre HIV dôležitý, keďže vďaka nemu dokážu antigény na kapside (proteínovom obale) HIV interagovať s hostiteľskou CD4 bunkou, respektíve s ko-receptormi na nej, z ktorých veľkú časť tvoria CCR5. Zabránenie interakcie HIV-1 s CCR5 pomocou menších molekúl (antagonistov) sa ukázalo byť efektívne pri potláčaní replikácie HIV-1 najmä u pacientov s multi-rezistenciou na liečbu. Pri prvej úspešnej transplantácii krvotvorných (hematopoetických) alogénnych kmeňových buniek homozygotných (alloHSCT) pre alelu CCR5-delta32, sa stal HIV-1 opäť detekovateľným (koncentrácia CD4 buniek v krvi klesla pod 200 na mm<sup>3</sup>) až po 27 mesiacoch bez ART.

Existujú dva spôsoby transplantácii kmeňových buniek. Vyššie opísaný, alogénny, vyžaduje darcu kompatibilného v ľudskom leukocytovej antigéne (HLA) ako aj v piatich lokusoch génu (10 alel). Odporúčaná zhoda pre darcov je 9/10 charakteristík HLA. Pri využití kmeňových buniek z pupočníkovej krvi stačí zhoda 4/6. Pre CCR5-negatívnu alloHSCT liečbu bude preto obmedzením dostupnosť darcov so zhodným HLA. Pupočníková krv sa pravdepodobne stane dôležitým zdrojom kmeňových buniek, pre úspešnosť transplantácii aj pri väčšom nesúlade medzi darcom a príjemcom.

Druhý typ transplantácie, autológny, využíva pacientove vlastné kmeňové bunky. Pre liečbu AIDS by nebol tento spôsob efektívny, keďže pacient s HIV ochorením vo väčšine prípadov nemá homozygotnosť CCR5-delta32, ktorá replikáciu HIV-1 potláča. Autológna transplantácia by bola možnosťou len pri genetickej úprave darcových kmeňových buniek pred transplantáciou povedzme vložení transgénov vyvolávajúcich rezistenciu na HIV. Transgénne bunky musia byť schopné cez selektívnu výhodu nahradiť tie bunky transplantátu, do ktorých sa prenos rezistentných transgénov neuskutočnil, a sú citlivé na vírusy. Najsľubnejšou metódou liečby AIDS hematopoetickými kmeňovými bunkami (HSC) s transgénmi sa zdá byť intervencia do životného cyklu vírusu inhibíciou jeho vstupu do bunky a integrácie do DNA. Veľkou výhodou

využitia hematopoetických buniek je ich schopnosť samoobnovy, množenia, a hlavne diferenciácie na imunitné bunky. Preto by mali byť HSC s upraveným genómom brániacim replikácií HIV schopné poskytovať a tvoriť imunitné bunky rovnako rezistentné na HIV infekciu do konca života pacienta. V štúdiu, ktorú predstavil B Fehse je použitý transgén zodpovedný za kódovanie peptidu C46, ktorý zabraňuje fúzii vírusovej a bunkovej membrány. AutoHSCT (autológna transplantácia hematopoetických kmeňových buniek) bude v tomto prípade využitá na vloženie novej genetickej informácie (C46) do kmeňových buniek.

Ďalšia štúdia zameraná na využitie patientskych indukovaných pluripotentných kmeňových buniek (iPSC) naznačila nové možnosti liečby HIV-1 formou autológnej transplantácie línií iPSC bez použitia transgénov. Vedci v rámci štúdie pozmenili mononukleárne bunky periférnej krvi (PBMC) pacienta pomocou vírusových vektorov, aby docielili neintegrujúcu sa generáciu iPSC s rezistenciou na HIV-1 infekcie po diferenciácii na lymfocyty. Výsledné iPSC línie, ani línie modifikované pomocou CRISPR/Cas9 technológie nevykazovali známky integrácie HIV-1, ani pozmenený karyotyp. Štúdia preukázala, možnosť vytvorenia línií terapeutických iPSC z buniek HIV-pozitívnych pacientov.

Na zistenie infekčnosti imunitných buniek odvodených z génu CCR5, teda modifikovaných iPSC z PBMC u HIV-infikovaných pacientov, slúžila štúdia, počas ktorej boli porovnávané vzorky PBMC šiestich pacientov. U všetkých pacientov pretrvávalo HIV ochorenie viac ako 20 rokov a podstupovali ART 1 až 12 rokov pred začatím štúdie. Počas štúdie boli získané PBMC derivované do iPSC a následne upravené endonukleázami (štiepiacimi enzýmami) s TALEN alebo CRISPR/Cas9. Spolu s technológiou PiggyBac tak vytvorili prirodzene vyskytujúce sa delécie 32 bp (bázových párov) v CCR5 géne. Následne boli tieto bunky diferencované na špecifické imunitné bunky, makrofágy a vystavené infekciám rôznych kmeňov HIV. Výsledky preukázali, že iPSC upravené v géne CCR5 v porovnaní s neupravenými iPSC boli po diferenciácii a napadnutí HIV-1 rezistentné na CCR5-tropné a čiastočne rezistentné na CCR5/CXCR4 duálno-tropné HIV-1 infekcie. HIV sa dokáže naviazať na viaceré ko-receptory na CD4 bunkách, ako napríklad CXCR4, nielen na CCR5, ktoré ale tvoria veľkú časť. Niektoré vírusy sa dokážu naviazať na oba typy (duálno-tropné), preto delécia 32 bp do istej miery

ovplyvňuje aj tento typ vírusu. Bolo preukázané, že rôzne génovo modifikované imunitné bunky z iPSC sú odolné voči špecifickým odlišným kmeňom HIV-1.

Využitie kmeňových buniek s CCR5-delta32 deléciami bude skúmané v nasledujúcich pokusoch aj na liečbu HIV-1-pozitívnych pacientov s malignitami s cieľom reprodukovať sľubné výsledky Hüttera vo väčšom rozsahu. Potvrdenie výsledkov Hüttera by malo obrovský prínos pre HIV-infikovaných pacientov s malígnymi ochoreniami, kvôli následne zvýšenej intenzite skríninov ich potencionálnych darcov CCR5-delta32. Výskum sa pravdepodobne zameria aj na druhý ko-receptor CXCR4 pre dosiahnutie rezistencie voči viacerým kmeňom HIV vrátane duálno-tropných typov. Ďalej sa bude pátrať aj po postupoch liečby pre HIV-pozitívnych pacientov bez vhodného darcu s CCR5-delta deléciou. Jedna z možností je rozvoj výskumu pre zlepšenie HIV-1 liečby interferujúcej so vstupným mechanizmom vírusu. Ďalšou alternatívou je vytvorenie databázy vhodných darcov s CXCR4-delta deléciou po výskume zameranom na CXCR4 ko-receptor. Momentálne si autoHSCT vyžadujú laboratórne podmienky s veľmi vysokou úrovňou bezpečnosti na prenos génov, čo transplantácie komplikuje. Budúcnosť génovej terapie je aj v alogénnych transplantátoch, ktorých zámerom bude zjednodušiť prístup k transplantáciám, ako aj využiť štep-versus-tumor efekt na boj proti rakovine, ktorý vzniká počas alloHSCT u pacientov s malignitami, kedy darcove bunky napádajú pozostalé rakovinové bunky. Využívanie transgénov rezistencie na HIV v transplantácii kmeňových buniek by uľahčilo život ľuďom, závislým na ART/HAART ako aj predĺžilo tým, ktorí sú voči formám ART rezistentní. Prínos by bol najmä pre pacientov s multi-rezistentnou infekciou, u ktorých HIV ochorenie postupuje rýchlejšie. Náklady na ART/HAART sú tiež vysoké, čím by terapie ako CCR5-negatívna transplantácia kmeňových buniek či transgénne prístupy prispeli k lepšiemu využitiu zdrojov zdravotníctva.

Emma Zoboková

Zdroje:

1. "About HIV/AIDS." *Centers for Disease Control and Prevention*, Centers for Disease Control and Prevention, 14 July 2020, [www.cdc.gov/hiv/basics/whatisshiv.html#:~:text=What%20is%20HIV%3F-,HIV%20\(human%20immunodeficiency%20virus\)%20is%20a%20virus%20that%20attacks%20the,they%20have%20it%20for%20life](http://www.cdc.gov/hiv/basics/whatisshiv.html#:~:text=What%20is%20HIV%3F-,HIV%20(human%20immunodeficiency%20virus)%20is%20a%20virus%20that%20attacks%20the,they%20have%20it%20for%20life). Accessed 28 August 2020.
2. "HAART – Vysokoaktívna Antiretrovirálna Terapia." *HIV & AIDS*, 18 Feb. 2018, [hivaid.sk/o-zivote-s-hiv/10-veci-ktore-by-si-mal-vediet-o-liecbе-hiv/haart-vysokoaktivna-antiretroviralna-terapia/](http://hivaid.sk/o-zivote-s-hiv/10-veci-ktore-by-si-mal-vediet-o-liecbе-hiv/haart-vysokoaktivna-antiretroviralna-terapia/). Accessed 28 August 2020.
3. "What Are HIV and AIDS?" *HIV.gov*, 5 June 2020, [www.hiv.gov/hiv-basics/overview/about-hiv-and-aids/what-are-hiv-and-aids](http://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/about-hiv-and-aids/what-are-hiv-and-aids). Accessed 28 August 2020.
4. "HIV and AIDS." *NHS.uk*, NHS, 3 April 2018, [www.nhs.uk/conditions/hiv-and-aids/](http://www.nhs.uk/conditions/hiv-and-aids/). Accessed 28 August 2020.
5. Hütter, Gero, Schneider, Thomas & Thiel, Eckhard. "Transplantation of Selected or Transgenic Blood Stem Cells – a Future Treatment for HIV/AIDS?" *Wiley Online Library*, John Wiley & Sons, Ltd, 2 June 2009, [onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1186/1758-2652-12-10](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1186/1758-2652-12-10). Accessed 29 August 2020.
6. Hütter, Gero. "Stem Cell Transplantation in Strategies for Curing HIV/AIDS." *AIDS Research and Therapy*, BioMed Central, 13 September 2016, [aidsrestherapy.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12981-016-0114-y](http://aidsrestherapy.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12981-016-0114-y). Accessed 29 August 2020.
7. Namdari, Haideh, et al. "CAR T Cells: Living HIV Drugs." *Wiley Online Library*, John Wiley & Sons, Ltd, 26 July 2020, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rmv.2139>. Accessed 29 August 2020.
8. Schmidt, Filip. "Pravdepodobnosť Podstúpenia Transplantácie Krvotvorných Kmeňových Buniek." *Lekari.sk*,

[www.lekari.sk/lekarsky-clanok/Pravdepodobnost-podstupenia-transplantacie-krvotvornych-kmenovych-buniek-1259.html](http://www.lekari.sk/lekarsky-clanok/Pravdepodobnost-podstupenia-transplantacie-krvotvornych-kmenovych-buniek-1259.html). Accessed 29 August 2020.

9. “Viral Tropism Definition.” *AIDSinfo*, U.S. Department of Health and Human Services, <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/glossary/1651/viral-tropism>. Accessed 30 August 2020.
10. Pernet, Olivier, et al. “Stem Cell-Based Therapies for HIV/AIDS.” *ScienceDirect*, Elsevier, 1 Aug. 2016, [www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169409X16301375](http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169409X16301375). Accessed 30 August 2020.
11. Ye, Lin, et al. “Generation of HIV-1-Infected Patients' Gene-Edited induced pluripotent stem cells using feeder-free culture conditions.” *Journals.lww*, Walters Kluwer Health Inc., 1 July 2020, [https://journals.lww.com/aidsonline/Abstract/2020/07010/Generation\\_of\\_HIV\\_1\\_infected\\_patients\\_gene\\_edited.4.aspx?context=LatestArticles](https://journals.lww.com/aidsonline/Abstract/2020/07010/Generation_of_HIV_1_infected_patients_gene_edited.4.aspx?context=LatestArticles). Accessed 30 August 2020.
12. Teque, Fernando, et al. “Genetically-Edited Induced Pluripotent Stem Cells Derived... : AIDS.” *Journals.lww*, Wolters Kluwer Health, 1 July 2020, [https://journals.lww.com/aidsonline/Abstract/2020/07010/Genetically\\_edited\\_induced\\_pluripotent\\_stem\\_cells.5.aspx](https://journals.lww.com/aidsonline/Abstract/2020/07010/Genetically_edited_induced_pluripotent_stem_cells.5.aspx). Accessed 30 August 2020.