

ŽIV-1 dažniausios mutacijos ir atsparumas antiretrovirusiniams vaistams

Tatjana Subočiuė-Stuliova¹,

Algirdas Griškevičius²,

Aleksandras Gorobecas²,

Ingrida Pumputienė³,

Mykolas Mauricas¹

¹ Valstybinis mokslinių tyrimų institutas
Inovatyvios medicinos centras,
Imunologijos skyrius,
Vilnius, Lietuva

² Nacionalinė visuomenės sveikatos
priežiūros laboratorija,
Vilnius, Lietuva

³ Vilniaus kolegija,
Sveikatos priežiūros fakultetas,
Vilnius, Lietuva

Tyrimo tikslas. Įvertinti ŽIV infekuotiems pacientams skirtingų ŽIV-1 mutacijų pasiskirstymą ir jų nulemtą atsparumą antiretrovirusiniams vaistams (ARV).

Metodai. Mutacijų tipai ir atsparumas vaistams buvo tiriami 149 ŽIV-1 infekuotiems pacientams, kurių kraujo plazmos mėginiai 2011–2013 m. ištirti Nacionalinėje visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijoje. ŽIV-1 genotipas ir atsparumas vaistams tirtas pacientams, kurių plazmos virusinis krūvis buvo ne mažesnis 2 000 kopijų/ml. Nustatytų ŽIV-1 mutacijų, sukeliančių atsparumą specifiniams ARV preparatams, duomenys buvo vertinami „HIV-1 Genotyping System Software v2.8“, tiesiogiai prisijungus prie „Stanford HIV Drug Resistance Database“ (<http://hivdb.stanford.edu>), kur buvo tikrinama sekų kokybė ir nustatomas viruso potipis.

Rezultatai. Su atsparumu ARV susiję mutacijos buvo aptiktos 84 pacientams, o iš jų atsparumas vaistams (tiek faktinis, tiek potencialus) – 37 pacientams. Dažniausia aptiktos mutacijos, lemiančios atsparumą proteazių inhibitoriams (PI), buvo L10V, L10IV, L10N, L10I, A71V. Šios mutacijos buvo nustatytos kartu su atsparumo nukleozidiniams atvirkštinės transkriptazės inhibitoriams (NATI) ir nenukleozidiniams atvirkštinės transkriptazės inhibitoriams (NNATI) mutacijomis. Dažniausios atsparumo NATI mutacijos buvo A62V ir V75L, o NNATI mutacijos – V179D, G190S, K103N ir E138A, kurios ir pavienės, ir kartu su kitomis mutacijomis lemia tam tikro lygio atsparumą vaistams.

Išvados. Lietuvoje gydomiems ŽIV infekuotiems asmenims būdinga šio viruso mutacijų įvairovė: su atsparumu susietos ir su nustatyto atsparumu vaistams (25 % tyrime dalyvavusių asmenų); su atsparumu susietos, bet be nustatyto atsparumo vaistams (32 % tyrime dalyvavusių asmenų).

Prieš paskiriant gydymą ŽIV infekuotiems asmenims svarbu nustatyti atsparumą ARV lemiančias mutacijas ir tęsti atsparumo ARV tyrimus jau gydomiems pacientams.

Raktažodžiai: antiretrovirusiniai vaistai, atsparumas vaistams, mutacija, ŽIV

ĮVADAS

Žmogaus imunodeficito virusui (ŽIV) gydyti vis dar nėra sukurta efektyvių ir vieningų metodų. Daugelis mokslininkų ši dešimtmetį didelį dėmesį skiria įvairių antiretrovirusinių vaistų (ARV) poveikio tyrimams ŽIV-1 infekuotiems pacientams. ŽIV-1 gydyti yra licencijuoti 23 ARV: septyni nukleozidiniai atvirkštinės transkriptazės inhibitoriai (NATI) (*Lamivudinas (3TC)*, *Abakaviras (ABC)*, *Zidovudinas (AZT)*, *Stavudinas (D4T)*, *Didanozinas (DDI)*, *Emtricitabinas (FTC)*, *Tenofoviras (TDF)*), keturi nenukleozidiniai atvirkštinės transkriptazės inhibitoriai (NNATI) (*Efavirenza (EFV)*, *Etravirinas (ETR)*, *Nevirapinas (NVP)*, *Rilpivirinas (RPV)*), devyni proteazės inhibitoriai (PI) (*Atazanoviras/r (ATV/r)*, *Darunaviras (DRV/r)*, *Fosamprenaviras/r (FPV/r)*, *Indinaviras/r (IDV/r)*, *Lopinaviras/r (LPV/r)*, *Nelfinaviras (NFV)*, *Sikvinaviras/r (SQV/r)*, *Tripinaviras/r (TPV/r)*, *Ritonaviras (RTV)*), vienas susiliejimo (angl. *Fusion*) inhibitorius (*Enfuvirtidas (ENF)*), vienas CCR5 koreceptoriaus inhibitorius (*Maravirokas (MVC)*) ir vienas integrazės inhibitorius (*Raltegraviras (RAL)*).

Kalbant apie CCR5 koreceptoriaus inhibitorių vertėtą paminėti vieną labai įdomią studiją, atliktą F. Libert ir kt. Jie tyrė CD4 koreceptoriaus CCR5 geno laukinio (CCR5) ir mutantinio (Δ ccr5) alelių pasiskirstymą. Pastebėta, kad asmenys-homozigtai pagal mutantinį alelį (Δ ccr5) rodo didesnę atsparumą ŽIV infekcijai. Ištyrus 18 europinių populiacijų pastebėtas mutantinio alelio (homozigtinė būklė) dažnio gradientas: didžiausias dažnis buvo šiaurės šalyse (Suomijos ir Mordovijos populiacijos – 16 %), o mažiausias – pietų šalyse (Sardinijos populiacija – 4 %). Atkreiptas dėmesys į 2 skirtingo dydžio mikrosatelitus – IRI3.1, D3S4579 ir IRI3.2, D3S4580 – išsidėsčiusius atitinkamai CCR5 geno 5' ir 3' galuose. Jų paplitimo dažnis irgi skiriasi. >95 % Δ ccr5 chromosomų turi IRI3.1 alelį, o 88 % – IRI3.2 (laukinio tipo CCR5 chromosomos atveju atitinkamai bus 2 ir 1,5 %). Tai rodo, kad pastarieji variantai negalėjo atsirasti dėl vienos mutacijos. Vadinas, buvo mutacijų serijos, prasidėjusios prieš kelis tūkstančius metų Šiaurės Rytų Europoje, rezultatas. Aukštas Δ ccr5 alelio paplitimas kaukazoidų rasėje negali būti paaiškintas paprastu atsitiktiniu genetiniu driftu. Tai rodo, kad pagrindinė atrankos kryptis susieta su alelio hetero- arba homozygotiškumu (31).

Daugelyje šalių, kuriose taikomas ARV gydymas, stebimas atsparumo vaistams paplitimas ir gebėjimas jį perduoti, o tai labai apsunkina ŽIV terapiją. Tiksliai nustatyti ŽIV atsparumą vaistams yra sudėtinga, bet svarbu. Atsparumas vaistams, įgytas terapijos metu, kur kas labiau paplitęs nei perduodamas atsparumas. Tyrimai rodo, kad gydyti pacientai, turintys bent vieną atsparumo vaistams mutaciją, sudaro 76–90 %. Ilgalaikį perduodamą atsparumą vaistams, nesant vaistų poveikio, lemia įvairių tipų mutacijos. Priešingai nei pacientams, kuriems ŽIV atsparumas vaistams įgyjamas terapijos metu, pacientams, užsikrėtusiems atspariomis vaistams viruso atmainomis, padidėja imlumas neatsparioms vaistams ŽIV atmainomis. Tokiu būdu perduodamas vaistams atsparus virusas (dėl atsparumo vaistams mutacijos praradimo) gali tapti vaistams imliu virusu. Skirtingai nei įgytos mutacijos, prarastosios gali grįžti gana greitai po atsparaus vaistams viruso transmisijos (1). Mutacijos, lemiančios atsparumą vaistams, gali būti 3 tipų: polimorfizmai, pradinės ir antrinės mutacijos. Vertinant ŽIV atsparumą vaistams, rekomenduojama atkreipti dėmesį į mutacijų ypatumus, genotipą ir realius fenotipų tyrimų rezultatus (2). Nuo 2003 m. atsparumo vaistams tyrimai paplito besivystančiose šalyse ir buvo pripažinti kaip papildoma priemonė pacientams, kuriems stebima plazmos viremija ir kurie gydomi ARV. ŽIV atsparumo vaistams tyrimas prieš pradėdant terapiją gali būti naudingas ir dar negydytiems pacientams (1). Tyrimais įrodyta, kad antiretrovirusinių vaistų terapija, pritaikyta atsižvelgiant į atsparumą nulemiančias mutacijas, duoda daug geresnius rezultatus.

Lietuvoje beveik nėra atliktų tyrimų, rodančių, kokią įtaką žmogaus imunodeficito viruso (ŽIV-1) populiacijai daro ARV, nors, kaip rodo statistika, ŽIV infekuotų asmenų problema Lietuvoje kiekvienais metais didėja. Remiantis Statistikos departamento duomenimis, ŽIV nešiotojų skaičius 2008 m. pabaigoje buvo 1 242, 2013 m. pabaigoje – 2 060, 2014 m. balandžio 1 d. Lietuvoje nustatyti 2 267 ŽIV užsikrėtę asmenys. Iš viso iki š. m. balandžio 1 d. Lietuvoje užregistruota 2 411 ŽIV užsikrėtusių asmenų, iš kurių 1 929 vyrai ir 482 moterys (32). Šiame darbe buvo tiriamos ŽIV mutacijos, lemiančios atsparumą ARV, ir vertinamas ryšys tarp jų ir atsparumo konkreitiems preparatams.

Darbo tikslas – įvertinti skirtingų ŽIV-1 potipių mutacijų pasiskirstymą pacientų grupėse ir atsparumą ARV vaistams.

TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Pacientai

Darbe buvo tiriami kraujo plazmos mėginiai asmenų, kurie 2011 m. spalio – 2013 m. gruodžio mėn. buvo tirti Nacionalinėje visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijoje dėl ŽIV infekcijos. Atlikta 213 tyrimų. ŽIV infekuotų asmenų plazmos mėginiais buvo atlikta rutininė virusinio krūvio analizė. ŽIV-1 RNR nerasta 5 pacientams, o 27 pacientams aptiktas ŽIV-1 RNR kiekis buvo <2 000 kopijų/ml. Mutacijos ir atsparumas vaistams buvo nustatinėjami likusiems (181) ŽIV-1 infekuotiems pacientams. Iš jų tyrime dalyvavo 149 pacientai, kurių rezultatai ir yra aptariami šiame straipsnyje.

Virusinio krūvio (ŽIV RNR) analizė

Tyrimo metu buvo nustatomas viruso dalelių (kopijų) kiekis kraujo plazmoje. Tyrimui imta 0,5 ml paciento kraujo plazmos ir nustatytas ŽIV-1 RNR kiekis, panaudojus automatinę sistemą „m2000“ (Abbott) pagal protokolą „0.5 ml HIV-1 RNA, v7.0“. Virusinė RNR buvo išskirta rinkiniu „Sample Preparation System RNA“ (Promega/Abbott). Laikui PGR (TL-PGR) nustatyti panaudotas rinkinių komplektas: „RealTime HIV-1 Amplification Reagent Kit“ (Abbott), „RealTime HIV-1 Calibration Reagent Kit“ (Abbott) ir „RealTime HIV-1 Control Kit“ (Abbott). Tolimesniam tyrimui atrinkti mėginiai, kurių virusinis krūvis buvo ne mažesnis 2 000 kopijų/ml.

Sekoskaitos plazmos mėginių analizė

Naudotas rinkinys „Viroseq[®] HIV-1 Genotyping System v 2.0“ (Abbott). Virusinė RNR buvo gryninama iš 0,5 ml plazmos. Plazmos mėginys centrifuguojamas 4 °C temperatūroje 1 val., esant 25 000 g. Nupylus plazmą, nusėdęs ištirpintos lizuojančiame buferyje inkubuojant kambario temperatūroje 15 min. Toliau vykdoma izopropanolinė / etanolinė RNR precipitacija. Nusėdose esanti RNR ištirpinta RNR buferyje. Priklausomai nuo virusinio krūvio (iki 15 000 kopijų/ml arba per 15 000 kopijų/ml) buvo panaudota atitinkamai 50 arba 100 µl RNR buferio. Kartu su pacientų mėginiais buvo tiriami ir kontroliniai mėginiai:

ŽIV neigiama plazma (neigiama kontrolė) ir plazma su kultivuotu ŽIV-1 B potipio defektiniu virusu „8E5“ (virusinis krūvis 50 000–100 000 kopijų/ml; teigiama kontrolė).

Vadovaujantis gamintojo instrukcijomis, pagamintas atvirkštinės transkripcijos (AT) reakcijos mišinys (kaip atvirkštinė transkriptazė naudojama MuLV revertazė). Į termociklerį „GeneAmp 2700“ (Applied Biosystems) patalpinti mėgintuvėliai su 10 µl išskirtos RNR ir paleidžiama AT programa (65 °C 30 s, 42 °C 5 min., pauzė, 42 °C 60 min., 99 °C 5 min., 4 °C >10 min.). Pauzės metu į mėgintuvėlius su RNR supilta po 10 µl AT mišinio ir procesas pratęstas. Prieš AT pabaigą, vadovaujantis gamintojo instrukcijomis, buvo paruoštas PGR mišinys (su AmpliTag Gold DNR polimerazės ir AmpErase UNG fermentų mišiniu). Į mėgintuvėlius su kopijine DNR sulašinta po 30 µl PGR mišinio. Mėgintuvėliai buvo įkelti į termociklerį „GeneAmp 9700“ (Applied Biosystems) bei aktyvuota PGR programa (50 °C 10 min., 93 °C 12 min., (93 °C 20 s, 64 °C 45 s, 66 °C 3 min.) 40 ciklų, 72 °C 10 min., 4 °C >10 min.). PGR metu gaunamas 1,8 kb ilgio pagausintas *pol* geno transkriptas. PGR produkto kiekiui nustatyti atlikta elektroforezė 1 % agaroziniame gelyje (Sigma-Aldrich) naudojant Tris-boratinį (TBE) buferį ir rinkinio sudėtyje esančius molekulinio svorio žymenis. Gelis dokumentuotas gelių dokumentavimo sistema GelDoc XR+ (Bio-Rad) ir programa „Image Lab v2.0.1“ (Bio-Rad). Gauta informacija vėliau naudota PGR produkto skiedimo santykiui apskaičiuoti prieš ciklinės sekoskaitos reakciją. Kad būtų suardomi reakcijoje nedalyvavę oligonukleotidai ir dNTP likučiai, prieš praskiedžiant amplifikatą pastarasis buvo apdorotas fermentų mišiniu EXO-Sap (DNR egz nukleazės ir šarminės fosfatazės mišinys): į mėgintuvėlius su PGR produktu sulašinta po 5 µl EXO-Sap, mėgintuvėliai sudėti į termociklerį „GeneAmp 9700“ bei aktyvuoti EXO-Sap programa (37 °C 15 min., 85 °C 15 min., 4 °C >10 min.). Išvalius PGR produktus pastarieji praskiesti dejonizuotu vandeniu apskaičiuotais santykiais (nuo 1:2 iki 1:10 arba pripilama vandens iki galutinio 60 µl tūrio). Ciklinei sekoskaitai atlikti naudoti darbui paruošti ciklinės sekoskaitos mišiniai su juose esančiais fluorescuojančiais dažais, žymėtais DNR grandinės ilginimo reakcijos stabdymo nukleotidais („BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit“

(Applied Biosystems)), kurių kiekvienas pažymėtas abėcėlės raide, priklausomai nuo jame esančio pradmens (A, B, C, D, F, G, H). Reakcija vykdoma PGR plokštelėje, į kurios šulinėlius sulašinama po 12 µl ciklinės sekoskaitos mišinių bei po 8 µl išvalyto PGR produkto. Plokštelė uždengiama specialiu silikoniniu dangteliu, patalpinama į termociklerį „GeneAmp 9700“ bei aktyvuojama ciklinės sekoskaitos programa (96 °C 10 s, 50 °C 5 s, 60 °C 4 min.); 25 ciklai, 4 °C >10 min.

Ciklinės sekoskaitos produktas nuo reakcijoje nedalyvavusių priemaišų valytas naudojant DNR precipitaciją su Na acetato ir etanolio mišiniu. Valymo metu gauta liofilizuota DNR ištirpinta 20 µl formamido (Applied Biosystems) ir atlikta terminė denatūracija 95 °C 2 min. Plokštelė patalpinta į genetinių analizatorių „ABI PRIZM 3100-Avant“ (Applied Biosystems). Sekai nuskaityti naudota programa „Data Collector Software v1.0“, o gautų sekų priminei peržiūrai ir sekoskaitos proceso metu gautiems prastos kokybės fragmentams pašalinti naudota programa „Data Extractor v3.7“. Kiekvienam mėginiui gautas septynių ~600 bp ilgio persidengiančių ir priešingomis kryptimis nuskaitytų sekų rinkinys, pateiktas atskiromis ab1 formato bylomis. Duomenys įkelti į programą „Viroseq® HIV-1 Genotyping System v 2.0“ (Abbott), kuri surenka bendrą sekos konsensusą. Programoje yra laukinio ŽIV-1 B potipio seka, kuri naudojama darbinių sekų korekcijai. Rezultatas eksportuojamas į tekstinę bylą FASTA formatu. Pastaroji įkelta į „Stanford HIV Drug Resistance Database“ (Stanford HIVdb) (3), kurioje taip pat patikrinta sekų kokybė bei nustatytas viruso potipis.

REZULTATAI

Atlikus 149 ŽIV-1 infekuotų pacientų viruso mutacijų ir atsparumo vaistams analizę, su atsparumu ARV susietos mutacijos buvo aptiktos 84 pacientams, o atsparumas vaistams (tiek faktinis, tiek potencialus) – 37 pacientams (apie 25 % tyrime dalyvavusių pacientų). Atsparumas vienam preparatui nustatytas 13 pacientų: daugiausia *Nelfinavirui* (NFV) – 9 atvejai, *Fosamprenavirui/r* (FPV/r) – 2, *Rilpivirinui* (RPV) – 2. Daugybinis atsparumas nustatytas 23 pacientams. Skirstant pagal atsparumo vaistams laipsnį, aukšto lygio atsparumas nustatytas 12 pacientų, vidutinio ir / arba žemo lygio – 33 ir žemo lygio – 20 pacientų.

Didžiausias mutacijų skaičius buvo susietas su atsparumu PI. Jos aptiktos 64 pacientams (nustatytas 72 mutacinis įvykis) (1 pav.).

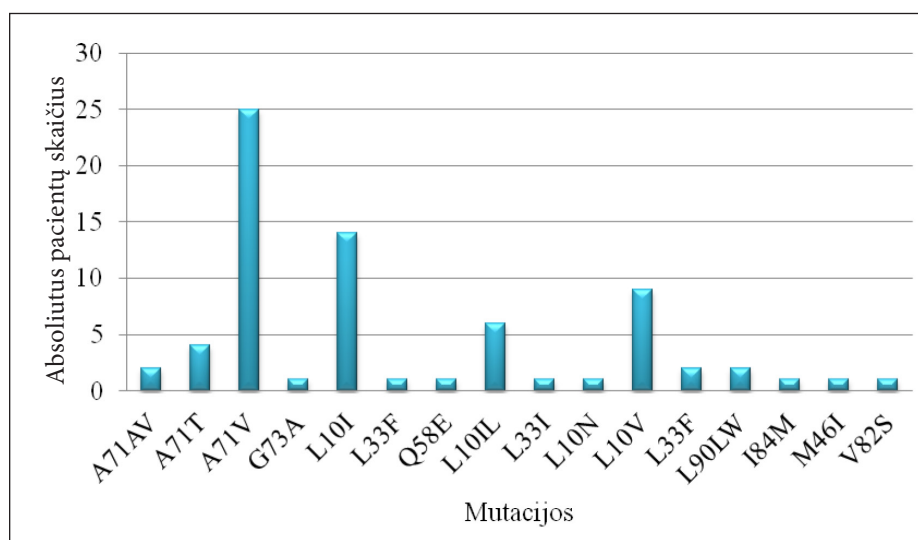
Daugeliui pacientų PI mutacijos buvo nustatytos su kitomis lydinčiomis mutacijomis, susietomis su atsparumu PI ir / arba NATI, NNATI (1 lentelė).

Mutacijos, sukeliančios atsparumą NATI, buvo aptiktos 18 ŽIV-1 infekuotų pacientų (nustatyta 30 mutacinių įvykių) (2 pav.).

Atsparumo NATI ir jas lydinčių mutacijų pasiskirstymas bei įtaka atsparumui vaistams pateikta 2 lentelėje.

Atsparumo NNATI mutacijos nustatytos 26 pacientams (nustatyti 39 mutaciniai įvykiai) (3 pav.).

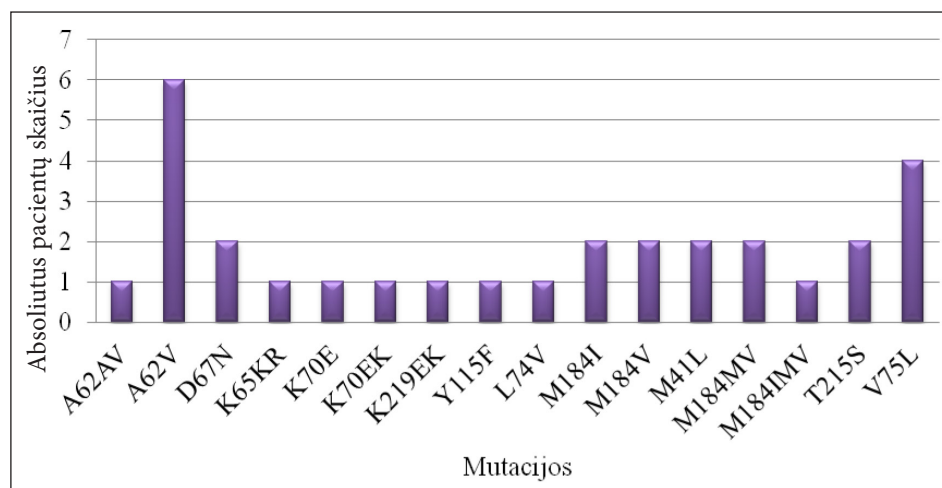
NNATI mutacijos ir atsparumas vaistams pateikta 3 lentelėje.



1 pav. PI mutacijos

1 lentelė. Mutacijos ir atsparumas proteazės inhibitoriams (PI)

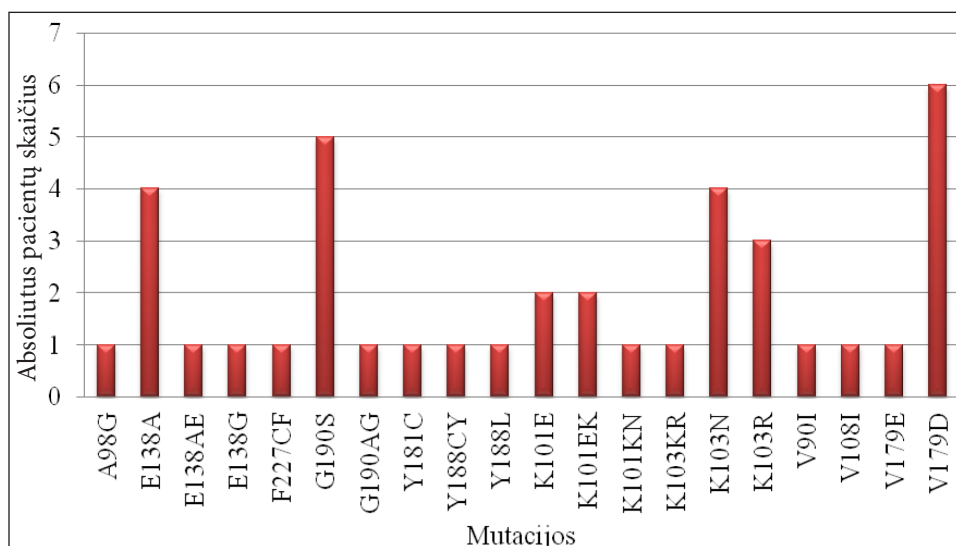
PI mutacijos	Pacientų skaičius	Lydinčios mutacijos	Atsparumas vaistams
M46I	1	PI – V82S, L10I, L33FL NATI – M184MV	ATV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV, SQV/r, TPV/r, 3TC, ABC, FTC
V82S	1	PI – M46I, L10I, L33FL NATI – M184MV	ATV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV, SQV/r, TPV/r.
A71AV	2	-	-
A71T	2	-	-
A71T	2	PI – L10IL NNATI – V179D	EFV, ETR, NVP, RPV
A71V	23	-	-
A71V	2	PI – L10V, L33I	NFV
L10IL	3	-	-
L10IL	3	PI – A71T, A62V NNATI – V179D, Y188CY	EFV, ETR, NVP, RPV, NFV
L10I	7	-	NFV
L10I	7	PI – Q58E, L33FL, M46I, V82S NATI – V75L, M184V, M184IMV, M184MV NNATI – G190S, A98G, K101EK, E138A	EFV, NVP, RPV, ETR, DLV, ABC, 3TC, FTC, DDI, ATV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV, SQV/r, TPV/r.
L10N	1	NATI – D67N, K70EK, M184I, K219EK NNATI – K101KN, Y181C, G190S	3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC, TDE, DLV, EFV, ETR, NVP
L10V	5	-	NFV
L10V	4	PI – A71V NATI – M41L, T215S NNATI – K103KR	NFV, ABC, AZT, D4T, DDI, TDF
L33F	2	-	FPV/r
L33FL	1	PI – M46I, V82S, L10I NATI – M184MV	ATV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV, SQV/r, TPV/r, 3TC, ABC, FTC
L33I	1	-	-
L90LW	2	-	-
Q58E	1	PI – L10I NNATI – A98G	TPV/r, DLV, NVP
G73A	1	PI – I84M	ATV/r, NFV/r, SQV/r
I84M	1	PI – G73A	ATV/r, NFV/r, SQV/r



2 pav. NATI mutacijos

2 lentelė. Mutacijos ir atsparumas nukleozidiniams atvirkštinės transkriptazės inhibitoriams (NATI)

NATI mutacijos	Pacientų skaičius	Lydinčios mutacijos	Atsparumas vaistams
A62AV	1	-	-
A62V	4	-	-
A62V	2	PI – L10IL, NNATI – Y188CY, F227CF	NFV, EFV, NVP, ETR, RPV
D67N	2	PI – L10N, NATI – K70EK, M184I, K219EK, K70E NNATI – K101KN, Y181C, G190S, K101E, Y188L	3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC, TDF, DLV, EFV, ETR, NVP
K65KR	1	NNATI – K103N, G190AG	3TC, ABC, D4T, DDI, FTC, TDF, EFV, ETR, NVP, RPV
K70E	1	NATI – D67N, M184I NNATI – K101E, Y188L	3TC, ABC, DDI, FTC, TDF, DLV, EFV, ETR, NVP, RPV
K70EK	1	PI – L10N, NATI – D67N, M184I, K219EK, K70E NNATI – K101KN, Y181C, G190S, K101E, Y188L	3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC, TDF, DLV, EFV, ETR, NVP
K219EK	1	PI – L10N, NATI – D67N, M184I, K70EK, K70E NNATI – K101KN, Y181C, G190S, K101E, Y188L	3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC, TDF, DLV, EFV, ETR, NVP
Y115F	1	NATI – L74V, M184V NNATI – K103N, V108I, E138G, V179E	NFV, 3TC, ABC, DDI, FTC, EFV, ETR, NVP, RPV
L74V	1	NATI – Y115F, M184V NNATI – K103N, V108I, E138G, V179E	NFV, 3TC, ABC, DDI, FTC, EFV, ETR, NVP, RPV
M184I	2	PI – L10N, NATI – K70EK, D67N, K219EK, K70E NNATI – K101KN, Y181C, G190S, K101E, Y188L	3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC, TDF, DLV, EFV, ETR, NVP
M184V	2	PI – L10I, NATI – Y115F, L74V, V75L, NNA- TI – K103N, V108I, E138G, V179E, G190S	ATV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV, 3TC, ABC, DDI, FTC, EFV, ETR, NVP, RPV
M184MV	2	PI – M46I, V82S, L10I, L33FL. NATI – V75L	ATV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV, SQV/r, NPV/r, 3TC, ABC, DDI, FTC
M184IMV	1	PI – L10I, NATI – V75L, NNATI – K101EK, G190S	3TC, ABC, FTC, EFV, ETR, NVP, RPV
M41L	2	PI – L10V, NATI – T215S	ABC, AZT, D4T, DDI, TDF
T215S	2	PI – L10V, NATI – M41L	ABC, AZT, D4T, DDI, TDF
V75L	4	PI – L10I NATI – M184IMV, M184V, M184MV NNATI – G190S, K101EK	3TC, ABC, FTC, EFV, ETR, NVP, RPV, DDI, ATV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV

**3 pav.** NNATI mutacijos

3 lentelė. Mutacijos ir atsparumas nenukleozidiniams atvirkštinės transkriptazės inhibitoriams (NNATI)

NNATI mutacijos	Pacientų skaičius	Lydinčios mutacijos	Atsparumas vaistams
A98G	1	PI - L10I, Q58E	TPV/r, DLV, NVP
E138A	2	-	RPV
E138A	2	PI - L10I NNATI - K101EK	EFV, ETR, NVP, RPV
E138AE	1	-	-
E138G	1	NATI - L74V, Y115F, M184V NNA- TI - K103N, V108I, V179E	NFV, 3TC, ABC, DDI, FTC, EFV, ETR, NVP, RPV
F227CF	1	NATI - A62V	EFV, ETR, NVP, RPV
G190S	5	PI - L10I, L10N NATI - V75L, D67N, K70EK, M184I, K219EK, M184IMV, M184V NNATI - K101KN, Y181C, K101EK, K101E	3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC, TDE, DLV, EFV, ETR, NVP, RPV, ATV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV
G190AG	1	PI - K65KR NNATI - K103N	3TC, ABC, D4T, DDI, FTC, TDE, EFV, ETR, NVP, RPV
Y188CY	1	PI - L10IL NATI - A62V	EFV, NVP
Y181C	1	PI - L10N NATI - D67N, K70EK, M184I, K219EK NNATI - K101KN, G180S	3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC, TDE, DLV, EFV, ETR, NVP
Y188L	1	NATI - D67N, K70E, M184I NNATI - K101E	3TC, ABC, DDI, FTC, TDE, DLV, EFV, ETR, NVP, RPV
K101E	2	NATI - D67N, K70E, M184I NNATI - Y188L, G190S	3TC, ABC, DDI, FTC, TDE, EFV, ETR, NVP, RPV
K101EK	2	PI - L10I NATI - M184IMV, V75L, M184V, M184MV NNATI - G190S, E138A	3TC, ABC, FTC, EFV, ETR, NVP, RPV
K101KN	1	PI - L10N NATI - D67N, K70EK, M184I, K219EK NNATI - Y181C, G190S	3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC, TDE, DLV, EFV, ETR, NVP
K103KR	1	PI - L10V	NFV
K103N	2	-	EFV, NVP
K103N	2	PI - K65KR NATI - L74V, Y115F, M184V NNATI - G190AG, V108I, E138G, V179E	3TC, ABC, D4T, DDI, FTC, TDE, EFV, ETR, NVP, RPV, NFV
K103R	3	NNATI - V179D	EFV, ETR, NVP, RPV
V90I	1	-	-
V108I	1	NATI - L74V, Y115F, M184V NNATI - V108I, E138G, V179E	3TC, ABC, D4T, DDI, FTC, TDE, EFV, ETR, NVP, RPV, NFV
V179E	1	NATI - L74V, Y115F, M184V NNATI - V108I, E138G, K103N	3TC, ABC, D4T, DDI, FTC, TDE, EFV, ETR, NVP, RPV, NFV
V179D	1	-	EFV, ETR, NVP, RPV
V179D	5	PI - A71T, L10IL NNATI - K103R	EFV, ETR, NVP, RPV

REZULTATŲ APTARIMAS

ŽIV infekuotų asmenų perduodamas atsparus vaistams virusas sumažina pradinio ir vėlesnio gydymo veiksmingumą. Europoje yra rekomenduojami anksčiau negydytų ligonių genotipinio atsparumo tyrimai ankstyvosiose ligos stadijose. Nustatyta, kad būtų tikslinga atlikti atsparumo ARV tyrimus, kai jis siekia apie 1–5 % ŽIV infekuotų asmenų (24). Tačiau problema ta, kad tiksliai nustatyti ŽIV atsparumą vaistams yra sudėtinga, nes reikia atlikti ir genotipinį, ir fenotipinį atsparumo vaistams testą.

Lietuvoje yra tik pavieniai ARV poveikio ŽIV infekuotiems asmenims tyrimai. S. Čaplinskas ir kt. (4) atliko 138 pacientų, kuriems 1990–2008 m. diagnozuotas ŽIV-1 tipas, tyrimą. Siekta išsiaiškinti ŽIV-1 tipo genotipus ir vaistams atsparių virusų perdavimą. Tyrimas parodė ypač žemą mutacijų, lemiančių atsparumą vaistams, paplitimą tarp 27 naujai infekuotų ir negydytų individų: tik vienam naujai infekuotam ŽIV-1 ir negydytam asmeniui buvo nustatyta vienintelė mutacija T215S, susijusi su NATI. Paprastai ši mutacija nesukelia fenotipinio atsparumo NATI, bet dažnai gali būti aptikta virusų kamienuose, ir turi įtakos atsparumą vaistams lemiančių mutacijų T215Y bei T215F atsiradimui. Perduodamų vaistams atsparių kamienų nebuvimą Lietuvoje galima paaiškinti tuo, kad ŽIV pas mus paplito vėlai, o pacientai yra iš karto gydomi moderniais veiksmingais antiretrovirusiniais vaistais (4).

Šiame darbe tirta 149 ŽIV infekuotų pacientų atsparumas vaistams. Atsparumas PI nustatytas 17 pacientų (9 %): 3 pacientams atsparumas PI pasireiškė su viruso A potipiu, 2 pacientams – su potipiu A/B, 2 – su potipiu A/CRF01_AE, 2 – su potipiu B, 2 – su potipiu CRF01_AE, 1 – su potipiu CRF01_AE/A, 1 – su potipiu CRF02_AG, 3 – su potipiu CRF02_AG/K ir 1 – su potipiu G. Atsparumą PI lemiančios mutacijos skirstomos į didžiąsias ir mažąsias. Tyrimo metu didžiosios mutacijos M46I ir V82S buvo aptiktos vienam pacientui su subtipu CRF01_AE/A. Aptiktoji mutacija M46I yra mutacijos M46I/L variantas, ji, kaip ir mutacija L33F, būdama nepolimorfinė daugeliui viruso potipių, yra paplitusi tarp A ir CRF01_AE potipių (paplitimas siekia 0,5–1 %) (5, 6, 10–12). Iš kristalografinių duomenų mutacijos M46I vaidmuo atsparumui lieka nežinomas, bet ši muta-

cija indukuoja natyvaus fermento konformacinius pokyčius, lemiančius jo stabilumą ir / arba aktyvumą (7). Tyrimą vertinant Stanfordo HIV duomenų bazėje nustatyta, kad pacientams su didžiųjų PI mutacijų M46I ir V82S kombinacija nustatomas atsparumas vaistams: didelis atsparumas vaistams 3TC, FTC; tarpinis atsparumas ATV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV; mažas atsparumas SQV/r ir potencialiai mažas atsparumas ABC. Didžiosios mutacijos buvo aptiktos kartu su PI mažosiomis mutacijomis L10I, L33FL ir NATI (M184MV) mutacija. V82S mutacija, kaip ir M46I, yra nepolimorfinė. Pavyzdžiui, preparatai ATV, IDV, LPV ir TPV veikia kaip atrankos veiksnys, išryškinantis ŽIV populiacijas su nepolimorfine V82S mutacija (6). PI didžiosios mutacijos (M46I ir V82S) buvo nustatytos 1 pacientui; mažosios mutacijos – 70 pacientų; A71AV mutacija – 2 pacientams su viruso B potipiu. Pacientams su mutacija A71AV atsparumas vaistams nenustatytas, nes pavienė ši mutacija atsparumo vaistams neindukuoja, tačiau ji aptinkama kombinacijoje su didžiąja PI mutacija I50L ir / arba mutacijomis, nesusietomis su atsparumu vaistams. LI50L ir A71AV mutacijų kombinacija lemia atsparumą įvairiems PI (8).

Mutacija A71T, kuri nustatyta 4 pacientams, vienam iš jų (kombinacija su V179D) lėmė atsparumą EFV, ETR, NVP, RPV. Kitam pacientui ši mutacija kartu su L10IL mutacija atsparumo vaistams nesukėlė, taip pat viena ši mutacija atsparumo vaistams nelėmė (2 pacientams atsparumas vaistams neaptiktas). Vienam iš 25 pacientų A71V mutacija kartu su L10V mutacija lėmė potencialiai mažą atsparumą NFV, kitam pacientui ši mutacija buvo aptikta kartu su L33I mutacija, bet kaip ir kitiems 23 pacientams, kur A71V buvo aptikta viena, atsparumas vaistams nenustatytas. Atlikti tyrimai rodo, kad esant vienai iš mutacijų (M36I ar A71V) nenustatomi jokie reikšmingi atsparumo vaistams pokyčiai. Šios mutacijos sietinos su padidėjusiu kryžminiu atsparumu vaistams kartu su mutacija D30N. Pačios savaime, kaip natūralaus polimorfizmo išdava, jos gali nukreipti viruso evoliuciją link tokių mutacijų, kurios padeda išvengti inhibitorių prisijungimo ir leidžiančia išsaugoti katalitinį fermento aktyvumą (9).

Proteazės aminorūgščių sekos 10 pozicijoje yra keli mutacijų variantai (L10V, L10IV, L10N, L10I), lemiantys atsparumą skirtingiems vaistams, jie

pasitaiko žymiai dažniau nei kitos PI mutacijos. Šios mutacijos lėmė atsparumą vaistams kartu su NATI ir NNATI mutacijomis. Mutacija L10IL buvo nustatyta 6 pacientams (3 pacientams ši mutacija aptikta be lydinčių mutacijų ir be atsparumo vaistams) ir dviems iš jų lėmė atsparumą vaistams: vienam – *NFV*, *ETR*, *NVP*, *RPV* (kartu su NNATI mutacija V179D), kitam – *NFV*, *EFV*, *NVP* (kartu su NATI mutacija A62V ir NNATI mutacija Y188CY). 14 pacientų nustatyta mutacija L10I, 7 pacientams ji aptikta be lydinčių mutacijų (1 iš jų sukelia mažą atsparumą *NFV*), kitiems 7 pacientams aptikta su lydinčiom mutacijom ir lėmė atsparumą vaistams: vienam iš jų – atsparumą *3TC*, *ABC*, *DDI*, *FTC*, *EFV*, *ETR*, *NVP*, *RPV*, *ATV/r*, *FPV/r*, *IDV/r*, *LPV/r*, *NFV*, ši mutacija aptikta kartu su NATI (V75L, M184V) ir NNATI (G190S) mutacijomis; antram L10I mutacija aptikta kartu su PI (Q58E) ir NNATI (A98G) mutacijomis ir lėmė atsparumą *TPV/r*, *DLV*, *NVP*; trečiam pacientui ši mutacija lėmė atsparumą *ATV/r*, *FPV/r*, *IDV/r*, *LPV/r*, *NFV*, nes ji nustatyta kartu su atsparumo NATI (V75L, M184IMV) ir NNATI (K101EK, G190S) mutacijomis; ketvirtam pacientui ši mutacija aptikta su PI (L33F) ir NATI (M184MV) mutacijomis ir lėmė atsparumą *ATV/r*, *FPV/r*, *IDV/r*, *LPV/r*, *NFV*, *SQV/r*, *NPV/r*, *3TC*, *ABC*, *FTC*; penktam pacientui ši mutacija lėmė atsparumą *RPV* ir buvo aptikta kartu su NNATI (E138A) mutacija; šeštam pacientui ji nustatyta kartu su NNATI (K101EK ir E138A) mutacijomis ir lėmė atsparumą *EFV*, *ETR*, *NVP*, *RVP*; o septintam – kartu su NATI (V75L, M184IMV) ir NNATI (G190S) mutacijomis, lėmė atsparumą daugeliui vaistų (*ATV/r*, *FPV/r*, *IDV/r*, *LPV/r*, *NFV*, *3TC*, *ABC*, *DDI*, *FTC*, *EFV*, *ETR*, *NVP*, *RPV*).

Mutacija L10V nustatyta 9 pacientams, iš kurių 5 pacientams L10V aptikta be lydinčių mutacijų, o vidutinis atsparumas vaistams nustatytas 1 pacientui – *NFV*. Kitiems 4 pacientams ši mutacija aptikta su lydinčiomis mutacijomis. Vienam pacientui mutacija L10V nustatyta kartu su NNATI (K103KR) ir lėmė mažą atsparumą *NFV*. Dviem pacientams ši mutacija aptikta kartu su NATI (M41L/T215S) mutacija. Šių mutacijų derinys lėmė vidutinį atsparumą *AZT*, *D4T* ir mažą atsparumą *ABC*, *DDI*, *TDF*. Ketvirtam pacientui ši mutacija lėmė vidutinį atsparumą *NFV* ir buvo aptikta kartu su atsparumo PI mutacija (A71V).

Nustatyta, kad mutacija L10I sukelia atsparumą *SQV/r* (10). L10I/V mutacija yra polimorfinė, t. y. kartu su kitomis PI mutacijomis gali sumažinti jautrumą PI arba padidinti viruso replikaciją, sumažindama jautrumą PI. Mutacija L10I/V yra pagalbinė polimorfinė mutacija, ji arba sumažina viruso jautrumą PI, arba paskatina virusų, turinčių atsparumo PI mutacijas, replikaciją (6). Mutacija L10N nustatyta vienam pacientui ir kartu su NATI (D67N, K70EK, M184I, K219EK) ir NNATI (K101KN, Y181C, G190S) mutacijomis lėmė atsparumą *3TC*, *ABC*, *AZT*, *D4T*, *DDI*, *FTC*, *TDF*, *DLV*, *EFV*, *ETR*, *NVP*; didelį atsparumą *3TC*, *FTC*, *DLV*, *EFV*, *ETR*, *NVP*; vidutinį atsparumą *ABC*, *DDI* ir mažą atsparumą *AZT*, *D4T* ir *TDF*. Mutacija L10V nustatyta 8 pacientams ir tik dviems iš jų buvo būdingas atsparumas *NFV*. Esant L10I ir L33FL mutacijų deriniui (nustatyta vienam pacientui), nulemiamas atsparumas vaistams *ATV/r*, *FPV/r*, *IDV/r*, *LPV/r*, *NFV*, *SQV/r*, *TPV/r*. Mutacija L33F nustatyta 2 pacientams, kuriems buvo būdingas ir potencialiai mažas atsparumas *FPV/r*. L33F mutacija paplitusi tarp negydytų asmenų (apie 1 %) su potipiais A, CRF02_AG ir CRF01_AE. (Mūsų tirti 2 pacientai buvo su CRF01_AE potipiu.) Mutacija L33F nepolimorfinė, aptinkama apie 1 % negydytų pacientų su A, CRF01_AE ir CRF02_AG potipiais. Šią mutaciją išryškina visi PI, išskyrus *ATV/r*, *IDV/r* ir *SQV/r*. Kartu su kitomis atsparumą PI indukuojančiomis mutacijomis, ji sietina su mažu jautrumu *DRV/r*, *FPV/r*, *LPV/r*, *TPV/r* ir galimai *NFV* (5, 6).

Pagal S. Y. Rhee ir kt. (11), dažniausia pasitaikančiuose aštuoniuose viruso potipiuose tarp reikšmingų mutacijų dominuoja nepolimorfinės (autorių tyrime tokių buvo 40 iš 46), o tarp nereikšmingų mutacijų nepolimorfinės mutacijos sudaro nedidelę dalį (autorių tyrime 14 iš 154). Mūsų tyrimo metu buvo aptiktos šios nepolimorfinės reikšmingos mutacijos: L10I, L33F ir Q58E. Mutacija L10I nustatyta 20 % visų potipių ŽIV virusui (A – 10 %, A/CRF01_AE – 1,4 %, B – 3 %, CRF01_AE/A – 3 %, CRF02_AG/K – 1,4 %, G – 1,4 %). Mutacija L33F aptikta potipyje CRF01_AE dviems pacientams (3 % tiriamųjų) ir vienam iš jų lėmė atsparumą *FPV/r*. Mutacija Q58E – potipyje G (1,4 % tiriamųjų) kartu su PI (L10I) ir NNATI (A98G) mutacijomis, kurios lėmė atsparumą *TPV/r*, *DLV*, *NVP*. Mutacijos L10I ir Q58E buvo nustatytos pacientui su

viruso potipiu G. Šios mutacijos sukelia atsparumą *TPV/r*. Q58E mutacija yra nepolimorfinė pagalbinė mutacija, susieta su žemo lygio atsparumu daugumai PI (6). Genetiniai skirtumai tarp ŽIV-1 potipių gali būti labai svarbūs klinikiniam ir priešvirusiniam gydymui bei atsparumo vaistams priežiūrai, nes dabar pasaulyje (ir Lietuvoje) vyrauja įvairūs ne B potipio virusai (12).

Pacientams su mažosiomis PI mutacijomis G73A ir I84M (nustatyta vienam pacientui) būdingas atsparumas *ATV/r*, *NFV*, *SQV/r*. Mutacija L90LW (potipiuose C ir CRF01_AE) nustatyta dviems pacientams, bet atsparumas vaistams neaptiktas. Esant L33I ir A71V mutacijoms, atsparumas vaistams taip pat nebuvo nustatytas, o pats mutacijų derinys aptiktas vienam pacientui su viruso potipiu B.

Trims pacientams, kuriems Stanfordo HIV db programinis algoritmas pateikė rezultatą dėl potencialaus žemo lygio atsparumo *NFV*, tiesiogiai su atsparumu susietos mutacijos nenustatytos. Tačiau visi 3 pacientai turėjo mutacijų (E35D, M36I, H69K, L89M) derinį kartu su kitomis (tiesiogiai su atsparumu nesusietomis) mutacijomis. Mutacija E35D – pabėgimo nuo imuninio atsako mutacija (13, 14), bet kai kuriuose šaltiniuose siejama su atsparumu PI, bet ne *NFV* (15). Mutacija M36I kai kuriuose literatūros šaltiniuose įvardyta kaip sukelianti atsparumą *NFV* (9). H69K mutacija, kartu su mutacijomis M36I ir L89M, dažniausia lemia atsparumą *TPV* (16). Mutaciją L89M kai kurie autoriai sieja su atsparumu *SQV*, *NFV*, *RTV*, *APV* ir *LPV* (17). Mutacijų M36I, H69K ir L89M derinys siejamas su padidėjusia rizika perduodamo atsparumo PI pacientams su viruso potipiu CRF02_AG (16).

Tyrimo metu 18 ŽIV-1 infekuotų pacientų buvo nustatyta 30 atsparumo NATI mutacijų. Mutacija A62AV – 1 pacientui, bet atsparumas vaistams nenustatytas. A62V mutacija – 6 pacientams, 4 iš jų mutacija A62V nustatyta be lydinčių mutacijų, o 2 pacientams pasireiškė atsparumas vaistams, nes ši mutacija buvo aptikta kartu su atsparumo PI ir NNATI mutacijomis: vienam pacientui kartu su L10IL ir Y188CY mutacijomis ir lėmė mažą atsparumą *NFV* ir *EFV* bei didelį atsparumą *NVP*; kitam pacientui – su F227CF mutacija ir lėmė vidutinį atsparumą *EFV*, *ETR*, *NVP*, *RPV*. A62V yra pagalbinė mutacija, kuri dažnai pasitaiko kartu su multinukleozidinio atsparumo mutacijomis

K65R arba Q151M. Viena ji nesugeba sumažinti jautrumo NATI. Mutacija A62V būdinga potipiui A, yra nepolimorfinė ir yra paplitusi buvusiose Sovietų Sąjungos šalyse (18). Tyrimo metu ši mutacija nustatyta A, A/B, A/CRF01_AE ir CRF01_AE/A potipiuose.

Mutacija D67N aptikta 2 pacientams, vienam iš jų – su viruso C potipiu buvo aptikta kartu su NATI (K70E, M184I) mutacijomis ir kartu su atsparumo NNATI mutacijų deriniu (K101E ir Y188L). Šios mutacijos lėmė didelį atsparumą *3TC*, *FTC*, *NVP*, *RPV*, vidutinį atsparumą *ABC*, *DDI* ir mažą atsparumą *TDF*, *ETR*. Kitam pacientui su viruso A potipiu ji buvo aptikta su PI (L10N), NATI (K70EK, M184I, K219EK) ir NNATI (K101KN, Y181C, G190S) mutacijomis. Šis mutacijų derinys lėmė didelį atsparumą *3TC*, *FTC*, *DLV*, *EFV*, *ETR*, *NVP*, vidutinį atsparumą *ABC*, *DDI* ir mažą atsparumą *AZT*, *D4T*, *TDF*. Mutacija D67N yra nepolimorfinė timidino analogų mutacija (TAM), susijusi su žemo lygio atsparumu *AZT* ir *D4T*. Atsiradusi su kitomis TAM, ji sumažina jautrumą *ABC*, *TDF* ir *DDI* (19). Tyrimo rezultatai rodo, kad virusai su unikaliomis TAM (įskaitant D67N ir / ar K219Q / E) dažniausia aptinkami asmenims su naujai diagnozuota ŽIV infekcija ir parodo didėjančią įvairovę virusų-revertantų populiacijoje. Šios mutacijos pagerina ŽIV prisitaikomumą, išlikimą negydytų asmenų populiacijoje ir padidina antrinio perdavimo galimybę (19).

K65KR mutacija buvo nustatyta vienam pacientui kartu su atsparumo NNATI mutacijomis K103N bei G190AG. Pastarosios lemia didelį atsparumą *NVP*, *EFV*; vidutinį atsparumą *3TC*, *ABC*, *D4T*, *DDI*, *FTC*, *TDF* ir mažą atsparumą *ETR*, *RPV*.

Mutacija K70E aptikta vienam pacientui kartu su NATI (D67N, M184I) mutacijomis ir su atsparumo NNATI mutacijų deriniu (K101E ir Y188L). Šios mutacijos lėmė atsparumą *3TC*, *FTC*, *NVP*, *RPV*, *ABC*, *DDI*, *TDF*, *ETR*. Vienam iš pacientų nustatyta mutacija K70EK, o kitam – mutacija K219EK kartu su atsparumo PI (L10N), NATI (D67N, M184I) ir NNATI (K101KN, Y181C, G190S) mutacijų deriniais. Šios mutacijos lėmė didelį atsparumą *3TC*, *FTC*, *DLV*, *EFV*, *ETR*, *NVP*; vidutinį atsparumą *ABC*, *DDI* ir mažą atsparumą *AZT*, *D4T*, *TDF*. Mutacijos K70E/G nėra dažnos ir atsiranda pacientams, kuriems buvo taikytas gydymas *ABC*, *TDF* ir *D4T*. Jos nuosaikiai

sumažina jautrumą tokiems NATI, kaip *TDF*, *ABC*, *DDI*, galimai *3TC* ir *FTC* bei padidina jautrumą *AZT* (20).

Mutacija M184I nustatyta 2 pacientams ir kaip mutacijos K70EK ir K219EK kartu su PI, NATI ir NNATI mutacijų deriniais lėmė atsparumą tiems patiems vaistams. Vienam pacientui M184V mutacija buvo nustatyta kartu su atsparumo PI (L10I), NATI (V75L) ir NNATI (G180S) mutacijomis ir lėmė didelį atsparumą *3TC*, *FTC*, *EFV*, *NVP*; mažą atsparumą *ABC*, *NFV* ir potencialiai mažą atsparumą *ATV/r*, *FPV/r*, *IDV/r*, *LPV/r*, *NFV*. Kitam pacientui ji aptikta kartu su NATI L74V ir Y115F bei su NNATI mutacijomis K103N, V108I, E138G, V179E. Šis mutacijų derinys lėmė didelį atsparumą *3TC*, *ABC*, *DDI*, *FTC*, *EFV*, *NVP*; mažą atsparumą *ETR*, *RPV* ir potencialiai mažą *NFV*.

Dviem pacientams buvo nustatyta M184MV mutacija: vienam pacientui – kartu su PI (M46I, V82S, L10I, L33F) mutacijomis ir lėmė atsparumą *3TC*, *ABC*, *FTC*, *ATV/r*, *FPV/r*, *IDV/r*, *LPV/r*, *NFV*, *SQV/r*, *NPV/r*, o kitam – kartu su NATI (V75L) mutacija ir lėmė didelį atsparumą *3TC*, *FTC*; mažą atsparumą *ABC* ir potencialiai mažą atsparumą *DDI*.

Mutacija M184I aptinkama prieš atsirandant mutacijai M184V dėl dažnesnio nukleotidų mainų varianto. Perėjimas iš varianto M184I į M184V įvyksta per kelias viruso replikacijos savaites. Galutinis variantas (M184V) aptinkamas daugumai pacientų kartu su atsako *3TC* ir *FTC* preparatams nebuvimu (20, 21).

L74V mutacija išryškėja dėl atrankinio *ABC* ir *DDI* poveikio. L74V kartu su M184V yra pačios įprasčiausios mutacijos, atsirandantios pacientams, gaunantiems vaistų kombinaciją *3TC* + *ABC*. Kartu jos sumažina jautrumą *ABC* daugiau nei 5 kartus, o *DDI* – daugiau nei 2 kartus. Mutacija L74V padidina jautrumą *AZT*, ši terapija pasirenkama tam, kad būtų išvengta šios mutacijos pasirodymo. Priešingai, norint išvengti L74V mutacijos, *TDF* terapija netaikytina, nors tos mutacijos buvimas didina jautrumą *in vitro*. *ABC* ir *TDF* veikia kaip atrankinis veiksnys, išryškinantis mutaciją Y115F. Pavienė ji 3 kartus sumažina jautrumą *ABC*, tačiau jautrumą *TDF* mažina nežymiai. Kartu su K65R arba Q151M, Y115F mutacijomis ji sinergetiškai mažina jautrumą *ABC* ir *TDF*. Mutacijų derinys Y115F/M184V yra susijęs su sumažėjusiu jautrumu *ABC* (22).

Mutacijų derinys M41L/T215S buvo nustatytas 2 pacientams. Jiems abiem buvo būdingas atsparumas tiems patiems vaistams – *ABC*, *AZT*, *D4T*, *DDI*, *TDF*. Mutacija M41L yra TAM ir visada atsiranda su mutacija T215Y. Šis mutacijų derinys suteikia aukšto lygio atsparumą *AZT* ir *D4T*, vidutinio lygio atsparumą *DDI*, *TDF* ir *ABC*. Vis dėlto virusai su trigubu mutacijų deriniu (M41L, T215Y, M184V) sukelia vidutinio lygio atsparumą *AZT*, *D4T* bei žemo lygio atsparumą *TDF*. Virusai su mutacija T215S yra revertantai iš varianto T215Y/F. Pacientai, užsikrėtę variantu T215Y/F, dažnai patiria tokio tipo reversiją. Kai kuriems pacientams, negydytiems ARV ir turintiems T215 revertantų, yra didesnė pirminės terapijos nesėkmės rizika (29).

V75L mutacija nustatyta 4 pacientams. Kaip ir daugelis kitų mutacijų, ji aptikta kartu su atsparumo PI (L10I), NATI (M184IMV, M184V, M184MV) ir NNATI (G190S, K101EK) mutacijomis, kurios lėmė atsparumą *3TC*, *ABC*, *FTC*, *EFV*, *ETR*, *NVP*, *RPV*, *DDI*, *ATV/r*, *FPV/r*, *IDV/r*, *LPV/r*, *NFV*. V75L mutacija yra nepolimorfinė ir pati viena sukelia atsparumą *DDI* ir *D4T* (23).

Tiriant ŽIV-1 infekuotus pacientus dėl atsparumo NNATI, jis buvo nustatytas 26 pacientams: 6 – turintiems potipį A; 2 – potipį A/B; 3 – potipį A/CRF01_AE; 9 – potipį B; 1 – potipį C; 1 – CRF01_AE/A; 1 – CRF02_AG/K; 2 – D/B; 1 – potipį G. Iš viso buvo aptikta 41 mutacija, susijusi su atsparumu NNATI. Mutacija A98G nustatyta vienam pacientui kartu su mažosiomis atsparumo PI mutacijomis (L10I, Q58E) ir lėmė potencialiai mažą atsparumą *DLV*, *NVP* ir *TPV/r*. Ji yra pagalbinė nepolimorfinė mutacija, atsirandanti pacientams, gydytiems *NVP* ir *EFV* (30). Mutacija E138A nustatyta 4 pacientams, 2 pacientams ji aptikta be lydinčių mutacijų ir lėmė mažą atsparumą *RPV*. Kitiems 2 pacientams ji aptikta su lydinčiom mutacijom: vienam pacientui nustatyta kartu su PI (L10I) ir lėmė mažą atsparumą *RPV*, kitam derinys K101EK/E138A ir lydinti PI mutacija (L10I) lėmė mažą atsparumą *EFV*, *ETR* ir vidutinį atsparumą *NVP*, *RVP*. E138A yra polimorfinė mutacija su paplitimo lygiu nuo 0,5 % tarp B potipio virusų iki 5 % tarp C potipio virusų (24). Tyrimo metu ši mutacija aptikta pacientams su potipiu B. Ji pasireiškia esant silpnam *ETR* ir *RVP* atrankiniam veikimui bei apie 2 kartus sumažina jautrumą *ETR* ir *RPV*. Mutacija E138A, prieš paskiriant gydymą, gali sumažinti priešvirusinį *RPV* veikimą.

Ji paprastai susijusi su sumažėjusiu virusiniu atsaku į gydymą *ETR* ir *PVP*, suteikia virusui geresnį išgyvenamumą esant *FTC* poveikiui ir sumažina jautrumą šiam vaistui 4,7 karto (25).

Mutacija E138AE, kuri atsparumo vaistams nelėmė, buvo nustatyta vienam pacientui.

Mutacija F227CF aptikta vienam pacientui ir lėmė atsparumą *EFV*, *ETR*, *NVP*, *RPV*.

Mutacija G190S buvo nustatyta 5 pacientams. Vienam iš jų aptikta kartu su PI (L10I) ir NATI (V75L) mutacijomis ir ši mutacijų derinys lėmė didelį atsparumą *EFV*, *NVP* ir potencialiai mažą *ETR*. Kitam pacientui ji buvo aptikta su PI (L10N), NATI (D67N, K70EK, M184I, K219EK) ir NNATI (K101KN, Y181C) mutacijomis. Mutacijos lėmė didelį atsparumą *3TC*, *FTC*, *DLV*, *EFV*, *ETR*, *NVP*; vidutinį atsparumą *ABC*, *DDI* ir mažą atsparumą *AZT*, *D4T*, *TDF*. Trečiam pacientui ši mutacija nustatyta kartu su atsparumo PI (L10I), NATI (V75L, M184IMV) ir NNATI (K101EK) mutacijomis, kurios lėmė didelį atsparumą *3TC*, *FTC*, *EFV*, *NVP*; mažą atsparumą *ETR*, *RPV* ir potencialiai mažą *ABC*. Ketvirtam pacientui ši mutacija lėmė didelį atsparumą *EFV*, *ETR*, *NVP*, *RPV* ir buvo nustatyta kartu su NNATI (K101E). Penktam pacientui G190S mutacija aptikta kartu su PI (L10I) ir NATI (V75L, M184V) mutacijomis ir lėmė didelį atsparumą *3TC*, *FTC*, *EFV*, *NVP*; mažą atsparumą *NFV*, *ABC* ir potencialiai mažą *ATV/r*, *FPV/r*, *IDV/r*, *LPV/r*, *DDI*, *ETR*, *RPV*. Ši mutacija yra nepolimorfinė ir pasireiškia dėl atrankinio *EFV* ir *NVP* poveikio. G190S sumažina jautrumą *NVP* ir *EFV* daugiau nei 50 kartų (26).

Mutacija Y188CY nustatyta vienam pacientui kartu su PI (L10IL) ir NATI (A62V) mutacijomis ir lėmė atsparumą *EFV* ir *NVP*.

Mutacija K101E nustatyta 2 pacientams: vienam iš jų NNATI mutacijų derinys K101E/G190S lėmė didelį atsparumą *EFV*, *ETR*, *NVP*, *RPV* vaistams, o kitam ji buvo nustatyta kartu su NATI (D67N, K70E, M184I) mutacijų ir atsparumo NNATI mutacijų (Y188L) deriniu. Šios mutacijos lėmė didelį atsparumą *3TC*, *FTC*, *NVP*, *RPV*; vidutinį atsparumą *ABC*, *DDI* ir mažą atsparumą *TDF*, *ETR*. K101E yra nepolimorfinė mutacija ir atsiranda pacientams, kurie gydomi bet kuriuo NNATI. Paprastai ši mutacija būna kartu su kitomis atsparumo NNATI mutacijomis. Ji sumažina jautrumą *NVP* nuo 3 iki 10 kartų, *EFV* – nuo 1 iki 5 kartų ir *ETR* bei *RPV* – apie 2 kartus (27).

Y188L yra nepolimorfinė mutacija, atsirandanti dėl *NVP* ir *EFV* poveikio. Ji lemia aukšto lygio atsparumą abiem šiems preparatams. Literatūros duomenimis, jautrumas *NVP* ir *EFV* sumažėja daugiau nei 50 kartų, o taip pat apie 5 kartus sumažina jautrumą *RPV* ir minimaliai sumažina jautrumą *ETR* (30).

K101EK mutacija nustatyta 2 pacientams. Vienam pacientui ši mutacija pasireiškė kartu su atsparumo PI (L10I), NATI (V75L, M184IMV) ir NNATI (G190S) mutacijomis, kurios lėmė didelį atsparumą *3TC*, *FTC*, *EFV*, *NVP*; mažą atsparumą *ETR*, *RPV* ir potencialiai mažą atsparumą *ABC*; kitam pacientui ji pasireiškė su atsparumo PI (L10I) ir NNATI (E138A) mutacijomis, kurios lėmė tarpinį atsparumą *NVP*, *RPV* ir mažą atsparumą *EFR*, *ETR*. Mutacijų derinys K101KN/Y181C/G190S kartu su PI (L10N), NATI (D67N, K70EK, M184I, K219EK) mutacijomis lėmė didelį atsparumą *3TC*, *FTC*, *DLV*, *EFV*, *ETR*, *NVP*; vidutinį atsparumą *ABC*, *DDI* ir mažą atsparumą *AZT*, *D4T*, *TDF*. Mutacija K101KN buvo aptikta vienam pacientui.

Atskira mutacija Y181C yra nepolimorfinė ir pasireiškia *in vitro* dėl *NVP*, *EFV*, *ETR* ir *RPV* poveikio. Ji sukelia jautrumo *NVP* sumažėjimą daugiau nei 50 kartų, apie 5 kartus sumažina jautrumą *ETR*, apie 3 kartus – jautrumą *RPV* ir apie 2 kartus – jautrumą *EFV*. Nors pati savaime Y181C mutacija sumažina jautrumą *EFV* tik 2 kartus, ji yra susijusi su sumažėjusiu atsaku į gydymo režimą su *EFV* (30).

Nepolimorfinė mutacija K103N nustatyta 3 pacientams. Vienam iš jų ji aptikta kartu su NATI (L74V, M184V ir Y115F) bei su NNATI mutacijomis (V108I, E138G, V179E). Jos lemia didelį atsparumą *3TC*, *ABC*, *DDI*, *FTC*, *EFV*, *NVP*; mažą atsparumą *ETR*, *RPV* ir potencialiai mažą – *NFV*. Antram pacientui K103N mutacija buvo aptikta viena ir lėmė didelį atsparumą *EFV*, *NVP*. Trečiam pacientui K103N kartu su NATI (K65KR) ir NNATI (G190AG) lėmė didelį atsparumą *EFV* ir *NVP*, vidutinį atsparumą *3TC*, *ABC*, *DDI*, *FTC*, *DDI* ir *TDF* ir galimai mažą *ETR*, *RPV*. K103N atsiranda pacientams, kurie vartojo *NVP* ir *EFV*. Ji mažina jautrumą šiems vaistams atitinkamai 50 ir 20 kartų (28). Elektroninėje knygoje „HIV Medicine 2007“ (<http://HIVMedicine.com>) teigiama, kad ši mutacija gali eliminuoti visą vaistų klasę iš taikomo gydymo.

Vienam pacientui buvo nustatytas G190AG mutacijos kartu su atsparumo NATI (K65KR) ir

NNATI (K103N) mutacijomis derinys. Tai lėmė didelį atsparumą *EFV* ir *NVP*, vidutinį atsparumą *3TC*, *ABC*, *DDI*, *FTC*, *DDI*, *TDF* ir galimai mažą *ETR*, *RPV*. Mutacija G190A yra nepolimorfinė ir atsiranda veikiant *NVP* ir *EFV*. Pati savaime ji sumažina jautrumą *NVP* daugiau nei 50 kartų, o jautrumą *EFV* – nuo 5 iki 10 kartų (30).

Keturių NNATI mutacijų derinys K103N/V108I/E138G/V179E nustatytas vienam pacientui kartu su NATI (L74V, Y115F, M184V) mutacijomis ir lėmė didelį atsparumą *3TC*, *ABC*, *DDI*, *FTC*, *EFV*, *NVP*, mažą atsparumą *ETR*, *RPV* ir potencialiai mažą *NFV*. Kitam pacientui mutacijų derinys K103N/G190AG kartu su NATI (K65KR) mutacija lėmė labai didelį atsparumą *EFV*, *NVP*, vidutinį atsparumą *3TC*, *ABC*, *DDI*, *FTC*, *DDI*, *TDF* ir galimai mažą *ETR*, *RPV*. K103N mutacija nustatyta dviem pacientams be lydinčių mutacijų ir lėmė didelį atsparumą *EFV*, *NVP*. V108I yra sąlyginai nepolimorfinė pagalbinė mutacija, atsirandanti veikiant *NVP* ir *EFV in vitro* bei pacientams, gaunantiems *NVP*. Ji mažina jautrumą *NVP* ir *EFV* maždaug 2 kartus, bet nemažina jautrumo *ETR* arba *RPV* (30).

Mutacijos V90I nustatyta vienam pacientui ir atsparumo vaistams nelėmė. Mutacija K103KR aptikta kartu su PI (L10V) mutacija ir lėmė mažą atsparumą *NFV*.

Mutacija V179D nustatyta 6 pacientams. 3 pacientai šią mutaciją turėjo kartu su K103R, visiems pacientams tai lėmė galimai mažą atsparumą *EFV*, *NVP* ir potencialiai mažą *ETR*, *RPV*. Vienam pacientui ši mutacija aptikta pavienė ir lėmė vidutinį atsparumą *NVP*; galimai mažą – *EFV* ir potencialiai mažą atsparumą *ETR*, *RPV*. Penktajam pacientui V179D mutacija aptikta kartu su PI (L10I) mutacija. Šių mutacijų derinys lėmė vidutinį atsparumą *NVP*; galimai mažą – *EFV* ir potencialiai mažą – *ETR*, *RPV*. Šeštasis pacientas, kuriam nustatyta V179D mutacija, turėjo potencialiai mažą atsparumą *ETR*, *RPV*, *RPV*, *EFV*, aptiktą kartu su atsparumo PI mutacija (A71T). K103R mutacija yra polimorfinė, pati savaime nesumažina jautrumo NNATI, tačiau kartu su V179D sumažina jautrumą *NVP* ir *EFV* apie 15 kartų (30).

Mūsų ir kitų mokslininkų atlikti tyrimai rodo, kad atsparumas antiretrovirusiniams vaistams yra svarbus veiksnys siekiant sėkmingai gydyti I tipo žmogaus imunodeficito viruso infekciją. Atsparumo tikrinimas ir jį lemiančių mutacijų nustatymas

galėtų pagerinti užsikrėtusiųjų gydymo rezultatus. Kadangi terapija ARV vis plačiau taikoma besivystančiose šalyse, atsparumo vaistams monitoringas ŽIV infekcijos atveju tampa vis svarbesnis (1). Tačiau dėl naujų įvairių klasių vaistų naudojimo, atsparumo analizės standartizavimo ir virusinio tropizmo tyrimų metodų tobulinimo atsparumo tyrimams reikia naujų rekomendacijų, ŽIV prevencijos programų, kurios padėtų sumažinti vaistams atsparių virusų plitimą (24).

IŠVADOS

1. Lietuvoje gydomiems ŽIV infekuotiems asmenims būdinga šio viruso mutacijų įvairovė: su atsparumu susietos ir su nustatytu atsparumu vaistams (25 % tyrime dalyvavusių asmenų); su atsparumu susietos, bet be nustatyto atsparumo vaistams (32 % tyrime dalyvavusių asmenų).

2. Dažniausia pasitaikiusios mutacijos, lemiančios atsparumą PI, buvo L10V, L10IV, L10N, L10I. Šios mutacijos buvo nustatytos kartu su atsparumo NATI ir NNATI mutacijomis (lėmė įvairaus lygio atsparumą vaistams). Dažna mutacija buvo A71V, bet atsparumo vaistams ji nelėmė. Tyrimo metu nustatytos PI didžiosios mutacijos M46I ir V82S buvo aptiktos vienam pacientui su subtipu CRF01_AE/A, kartu su PI mažosiomis ir NATI mutacijomis lėmė dideli atsparumą *3TC*, *FTC*.

Dažniausia pasitaikanti atsparumo NATI mutacija buvo A62V (6 atvejai), bet tik 2 pacientams kartu su atsparumo PI ir / arba NNATI mutacijomis ji lėmė atsparumą vaistams. V75L NATI mutacija nustatyta 4 pacientams. Kaip ir daugelis kitų mutacijų, ji aptikta kartu su atsparumo PI (L10I), NATI (M184IMV, M184V, M184MV) ir NNATI (G190S, K101EK) mutacijomis, kurios lėmė didelį atsparumą *3TC*, *FTC*, *EFV*, *NVP*.

Dažniausios atsparumo NNATI mutacijos buvo V179D (6 atvejai), G190S (5 atvejai) K103N (4 atvejai) ir E138A (4 atvejai), kurios ir pavienės, ir kartu su kitomis mutacijomis lėmė tam tikro lygio atsparumą vaistams.

3. Prieš paskiriant gydymą ŽIV infekuotiems asmenims, svarbu nustatyti atsparumą ARV lemiančias mutacijas ir tęsti atsparumo ARV tyrimus jau gydomiems pacientams.

Literatūra

1. Hirsch MS, Gunthard HF, Schapiro JM, Vezi- net FB, Clotet B, Hammer SM, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 Recommendations of an International AIDS Society–USA Panel. *Clin Infect Dis.* 2008; 47(2): 266–85.
2. Jiamsakul A, Rami Kantor R, Li P, Sirivichayakul S, Sirisanthana T, Kantipong P, et al. Comparison of predicted susceptibility between genotype and virtual phenotype HIV drug resistance interpretation systems among treatment-naive HIV-infected patients in Asia: TASER-M cohort analysis. *BMC Res Notes.* 2012; 5: 582.
3. Stanford HIV Drug Resistance Database (Stanford HIVdb) [Internet]. Available from: <http://hivdb.stanford.edu>
4. Caplinskas S, Loukachov VV, Gasich EL, Gilyazova AV, Caplinskiene I, Lukashov VV. Distinct HIV type 1 strains in different risk groups and the absence of new infections by drug-resistant strains in Lithuania. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013; 29(4): 232–7.
5. Shafer RW, Schapiro JM. HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Rew.* 2008; 10(2): 67–84.
6. <http://hivdb.stanford.edu/DR/PIResiNote.html>
7. Chen Z, Li Y, Schock HB, Hall D, Chen E, Kuo LC. Three-dimensional structure of a mutant HIV-1 protease displaying cross-resistance to all protease inhibitors in clinical trials. *J Biol Chem.* 1995; 270(37): 21433–6.
8. Colonna R, Rose R, McLaren C, Thiry A, Parkin N, Friberg J. Identification of I50L as the signature atazanavir (ATV)-resistance mutation in treatment-naive HIV-1-infected patients receiving ATV-containing regimens. *J Infect Dis.* 2004; 189(10): 1802–10.
9. Clemente JC, Hemrajani R, Blum LE, Goode- now MM, Dunn BM. Secondary mutations M36I and A71V in the human immunodeficiency virus type 1 protease can provide an advantage for the emergence of the primary mutation D30N. *Biochemistry.* 2003; 42(51): 15029–35.
10. Flor-Parra F, Pérez-Pulido AJ, Pachón J, Pérez-Romero P. The HIV type 1 protease L10I minor mutation decreases replication capacity and confers resistance to protease inhibitors. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011; 27(1): 65–70.
11. Rhee SY, Taylor J, Fessel WJ, Kaufman D, Town- er W, Troia P, et al. HIV-1 protease mutations and protease inhibitor cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(10): 4253–61.
12. Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, et al. Impact of HIV-1 sub- type and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med.* 2005; 2(4): 112.
13. Meiselbach H, Horn AH, Harrer T, Sticht H. In- sights into amprenavir resistance in E35D HIV-1 protease mutation from molecular dynamics and binding free-energy calculations. *J Mol Model.* 2007; 13(2): 297–304.
14. Kandathil AJ, Kannangai R, Abraham OC, Ru- pali P, Pulimood SA, Verghese VP, et al. The fre- quency of HIV-I drug resistance mutations among treatment-naive individuals at a tertiary care cen- tre in south India. *Int J STD & AIDS.* 2009; 20: 522–6.
15. Kandathil AJ, Kannangai R, Abraham OC, Puli- mood SA, Sridharan G. Genotypic resistance pro- file of HIV-1 protease gene: a preliminary report from vellore India. *Indian J Med Microbiol.* 2008; 26(2): 151–4.
16. Miri L, Ouladlalsen A, Kettani A, Bensghir R, Marhoum Elfilali K, Wakrim L. Characteriza- tion of protease resistance-associated mutations in HIV type 1 drug-naive patients following the increasing prevalence of the CRF02_AG strain in Morocco. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2012; 28(6): 571–7.
17. Calazans A, Brindeiro R, Brindeiro P, Verli H, Ar- ruda MB. Low accumulation of L90M in protease from subtype F HIV-1 with resistance to protease inhibitors is caused by the L89M polymorphism. *J Infect Dis.* 2005; 191(11): 1961–70.
18. Svarovskaia ES, Feng JY, Margot NA, Myrick F, Goodman D, Ly JK, et al. The A62V and S68G mutations in HIV-1 reverse transcriptase partially restore the replication defect associated with the K65R mutation. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008; 48(4): 428–36.
19. García-Lerma JG, MacInnes H, Bennett D, Wein- stock H, Heneine W. Transmitted human immu- nodeficiency virus type 1 carrying the D67N or K219Q/E mutation evolves rapidly to zidovudine resistance in vitro and shows a high replicative fit- ness in the presence of zidovudine. *J Virol.* 2004; 78(14): 7545–52.

20. Kulkarni R, Babaoglu K, Lansdon EB, Rimsky L, Van Eygen V, Picchio G, et al. The HIV-1 reverse transcriptase M184I mutation enhances the E138K-associated resistance to rilpivirine and decreases viral fitness. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012; 59(1): 47–54.
21. Diallo K, Götte M, Wainberg MA. Molecular impact of the M184V mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(11): 3377.
22. Ehteshami M, Scarth BJ, Tchesnokov EP, Dash C, Le Grice SF, Hallenberger S, et al. Mutations M184V and Y115F in HIV-1 reverse transcriptase discriminate against “nucleotide-competing reverse transcriptase inhibitors”. *J Biol Chem*. 2008; 283(44): 29904–11.
23. Kleim JP, Rösner M, Winkler I, Paessens A, Kirsch R, Hsiou Y, et al. Selective pressure of a quinoxaline nonnucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) on HIV-1 replication results in the emergence of nucleoside RT-inhibitor-specific (RT Leu-74-->Val or Ile and Val-75-->Leu or Ile) HIV-1 mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(1): 34–8.
24. Lunar MM, Lepej SZ, Abecasis AB, Tomazic J, Vidmar L, Karner P, et al. Short communication prevalence of HIV type 1 transmitted drug resistance in Slovenia: 2005–2010. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013; 29(2): 343–9.
25. Sluis-Cremer N, Huber KD, Brumme CJ, Harrigan PR. Competitive fitness assays indicate that the E138A substitution in HIV-1 reverse transcriptase decreases *in vitro* susceptibility to emtricitabine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(4): 2430–3.
26. Huang W, Gamarnik A, Limoli K, Petropoulos CJ, Whitcomb JM. Amino acid substitutions at position 190 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase increase susceptibility to delavirdine and impair virus replication. *J Virol*. 2003; 77(2): 1512–23.
27. Wang J, Li D, Bambara RA, Dykes C. Reverse transcriptase backbone can alter the polymerization and RNase activities of non-nucleoside reverse transcriptase mutants K101E+G190S. *J Gen Virol*. 2013; 94(10): 2297–308.
28. Flys TS, Chen S, Jones DC, Hoover DR, Church JD, Fiscus SA, et al. Quantitative analysis of HIV-1 variants with the K103N resistance mutation after single dose nevirapine in women with HIV-1 subtypes A, C and D. *J AIDS*. 2006; 42(5): 610–3.
29. <http://hivdb.stanford.edu/DR/NRTIResiNote.html>
30. <http://hivdb.stanford.edu/DR/NNRTIResiNote.html>
31. Libert F, Cochaux P, Beckman G, Samson M, Ak-senova M, Cao A, et al. The deltaccr5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Hum Mol Genet*. 1998 Mar; 7(3): 399–406.
32. <http://www.ulac.lt/naujienos/pranesimai-spaudai/siemet-lietuvoje-nustatyti-33-nauji-ziv-infekcijos-atvejai>

Tatjana Subočiuė-Stuliova, Algirdas Griškevičius, Aleksandras Gorobecas, Ingrida Pumputienė, Mykolas Mauricas

FREQUENT HIV-1 MUTATIONS AND RESISTANCE TO ANTIRETROVIRAL DRUGS

Summary

Background

Research goal. Evaluate how different HIV-1 mutations distribute among HIV-infected patients and how these mutations determine resistance to ARVs.

Materials and methods. Types of mutations and drug resistance were studied for 149 HIV-1 infected patients, whose blood plasma samples were investigated in the National Public Health Surveillance Laboratory for the 2011–2013 period. HIV-1 genotype and drug resistance have been studied in patients with a plasma viral load of at least 2,000 copies/ml. Data of HIV-1 mutations that cause resistance to specific ARV preparations were evaluated by HIV-1 Genotyping System Software v2.8, also directly connected to the Stanford HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu>), which checks the sequences quality and predict the virus subtype.

Results. Mutations associated with ARV resistance were found for 84 patients, and drug resistance (both actual and potential) from them was found for 37 patients. The most common mutation causing the resistance to protease inhibitors (PI) was L10V, L10IV, L10N, L10I, and A71V. These mutations were detected in combination with mutations to nucleoside and

non-nucleoside reverse transcription inhibitors (NRTI and NNRTI). The most common NRTI resistance mutations were A62V and V75L, but the most common NNRTI resistance mutations were V179D, G190, K103N, and E138A. The most detected NRTI resistance mutations were A62V and V75L, and the most common NNRTI resistance mutations detected were V179D, G190, K103N, and E138A. All of them, individual and with other mutations, cause a certain level of resistance to the ARVs.

Conclusions. HIV-infected individuals, who are treated in Lithuania, are characterized by a variety of

viral mutations: coupled with resistance and causing the resistance to drugs (25% of the number of persons involved in the study) and associated with resistance, but without the prescribed drug resistance (32% of the number of persons involved in the study).

Before appointment of the treatment of HIV-infected individuals, it is important to determine ARV resistance mutations, and continue ARV resistance testing for patients already receiving treatment by ARV.

Key words: antiretroviral drugs, resistance to drugs, mutation, HIV