

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS  
MIKROBIOLOGIJOS IR BIOTECHNOLOGIJOS KATEDRA

Monika Maconkaitė

**Žmogaus imunodeficito viruso  
atsparumas antiretrovirusiniams vaistams**

Magistro darbas

Darbo vadovas: dr. Algirdas Griškevičius

VILNIUS  
2009

## Turinys

Įvadas .....	4
1. Literatūros apžvalga .....	6
1.1 ŽIV infekcijos epidemijos istorinė apžvalga .....	6
1.2 Žmogaus imunodeficito virusas.....	7
1.3 ŽIV atsparumas .....	7
1.4 Morfologija .....	8
1.5 Genetika .....	10
1.6 ŽIV epidemiologija .....	12
1.7 ŽIV infekcijos ir AIDS epidemiologinė situacija Lietuvoje .....	13
1.8 ŽIV klasifikacija .....	14
1.9 ŽIV plitimo būdai .....	15
1.10 ŽIV inkubacinis laikotarpis .....	18
1.11 ŽIV infekcijos diagnostika .....	19
1.12 ŽIV replikacijos ciklas .....	19
1.13 ŽIV infekcijos gydymas .....	21
1.14 ARV preparatai ir jų veikimo būdai .....	21
1.15 Atsparumo ARV preparatams mechanizmai .....	23
2. Eksperimentinė dalis .....	26
2.1 Tyrimo medžiaga .....	26
2.2 Priemonės .....	26
2.3 Tyrimo metodai .....	26
3. Tyrimų rezultatai .....	27
Santrauka .....	35
Summary .....	26
Lliteratūra .....	37

## Santrumpų sąrašas

- ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas.
- BIV – beždžionių imunodeficito virusas (simian immunodeficiency virus (SIV))
- ARV – antiretrovirusiniai vaistai.
- ART - antiretrovirusinė terapija.
- HAART – padidinto intensyvumo ART.
- AIDS – įgytas imuniteto nepakankamumo sindromas (AIDS, angl. Acquired Immune Deficiency Syndrome)
- IFA – imunofermentinė analizė (angl. *ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)*, *EIA (Enzyme Immuno Assay)*).
- AT – atvirkštinė transkriptazė.
- P – proteazė.
- SU – viriono išorėje esantis baltymas (angl. surface glycoprotein).
- TM – transmembraninis.
- LTR – ilgos pasikartojančios galinės sekos (long terminal repeat ).
- TAR – transaktyvacijos atsako elementai (transactivation-response elements).
- PRE – *rev* atsako elementas (*rev* response elements).
- ATI – Atvirkštinės transkriptazės inhibitoriai (angl. RTIs – reverse transcriptase inhibitors).
- NATI – nukleozidiniai ir nukleotidiniai viruso atvirkštinės transkriptazės inhibitoriai (angl. NRTIs – nucleoside/ nucleotide reverse transcriptase inhibitors)
- NNATI – nenukleozidiniai viruso atvirkštinės transkriptazės inhibitoriai (angl. NNRTIs – non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor)
- PI – proteazių inhibitoriai (angl. PIs – Protease inhibitors)
- II – integrazių inhibitoriai (angl. IIs – integrase inhibitors)
- DNR – Deoksiribonukleorūgštis.
- RNR – Ribonukleino rūgštis
- UNAIDS - Jungtinių Tautų ŽIV /AIDS Programa (the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS).

## Ivadas

Nuo 9-ojo dešimtmečio pabaigos kai buvo pradėta taikyti zinovudino monoterapija, ŽIV pacientų gydymo srityje įvyko didžiulė pažanga. Šiuo metu yra daugiau nei 20 ŽIV infekcijai gydyti patvirtintų antiretrovirusinių vaistų. Vaistai skirstomi į penkias klases pagal veikimo mechanizmą:

- nukleozidiniai arba nukleotidiniai atvirkštinės transkriptazės inhibitoriai (NATI);
- nenukleozidiniai atvirkštinės transkriptazės inhibitoriai (NNATI);
- proteazių inhibitoriai (PI);
- susijungimo (fuzijos) inhibitoriai (FI);
- integrazių inhibitoriai (II) .

Netgi gydant šiuolaikiniu būdu, kai taikoma kombinuota antiretrovirusinė terapija (ART), viruso organizme visiškai sunaikinti neįmanoma. Taip yra, nes ankstyvosiose ūminės ŽIV infekcijos stadijose dalis CD4+ ląstelių yra latentiskai infekuojamos ir dėl ilgo gyvavimo pusperiodžio išlieka ilgai, net ir esant ilgalaikiai plazmos viremijos supresijai.

Gydant kombinuota antiretrovirusine terapija (ART), kiekvieną gydymo schemą sudaro mažiausiai trys vaistai.

Pagrindiniai antiretrovirusinės terapijos tikslai yra šie:

- maksimaliai ir ilgą laiką slopinti viruso replikaciją (viruso krūvį); slopinant viruso replikaciją sumažėja laisvų virionų kiekis ir mutacijų skaičius (atsparumo prevencija);
- sugrąžinti ir išlaikyti imuninės sistemos funkciją; bloga ląstelinio imuniteto būklė lemia ŽIV užsikrėtusių pacientų sergamumą oportunistinėmis infekcijomis ir navikus bei mirštamumą nuo jų;
- pagerinti gyvenimo kokybę; svarbu laiku pradėti antiretrovirusinę terapiją: infekcijai progresuojant, būtina slopinti viruso replikaciją, tačiau nuolatinis vaistų vartojimas ir jų nepageidaujami poveikiai blogina gyvenimo kokybę;
- klinikinis poveikis; laiku pradėjus ART, sumažinti su ŽIV susijusį sergamumą ir mirštamumą.

Atsparumas ir jo poveikis – ypač svarbūs veiksniai, į kuriuos būtina atsižvelgti planuojant ART strategiją. Jam būdingi tie patys dėsningumai, kaip ir kitiems mikroorganizmams,

gydomiems antimikrobiniais vaistais: nepakankamas mikroorganizmų slopinimas lemia mutacijas, kurios šiems padeda išlikti dalinio slopinimo sąlygomis. Dėl ŽIV infekcijai būdingo ypač dinamiško kintamumo atsparumas vystosi greičiau negu kitų gydomų infekcijų atvejais. Veikiant evoliucijos principams, dalinio slopinimo sąlygomis vyksta atsparių virusų selekcija, todėl vaistui atsparios padermės greitai tampa dominuojančios. Proceso pasekmės paliečia ir gydomą asmenį, ir visuomenę. Žala asmeniui pasireiškia tuo, kad, tęsiant pradėtą gydymą, viruso krūvis didėja, ir liga progresuoja. Žalą visuomenei apibūdina tai, kad dauginio atsparumo viruso padermės perduodamos kitiems, todėl dar negydytiems pacientams gydymo sėkmės tikimybė sumažėja. Atsparumo prevencijos tikslu viremijos slopinimas turi būti maksimaliai stiprus ir ilgalaikis. Tai galima pasiekti tik skiriant ART derinį, kuris yra efektyvus ir nesudėtingas vartoti [9, 18].

Dėl šių priežasčių sėkmingas ŽIV pirminio atsparumo antiretrovirusiniams vaistams nustatymas naujai infekuotiems pacientams turi didelės įtakos tolimesniam sėkmingam jų gydymui, bei bendram atsparių štamų paplitimo įvertinimui Lietuvoje.

**Tikslai:**

1. Nustatyti naujai infekuotų asmenų pirminį atsparumą antiretrovirusiniams (ARV) vaistams.
2. Nustatyti ŽIV subtipų paplitimą Lietuvoje.
3. Įvertinti atsparumo vaistams mutacijų pasiskirstymą tarp skirtingų pacientų grupių ir ŽIV subtipų.

## **1. Literatūros apžvalga**

### **1.1 ŽIV infekcijos epidemijos istorinė apžvalga**

1981 metų gegužės mėnesį pasirodo pirmieji pranešimai (Kalifornijoje) apie homoseksualius virus, sergančius iki tol retomis ligomis, tokiomis kaip plaučių uždegimas (sukeltas *Pneumocystis carinii*). Tokio tipo plaučių uždegimas sutinkamas retai ir pavojingas tik žmonėms su nusilpusia imunine sistema. Šiais atvejais buvo neaišku, kodėl jaunų, iki tol sveikų vyrų imuninė sistema buvo pažeista.

Beveik tuo pačiu metu prasidėjo ir vėžio (Kaposhi sarcoma) atvejų protrūkiai. Šiuos susirgimus siejo vienintelis faktorius – užsikrėsdavo jauni homoseksualūs vyrai [1, 2, 3, 10].

Panašūs į AIDS atvejai JAV užfiksuoti dar 1979 metais [LAC]. Tačiau tik 1983 metais, I tipo žmogaus imunodeficito virusas (ŽIV-1) buvo pripažintas pagrindine įgyto imuniteto nepakankamumo sindromo (AIDS, angl. Acquired Immune Deficiency Syndrome) priežastimi [1, 2, 3].

1982 metais buvo žinomi jau 150 sergančių AIDS. Išsiaiškinama, kad ši liga plinta ne tik tarp homoseksualių vyrų, bet ir tarp narkomanų, kraujo ir kraujo produktų recipientų. Taip pat ji perduodama vaikams sergančių motinų. Dėl tokio ligos pasiskirstymo 1982 metais nusprendžiama, kad naujos ligos sukėlėjas turėtų būti lytiškai ir parenteraliai plintantis infekcinis agentas [1].

1983 metais prancūzų mokslininkai išskiria virusą, kuris ir sukelia įgytą imunodeficito sindromą. Dar po poros metų (1985) sukuriamas pirmasis IFA testas, skirtas ŽIV antikūnų nustatymui [1].

1986 buvo pastebėta, kad keletas AIDS atvejų Vakarų Afrikoje buvo susiję su virusu, kuris skyrėsi nuo jau identifikuoto ŽIV viruso. Naujasis virusas buvo pavadintas ŽIV-2 [1, 7].

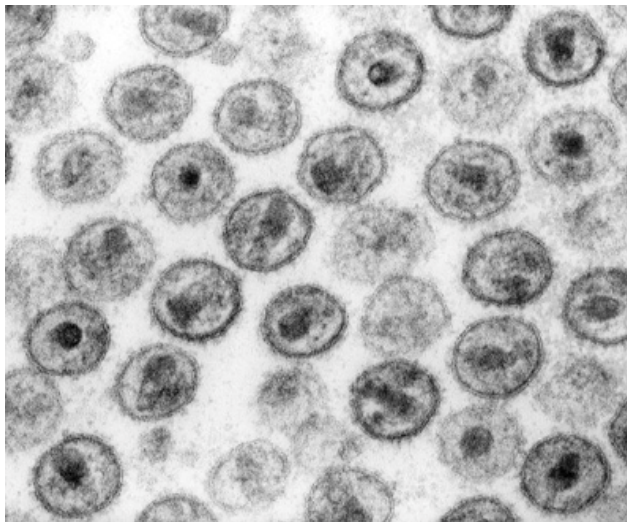
Mokslininkai nustatė, kad ŽIV viruso šaltinis buvo Vakarų Afrikos šimpanzės. Manoma, kad žmonės virusu užsikrėtė per kontaktą su užsikrėtusių gyvūnų krauju, jų medžioklės metu [2]. Manoma, kad tai atsitiko XIX ar XX amžiuje [LAC]. Keletą metų virusas lėtai plito Afrikoje, o vėliau ir kitose pasaulio šalyse [2]. Virusas ilgą laiką galėjo egzistuoti ribotose vietose neišplisdamas, kol jo plitimui nesusidarė palankios demografinės ir socialinės sąlygos: masinė migracija iš kaimo į miestą, susijusi su darbo paieška, pradėjusios irti šeimos, atsitiktiniai lytiniai partneriai, komercinio sekso darbuotojų gausėjimas, kraujo perpylimai. Dėl

intensyvėjančio turizmo ir tarpkontinentinių prekybos ryšių ŽIV išplito ir kitose pasaulio šalyse [10].

## 1.2 Žmogaus imunodeficito virusas

Žmogaus imunodeficito virusas yra retrovirusas ir priklauso lentivirusų šeimai. Paprastai lentivirusams būdingas ilgas latentinis periodas, jie sukelia chroniškas ligas, taip pat jie intensyviai replikuojasi ir pažeidžia centrinę nervų sistemą.

Nors elektroninės mikroskopijos nuotraukose ŽIV-1 ir ŽIV-2 labai panašūs, tačiau skiriasi jų baltymų molekulinis svoris ir reguliaciniai genai. ŽIV-1 ir ŽIV-2 RNR panašumas tik 40-60 procentų. ŽIV-2 yra mažiau patogeniškas nei ŽIV-1 ir aptinkamas tik keliuose Vakarų Afrikos regionuose. Juo infekuoti pacientai sudaro 1 procentą visų ŽIV infekuotų pacientų [1, 15].



1. ŽIV virusinės dalelės

## 1.3 ŽIV atsparumas

Ekstraląstelinis (laisvas) ŽIV, esantis skystoje audinių kultūroje, gali išsilaikyti iki 15 parų kambario temperatūroje (20-22° C) ir iki 11 parų 37° C temperatūroje. Išdžiūvusio kraujo liekanose kambario temperatūroje virusas išlieka gyvybingas apie 7 dienas.

Intraląstelinis (esantis ląstelėje) ŽIV išsilaiko aplinkoje tik vieną parą. Optimaliausias ŽIV biologiniam aktyvumui pH yra 7.0-8.0, o didinant ar mažinant aplinkos pH, ŽIV aktyvumas labai sumažėja.

ŽIV greit žūsta virinamas (100° C temperatūroje iš karto, 56° C temperatūroje per 20 min.), paveiktas spiritu, chloru, rūgštimi ir šarmu, balinamosiomis, dezinfekuojamosiomis medžiagomis (0,5 proc. natrio hipochlorito ir 0,5 proc. gliutaraldehido tirpaluose žūva per 1 minutę; 1 proc. chloramino tirpale - per 5 minutes; 50% - 70% etilo alkoholyje - per 10 minučių).

ŽIV atsparus ultravioletiniams ir rentgeno spinduliams bei šalčiui [10,11].

## 1.4 Morfologija

ŽIV virusas yra 100 nm dydžio, jį supa lipoproteininė membrana. Kiekvieną virusinę dalelę sudaro 72 glikoproteinų kompleksai, kurie integruoti į membraną. Komplexą sudaro trimeras iš išorinio glikoproteino gp120 ir transmembraninio gp41. Glikoproteinas gp120 aptinkamas ŽIV infekuotų pacientų serume ir limfiniame skystyje [1]. Matriksinis baltymas p17 pritvirtintas prie vidinės viruso lipoproteininės membranos. Šerdinio antigeno p24 viduje prisitvirtinusios dvi ŽIV-1 RNR kopijos. ŽIV-1 RNR su baltymais p7 ir p66 (AT) sudaro baltymų ir nukleino rūgščių kompleksą. Virusinės dalelės sudėtyje yra visi fermentai reikalingi replikacijai: atvirkštinė transkriptazė (p66), integrazė p32 ir proteazė p11 [1].

ŽIV viruso paviršiaus glikoproteinai yra viruso Env geno produktai: tai paviršiuje esantis SU (gp120) ir transmembraninis TM (gp41). Jie susidaro ląstelės peptidazei perkirpus baltymą pirmtaką gp160 [5].

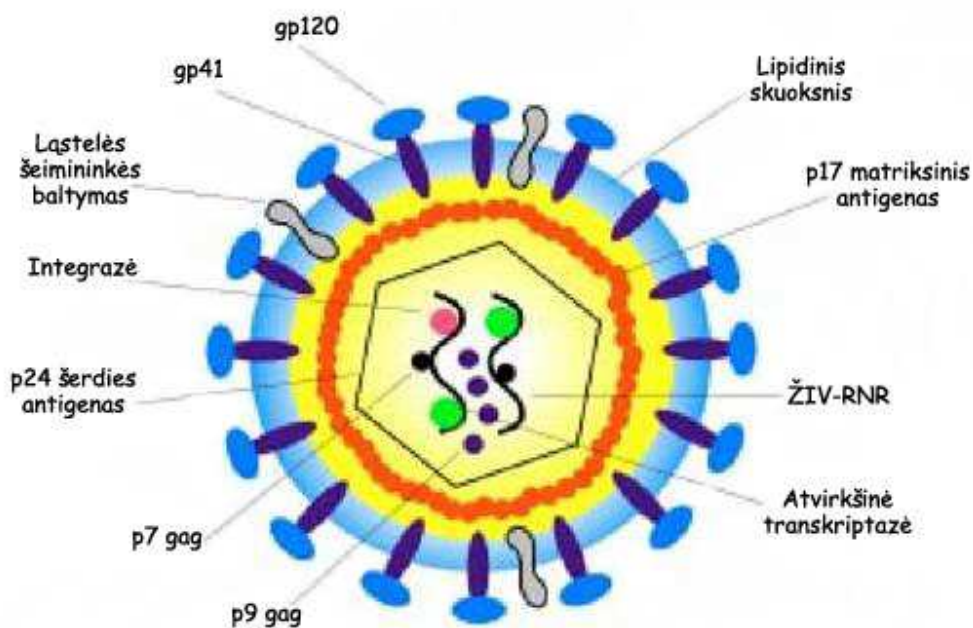
SU (angl. surface glycoprotein) yra gausiai glikozilintas, viriono išorėje esantis baltymas, nekovalentiškai (tik vandenilinėmis jungtimis) sujungtas su gp41; tai pagrindinis ŽIV antigenas. Tiek gp120, tiek gp41 ląstelėje aptinkami oligomerų formoje. Gp120 koduojančios sekos ŽIV skirtingų kamienų labai varijuoja. Išskirti penki kintami (variabilūs) domenai, iš kurių ypač svarbi V3 kilpa. Kai ŽIV paviršiaus glikoproteinas gp120 prisitvirtina prie savo receptoriaus, CD4 baltymo T limfocito paviršiuje, pakinta V3 kilpos konformacija. Ši kilpa sąveikauja su ŽIV viruso antriniais receptoriais, kurie kartu yra chemokinių receptoriai. Sąveika lemia viruso šeiminkų ratą: gp120 gali susisieti su T4 limfocitams būdingu chemokinių receptoriumi CXCR4, makrofagams (monocitams) būdingu receptoriumi CCR5 arba su bet



kuriuo iš jų. V3 kilpa sudaryta iš 30 aminorūgščių, prie likusios molekulės dalies ji prikabinta dviem cisteino liekanomis, kurios tarpusavyje kovalentiškai sujungtos disulfidiniu tilteliu, o savo viršūnėlėje V3 turi konservatyvias aminorūgštis GPGRAF. Likusios aminorūgštys kintamos. Dėl V3 pokyčių gali pakisti ŽIV šeimininkų ratas. Sąsajos su CD4 domenais yra konservatyvūs, sudaryti iš daugelio sričių, kurios, baltymui susivyniojant, atsiduria greta [5].

TM (angl. transmembrane glycoprotein) gp41 N gale turi trumpą, labai hidrofobišką seką. Įvykus gp120 adsorbicijai prie CD4 ši sritis atidengiama ir indukuoja viriono ir ląstelės membranų susiliejamą. Kita hidrofobinė sritis yra gp41 viduryje, ji kaip inkaras įtvirtina baltymą viruso membranoje [5].

ŽIV viruso paviršiaus glikoproteinai struktūriniu ir funkciniu požiūriu panašūs į gripo viruso hemagliutininą, nors aminorūgščių sekų homologijos nėra [5].



2pav. ŽIV virusinė dalelė

## 1.5 Genetika

Retrovirusams būtini trys pagrindiniai genai, tai: *gag* (koduoja grupės antigeną), *pol* (koduoja polimerazę) ir *env* (koduoja apvalkalą). Tipinė retroviruso genomo struktūra: 5'LTR-gag-pol-env-LTR 3'. LTR (long terminal repeat – ilgos pasikartojančios galinės sekos) išsidėstę viruso genomo galuose ir jungiasi su ląstelės šeiminkės DNR po jos užkrėtimo ir nekoduoja baltymų [1]. ŽIV viruso paviršiaus glikoproteinai ir nukleokapsidė yra viruso *env* ir *gag* genų produktai. [1, 5]. Tuo tarpu *pol* genas koduoja atvirkštinę transkriptazę ir kitus fermentus. Be to, ŽIV-1 9kB dydžio genome yra dar šeši genai: *vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev*, ir *nef*. Anksčiau manyta, kad *nef*, *vif*, *vpr* ir *vpu* yra papildomi, nes nėra būti replikacijai *in vitro*. *Nef*, *tat* ir *rev* genai sintetunami viruso replikacijos ciklo pradžioje.

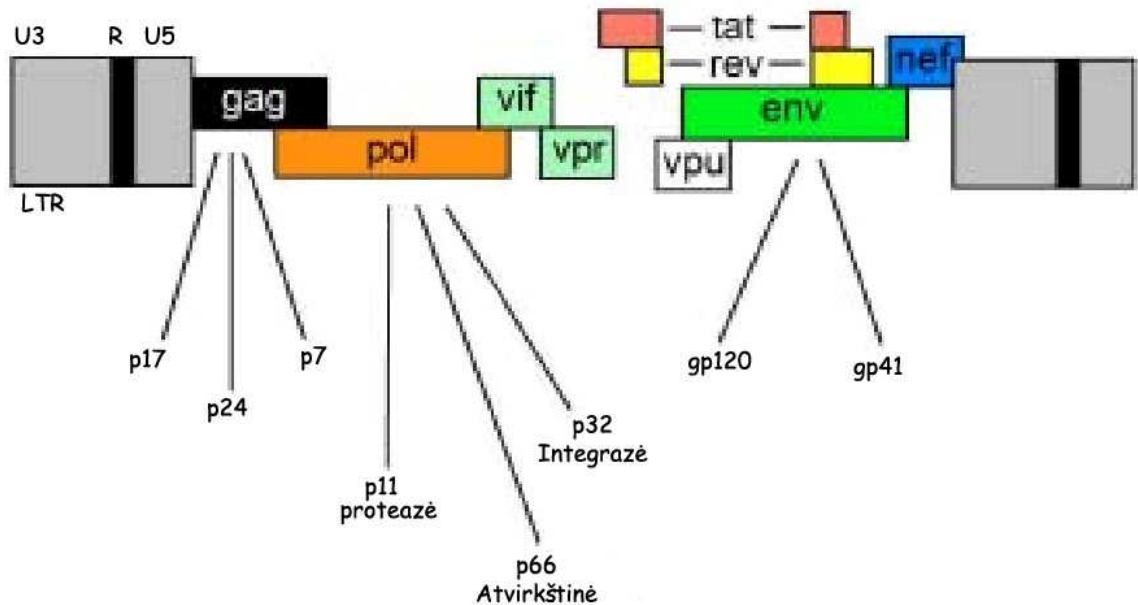
*Tat* ir *rev* yra reguliaciniai baltymai, jie kaupiasi branduolyje ir prisiriša prie tam tikrų virusinės RNR regionų: TAR (transactivation-response elements – transaktyvacijos atsako elementai), aptinkami ant LTR; PRE (*rev* response elements – *rev* atsako elementas), aptinkama *env* gene. *Tat* baltymas yra stiprus LTR promotoriaus regiono transkripcijos aktyvatorius. Jis būtinas viruso replikacijai beveik visose *in vitro* kultūrose. Ciklinas T1 yra svarbus ląstelinis *tat* kofaktorius. *Tat* ir *rev* stimuliuoja ŽIV1-DNR transkripciją į RNR, skatina RNR elongaciją, padidina ŽIV RNR transportą iš branduolio į citoplazmą ir yra būtini transliacijai. *Rev* yra ir branduolio eksporto faktorius, kuris reikalingas perėjimui iš ankstyvo reguliacinių baltymų ekspresijos etapo į vėlesnę struktūrinių baltymų sintezės [1].

*Nef*, kaip *tat* ir *rev* yra reguliacinis baltymas ir sintetinamas replikacijos ciklo pradžioje. Manoma, kad *nef* įtakoja CD4 ir HLA I klasės antigeno kiekio mažėjimą infekuotų ląstelių paviršiuje, tokiu būdu išvengia citotoksinių T-ląstelių.

*Vpr* gyvybiškai svarbus viruso replikacijai nesidalinančiose ląstelėse, tokiose kaip makrofagai. Taip pat *vpr* stimuliuoja ŽIV-LTR kaip ir dar kelis ląstelinius ir virusinius promotorius. *Vpr* svarbus preintegracinio komplekso transportui į branduolį ir gali sulaikyti ląstelę G2 ląstelės ciklo etape.

*Vpu* dalyvauja viruso „pumpuravimosi“ („budding“) procese, o įvykus mutacijai šiame gene virusai išlieka ant užkrėstos ląstelės paviršiaus. Taip pat *vpu* dalyvauja CD4-gp160 komplekso degradacijoje endoplazminiame tinkle, tokiu būdu susidaro pakankamai gp160 naujų virusų formavimuisi.

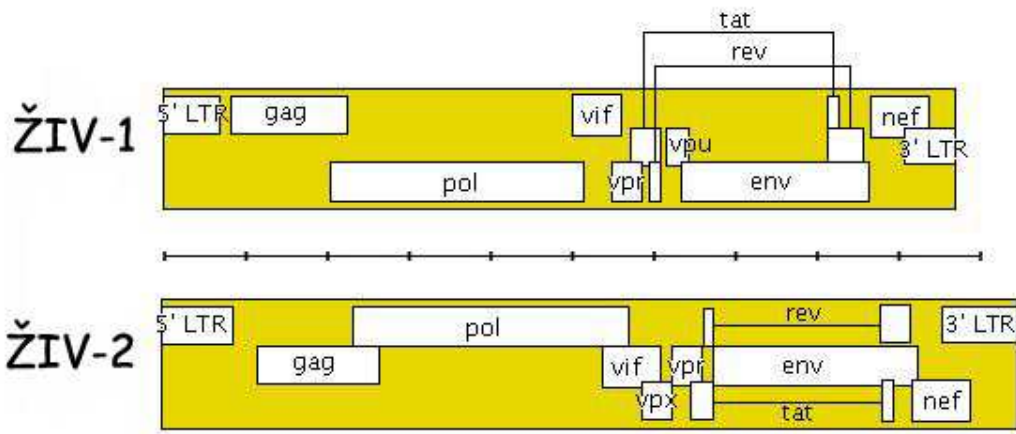
ŽIV-1 izoliatai, neturintys *vif*, nesidaugina CD4+T-ląstelių, grynose T-ląstelių ar makrofagų linijose. Tokie izoliatai gali įeiti į ląstelę ir inicijuoti atvirkštinę transkripciją, tačiau provirusinė DNR sintetinama nepilnai [1].



3pav. ŽIV genetinė struktūra

ŽIV-1 ir ŽIV-2 labai panašūs. Jų poveikis ir genai panašūs. Tačiau ŽIV-2 labiau panašus į beždžionių imunodeficito virusą (BIV) (simian immunodeficiency virus (SIV)) nei į ŽIV-1. ŽIV-2 ir SIV turi papildomą geną, koduojantį X baltymą. O lyginant ŽIV-2 ir BIV baltymus pastebimas tik menkas molekulinė dydžių skirtumas.

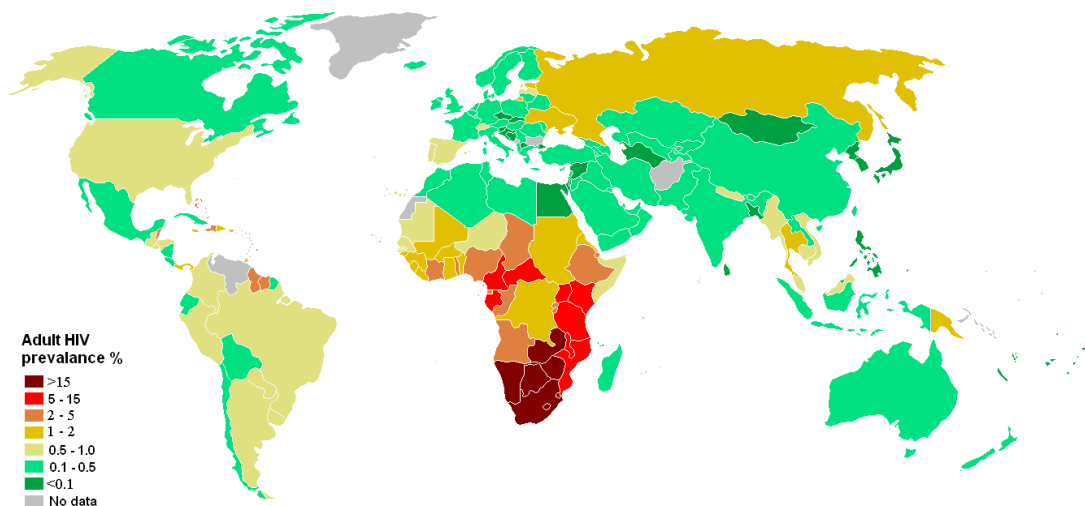
Visi trys virusai (ŽIV-1, ŽIV-2 ir BIV) greičiausiai kilo iš to paties protėvio [7].



4pav. ŽIV-1 ir ŽIV-2 genetiniai skirtumai

## 1.6 ŽIV epidemiologija

Šiuo metu pasaulyje gyvena 33,2 milijonai ŽIV infekuotų žmonių. ŽIV/AIDS sergamumas ir paplitimas labai skiriasi tarp žemynų, šalių ir regionų. Kai kuriose pietų Afrikos šalyse, ypač mieste, 30% gyventojų yra užsikrėtę ŽIV. Tuo tarpu kitose šalyse ŽIV nėra taip stipriai paplitęs. [1].



5pav. ŽIV epidemiologinė situacija pasaulyje

## 1.7 ŽIV infekcijos ir AIDS epidemiologinė situacija Lietuvoje

Pirmasis ŽIV infekcijos atvejis Lietuvoje užregistruotas 1988 metais. Iki 1997 metų infekcija Lietuvoje daugiausia plito lytiniu būdu, vėliau – per kraują, vartojant intraveninius narkotikus. Moterų ir vyrų, užsikrėtusių ŽIV, santykis Lietuvoje – 1:5. Iš viso iki 2009 metų užregistruoti 1227 vyrai, užsikrėtę ŽIV, ir 238 moterys.

ŽIV infekuotų vyrų amžiaus vidurkis – 33 metai, o moterų 35 metai. Pastaruoju metu ŽIV infekuotųjų amžius jaunėja. Pagal amžių, Lietuvoje ŽIV infekcija dažniausiai nustatoma 20-34 metų amžiaus asmenims. Jauniausias ŽIV infekuotas asmuo diagnozuotas 1999 m., diagnozės nustatymo metu pacientui buvo 15 metų, vyriausiems vyru ir moteriai buvo po 68 metus.

Dominuojantis ŽIV plitimo būdas – parenteralinis, t. y. infekcija plito per nešvarias adatas vartojant intraveninius narkotikus. Šiuo būdu užsikrėtė 80 proc. visų registruotų atvejų. Pagal apskritis, per visą ŽIV infekcijos registravimo šalyje laikotarpį, daugiausiai ŽIV infekcijos atvejų išaiškinta Klaipėdos apskrityje - 441, Vilniaus apskrityje – 275, Šiaulių apskrityje – 82, Kauno apskrityje – 87, Telšių apskrityje – 56, Alytaus – 49, Panevėžio – 17, Marijampolės – 17, Tauragės – 11, Utenos – 20. Įkalinimo įstaigose – 332 nuteistųjų, užsikrėtusių ŽIV. 11 atvejų apskritis nežinoma.

Daugiausiai naujų ŽIV infekcijos atvejų diagnozuojama įkalinimo įstaigose, antroje vietoje – gydymo įstaigose, trečioje – adatų-švirškų keitimo kabinetuose. Iš viso Lietuvoje iki 2009 metų AIDS diagnozuota 213 žmonėms.

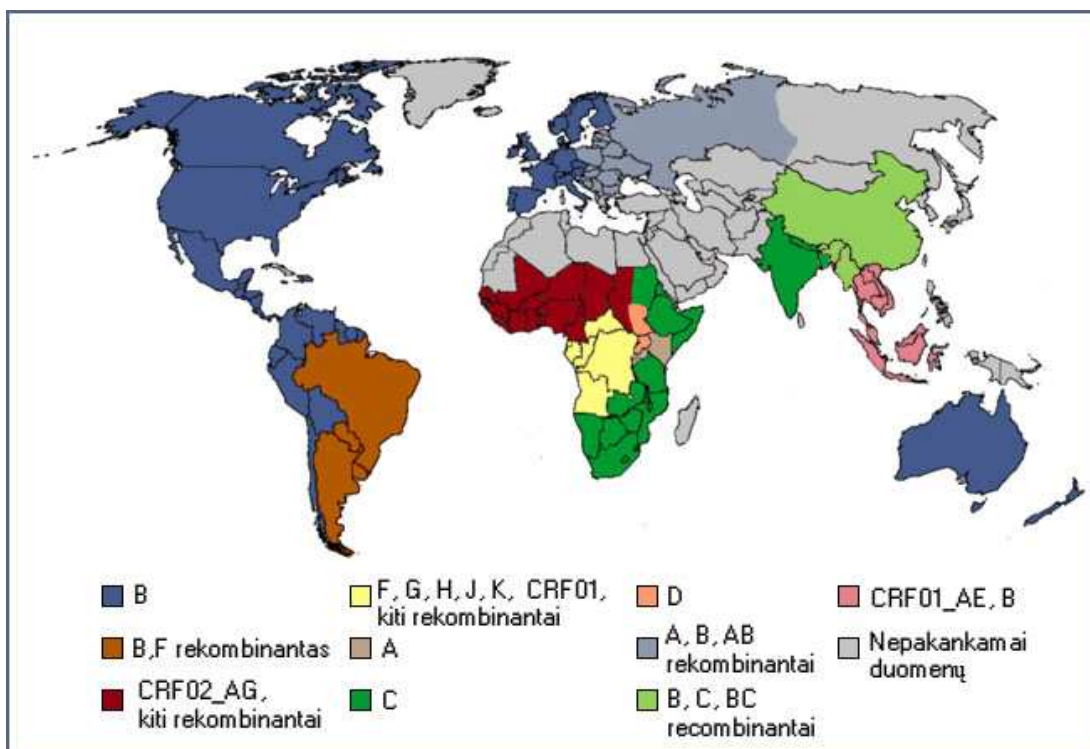
Daugiausiai ŽIV užsikrėtė vartojant intraveninius narkotikus – 1075 atvejai. 195 žmonės užsikrėtė heteroseksualių lytinių santykių metu. Homoseksualių lytinių santykių metu užsikrėtė 93 asmenys. 1 atveju ŽIV perduotas motinos vaikui.

Europos ŽIV monitoringo centro duomenimis, Lietuva priskiriama prie žemo ŽIV infekcijos paplitimo šalių. Lyginant su šalimis kaimynėmis, ŽIV infekcijos paplitimas 100 tūkst. gyventojų Lietuvoje siekia 24.4 atvejų, Baltarusijoje – 49.7, Latvijoje – 112.9, Estijoje – 272.2, Kaliningrado srityje – 470, Rusijoje – 169.6.

## 1.8 ŽIV klasifikacija

Filogenetiniai tyrimai parodė reikšmingą genetinį ŽIV kamienų skirtumą tarp skirtingų teritorijų. Dauguma ŽIV-1 tipo viruso, sukėlusio globalinę epidemiją, kamienų priklauso M (angl. *major*) grupei. Pastaroji skaidoma į subtipus žymimus raidėmis nuo A iki K. Be to, 20 proc. M grupės izoliatų yra rekombinaciniai virusai su genetinė medžiaga iš skirtingų subtipų. Manoma, kad dauguma ŽIV-1 infekcijos atvejų yra sukeliama ne B subtipu. Didžiausias genetinis ŽIV-1 variabilumas yra Afrikoje, kur randami visi subtipai ir grupės. Predominuojantis Pietryčių Azijos ir Filipinų subtipas yra E (nors galimas atvejis, jog tai rekombinantas A/E). Indijoje predominuoja C subtipas. Tačiau ateityje dėl globalinių kelionių ir migracijos pasaulyje greičiausiai įvyks visų ŽIV-1 subtipų susimaišymas ir platus geografinis paplitimas, bei padidės rekombinantinių variantų pasireiškimo dažnumas.

Didesnė dalis iki 2002 metų sukauptų žinių apie ŽIV-1 atsparumą vaistams bei jo genotipinių pokyčių interpretavimą susijusi su B subtipu. Visos žinomos B subtipų su atsparumu vaistams susietos mutacijos įvyksta (netgi tose pačiose vietose) ir ne B subtipuose, nors yra ir šiokių tokių skirtumų. Tokiu būdu sukauptas žinias galima plačiai taikyti [4].



6pav. ŽIV subtipų ir jų rekombinantų pasiskirstymas pasaulyje

## 1.9 ŽIV plitimo būdai

Infekcijos šaltinis – žmogus, užsikrėtęs ŽIV. Specifinės imunoprevencijos priemonių nėra - vakcina dar tik kuriama.

Didžiausia ŽIV koncentracija randama kraujyje, makšties išskyrose, spermoje, motinos piene. Seilėse, šlapime, ašarose, prakaitė ŽIV koncentracija yra nedidelė, todėl nekelia užsikrėtimo pavojaus.

ŽIV užsikrečiama, kai tiesiogiai į kraują pro gleivines ar sužeistą odą patenka ŽIV užkrėsti organizmo skysčiai, kuriuose viruso koncentracija didžiausia [10].

Skiriami trys ŽIV plitimo būdai:

- 1) lytinis;
- 2) per kraują;
- 3) iš motinos vaikui.

### Per lytinius santykius

ŽIV gali plisti per visų rūšių (heteroseksualius, homoseksualius, oralinius) lytinius santykius (Pasaulyje 80% užsikrėtusiųjų ŽIV užsikrėtė lytinių santykių be apsaugos priemonių metu [11], jeigu vienas iš partnerių yra užsikrėtęs. ŽIV užsikrėtimo tikimybė per lytinius santykius didėja:

- 1) jei vienas iš partnerių serga kita lytiškai plintančia liga (chlamidijoje, lytiniu herpesu, sifiliu, gonorėja ir kt.);
- 2) jei santykiaujama menstruacijų metu;
- 3) jei vieno iš partnerių mechaniškai pažeista gleivinė (lytinių organų, išeinamosios angos ar burnos);
- 4) jei santykiai buvo prievartiniai, mechaniškai žalojantys gleivinę (išprievartavimo atvejais);
- 5) pirmų lytinių santykių metu;
- 6) jei vienam iš partnerių yra pirminė ŽIV ar AIDS stadija (tada jo organizmo biologiniuose skysčiuose ypač didelė viruso koncentracija).

Apipjaustyti vyrai turi 8 kartus mažesnę tikimybę užsikrėsti ŽIV nei neapipjaustyti. ŽIV perdavimo rizika iš vyro moteriai 20 kartų didesnė analinių santykių metu, nei santykiaujant vaginaliai. Kas penkti santykiai su asmeniu, ką tik užsikrėtusiu ŽIV, baigiasi ŽIV perdavimu. UNAIDS duomenimis, apie 80 proc. užsikrėtusiųjų ŽIV pasaulyje užsikrėtė nesaugių (nenaudojo prezervatyvo) lytinių santykių metu. Nustatyta, kad heteroseksualių santykių metu labiau pažeidžiamos yra moterys.

### **Per kraują**

1) Narkotikų vartojimas intraveniniu būdu. Užsikrečiama leidžiantis narkotines medžiagas bendromis adatomis ir švirkštais. Galima užsikrėsti naudojantis ne tik savo švirkštais ir adatomis, bet ir traukiant į švirkštą narkotiko iš bendro indo arba plaunant švirkštą bendrame inde. Lietuvoje ŽIV infekcija tarp intraveninius narkotikus vartojančių asmenų pradėjo plisti 1994 metais. Panašiai kaip ŽIV plinta hepatitų B ir C virusai.

2) Kraujo perpylimai. Tikimybė užkrėsti žmogų ŽIV perpylus kraują, siekia iki 95 procentų. Lietuvoje donorų kraujas dėl ŽIV antikūnų pradėtas tirti 1987 metais [10, 12].

3) Iki 1995 m. pasaulyje apie 5 proc. infekuotųjų ŽIV buvo užkrėsti perpilant kraują ar jo preparatus. Nuo 1985 m., pradėjus tirti donorinį kraują, užkrėtimų sumažėjo ir dabar pasaulyje sudaro mažiau 0,1 proc. visų infekuotųjų. [12]

4) Pasaulio sveikatos organizacijos dokumentuose pabrėžiama, kad neatlygintinos, altruizmu grindžiamos donorystės plėtra - gerokai efektyvesnis būdas sumažinti kraujo perpylimų metu perduodamų infekcijų grėsmę, negu donorų kraujo tyrimai [10].

5) Tatuiruotės ir kraujo ritualai. Tatuiruotėms naudojamos adatos ar ritualiniai peiliai, jei jie po naudojimo netinkamai dezinfekuojami, gali tapti infekcijos šaltiniu.

6) Organų transplantacija. Kaip ir kraujo perpylimas yra pavojinga, nors visi organų ir audinių donorai tiriami dėl ŽIV. Saugumą persodinant organus ar audinius apsunkina ŽIV infekcijai (ir kitoms virusinėms infekcijoms) būdingas inkubacinis periodas, vadinamas "lango" periodu. Tai yra pirmosios trys savaitės po užsikrėtimo, kai įprastais tyrimo metodais dar negalima nustatyti antikūnų prieš ŽIV.



### **Iš motinos vaikui**

Tikimybė, kad motina, užsikrėtusi ŽIV, perduos ŽIV kūdikiui nėštumo, gimdymo metu ar maitindama krūtimi, sudaro 13–30 procentų.

Gimdymo metu naujagimis paprastai užkrečiamas, kai jo oda ir gleivinės susiliečia su motinos krauju ar gimdos kaklelio išskyromis. ŽIV gali būti perduotas po gimdymo, jei kūdikis maitinamas krūtimi (10–15 proc.). Besilaukiančioms ŽIV užsikrėtusioms moterims, taikant tinkamą gydymą (antiretrovirusiniais vaistais) ir kitas priemones (Cezario pjūvis, nemaitinimas krūtimi), kūdikių užsikrėtimo galimybė sumažinama iki 2 procentų ir mažiau. [1]

### **Perinatalinį ŽIV perdavimą skatina keletas veiksnių:**

1) klinikiniai veiksniai, kai motina suseraga AIDS, didelis ŽIV kopijų skaičius, intraveninių narkotikų vartojimas nėštumo metu, priešlaikinis gimdymas, maitinimas krūtimi, vitamino A trūkumas;

2) akušeriniai veiksniai, kai praeina daugiau nei 4 val. po vaisiaus vandenų nutekėjimo, tada perinatalinio perdavimo rizika padidėja 2 kartus.

Jei nėščiajai nustatoma ŽIV infekcija, toliau svarbūs 4 dalykai:

- 1) antiretrovirusinių vaistų vartojimas nėštumo metu;
- 2) planinė Cezario pjūvio operacija 38 nėštumo savaitę;
- 3) rekomenduojama nemaitinti kūdikio krūtimi;
- 4) prevencinis naujagimio gydymas.

Nėštumas užbaigiamas 38 nėštumo savaitę, nes, nutekėjus vaisiaus vandenims, didėja ŽIV infekcijos perdavimo rizika naujagimiui.

Motinos piene yra laisvų viruso ląstelių, todėl maitinti kūdikio nerekomenduojama. Jei nėra kitos išeities ir moteris kūdikį žindo, reikia stengtis, kad žindymo laikotarpis būtų kuo trumpesnis. Nustatyta, kad po 4-6 žindymo mėnesių ŽIV infekcijos perdavimo rizika labai padidėja. Naujagimis prevenciškai gydomas antiretrovirusiniais vaistais pirmąsias 6 savaites. [10]

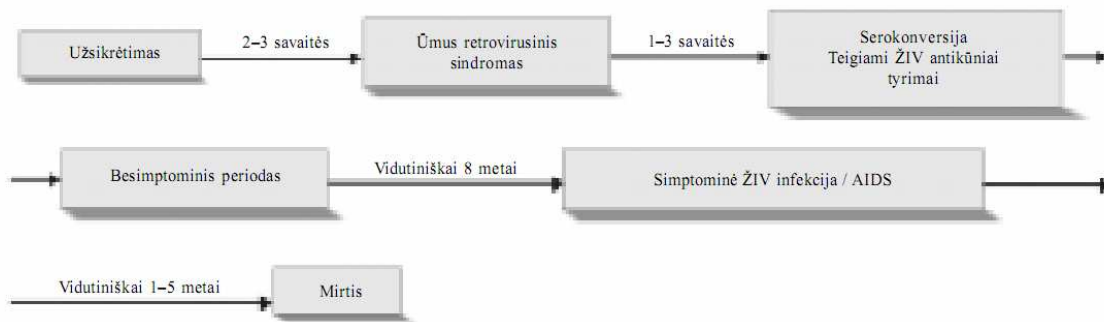
## 1.10 ŽIV inkubacinis laikotarpis

ŽIV infekciją galima suskirstyti į kelias stadijas:

1) Ūminė pirminė infekcija. Gali būti be simptomų arba praėjus kelioms savaitėms po užsikrėtimo gali pasireikšti į gripą/peršalimą panašūs požymiai: karščiavimas, silpnumas, šaltkrėtis, galvos skausmai, viduriavimas. Šis negalavimas tęsiasi dvi savaites, paskui visiškai pasveikstama. Šio tarpsnio pradžioje virusų kraujyje staigiai padaugėja, o CD4+ T limfocitų (ŽIV ląstelių šeimininkų) kiekis laikinai sumažėja, tačiau vėliau imuninei sistemai įveikus virusą (manoma, kad čia svarbų vaidmenį turi ir CD8+ limfocitai žudikai), CD4+ T-limfocitų kiekis atkuriamas, o viruso kiekis kraujyje sumažėja.

2) Infekcija be požymių. Užsikrėtęs asmuo yra viruso nešiotyto būklės. Nors ligos požymių nėra, virusų koncentracija kraujyje labai lėtai, bet nepaliaujamai auga. Tiesa, viruso susidarymo ir šalinimosi iš organizmo greitis yra panašus, bet vis dėlto virusai susidaro greičiau. Apskaičiuota, kad per dieną gali susidaryti apytiksliai iki  $10^{10}$  ŽIV dalelių, o žūva iki  $10^9$  CD4+ ląstelių, bet imuninė sistema ilgą laiką geba atkurti jų pradinę koncentraciją. Šiam laikotarpiui paprastai tęsiantis daug metų, tolydžio mažėja CD4+ limfocitų kiekis. Svarbu, kad virusai aktyviai dauginasi ne visose ląstelėse – daugelyje ramybės būsenoje esančių T-limfocitų virusai ilgą laiką išlieka latentinio būvio, integruoti į ląstelės šeimininkės genomą. Antiretrovirusiniai vaistai slopina tik ŽIV dauginimąsi, todėl latentinės būsenos viruso jie neveikia. Jei nustojus vartoti vaistus nuo ŽIV, T-limfocitai, kur įsiterpęs provirusas, sužadunami, limfocituose prasideda intensyvus virusų dauginimasis, ir liga atsinaujina.

3) ŽIV ligos požymių atsiradimas: įgytasis imunodeficito sindromas (AIDS). Atsiranda ŽIV infekcijos požymiai. AIDS susergama vidutiniškai praėjus 10–12 metų po užsikrėtimo. Dėl imuninės sistemos nusilpimo ŽIV nešiotojas dar gali susirgti plaučių uždegimu, kurį sukelia Pneumocystic, džiova – uždara tuberkuliozės forma, kandidoze, toksoplazmoze, citomegaloviruso sukeltu retinitu, įvairiomis vėžio formomis: gimdos kaklelio vėžys, Kapoši sarcoma, įvairios B-ląstelių limfomos, susijusios su Epstein-Barr virusu, ir kt. AIDS diagnozuojamas, kai CD4+ limfocitų kiekis sumažėja iki  $200 \text{ ląst./}\mu\text{l}$  ir mažiau [5, 10]



7pav. ŽIV infekcijos klinikinė eiga

## 1.11 ŽIV infekcijos diagnostika

Teigiamas atrankinio tyrimo rezultatas rodo, jog žmogus galbūt yra užsikrėtęs ŽIV ir gali užkrėsti kitus. Dažniausiai testas atliekamas nustatant specifinius antikūnus prieš ŽIV imunofermentinės analizės metodu (ELISA testas). Teigiamas pirminis ŽIV testas dar nereiškia, kad žmogus užsikrėtęs ŽIV. Gavus teigiamą ŽIV testo rezultatą, testas kartojamas, siekiant nustatyti, ar neįvyko klaida [10, 15]. Pakartotini testai atliekami naudojant Western blot arba imunofluorescencijos testus [1]. Pakartotinai gavus teigiamą rezultatą, atsižvelgiant į pirminius rezultatus bei įvertinus tiriamo žmogaus elgesio riziką, daromi kiti tyrimai.

Paskutinė ŽIV infekcijos stadija – AIDS – diagnozuojama tik kruopščiai įvertinus užsikrėtusio žmogaus klinikinę būklę ir atlikus kitus svarbius laboratorinius tyrimus.

Neigiamas tyrimo rezultatas rodo, kad tyrimo metu antikūnai prieš ŽIV nenustatyti, tačiau dėl inkubacinio periodo, kai viruso antikūnai dar nesintetinami arba jų nėra pakankamai, siūloma testą pakartoti po trijų mėnesių [10].

## 1.12 ŽIV replikacijos ciklas

ŽIV replikacija sudėtingas procesas. Kiekviena šio proceso stadija būtina virusui sėkmingai replikuotis, todėl veiksmingi antiretrovirusiniai vaistai gali stabdyti viruso dauginimosi procesą bet kurioje stadijoje.

Pirma stadija - tinkamos šeimininko ląstelės, pavyzdžiui, CD4+ T limfocito, užkrėtimas. Kad ŽIV galėtų įsiskverbti į ląstelę, reikia tam tikrų ląstelės paviršiuje esančių receptorių –

CD4 receptorių ir koreceptorių, tokių, kaip CCR5 ir CXCR4. Šie receptoriai sąveikauja su viruso apvalkale esančių proteinų kompleksais, kuriuos sudaro du glikoproteinai: viruso išorėje esantis gp120 ir jungiamasis gp41.

ŽIV priartėjus prie ląstelės, gp120 susiliečia su CD4 receptoriumi. Šis procesas vadinamas prisitvirtinimu. Prisitvirtinus prie koreceptoriaus, pakinta gp120 glikoproteino struktūra. Šie pokyčiai leidžia gp41 glikoproteinui išsitiesti ir susisiekti su ląstelės paviršiumi. Po to gp41 vėl susiveja ir pritraukia ląstelę prie viruso, tuo būdu palengvindamas membranų susiliejimą.

Viruso branduolio kapsulė pereina į ląstelės vidų, atsiveria, išleisdama dvi viruso RNR grandines bei tris svarbius fermentus: integrazę, proteazę ir atvirkštinę transkriptazę. Atvirkštinė transkriptazė skatina atvirkštinę viruso RNR transkripciją: vienos grandinės viruso RNR transkribuojama į RNR/DNR dvigubą spiralę. Virusio nukleazė nutraukia RNR grandinę. Polimerazė papildo likusią DNR grandinę ir suformuoja dvigubą DNR spiralę.

Dabar suaktyvėja integrazė. Ji perskelia DNR galutinę dalį iš abiejų pusių ir suformuoja du lipnius galus. Integrazė transformuoja DNR į ląstelės nukleazę ir palengvina jos integravimą į šeimininko ląstelės genomą. Šeimininko ląstelės genomą dabar turi genetinę ŽIV informaciją.

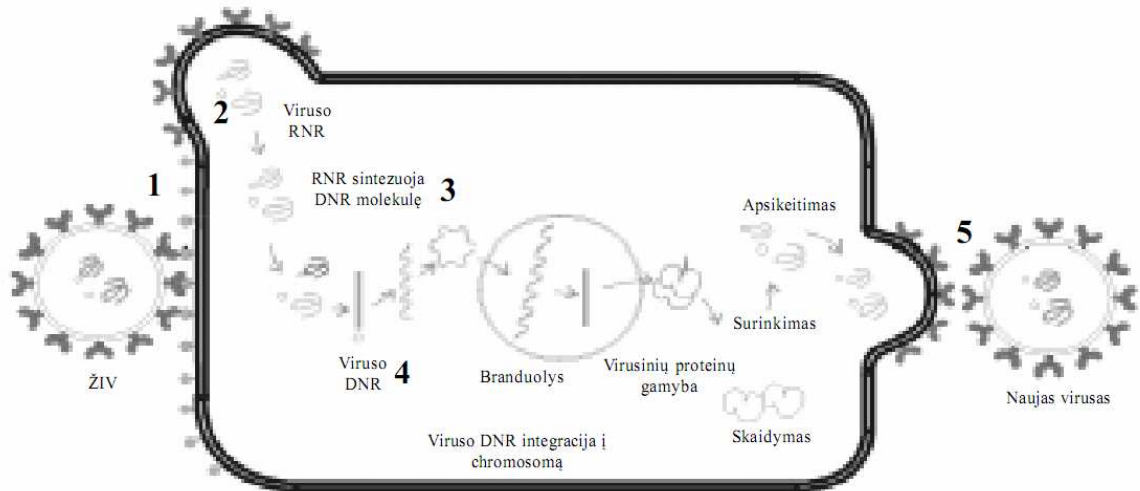
Ląstelės aktyvacija sukelia proviruso DNR transkripciją ir ji virsta kurjerine RNR. Virusio kurjerinė RNR migruoja į ląstelės plazmą, kur sintezuojami statybiniai naujų virusų blokai. Kai kuriuos jų perdirba viruso proteazė. Proteazė suskaldo ilgesnius proteinus į trumpesnius – šerdinius. Tai svarbiausia užkrečiamų virusų gamybos stadija. Dvi viruso RNR grandinės ir replikaciniai fermentai suartėja, o šerdiniai proteinai susikaupia aplink, sudarydami kapsulę. Šis nesubrendęs protokolinis virusas palieka ląstelę ir įgauna apvalkalą iš šeimininko ląstelės ir viruso proteinų. Virusas bręsta ir jau gali užkrėsti kitas ląsteles.

ŽIV replikuoja milijardus kartų per dieną, ardydamas šeimininko imunines ląsteles ir sukeldamas ligos progresą. Vaistai, trikdydantys svarbiausias viruso replikacijos stadijas, gali sustabdyti šį mirtiną procesą. Įsiskverbimą į šeimininko ląstelę galima sustabdyti, pavyzdžiui, susijungimo inhibitoriais.

Atvirkštinės transkriptazės inhibiciją galima sukelti nukleotidiniais inhibitoriais arba nenukleotidiniais atvirkštinės transkriptazės inhibitoriais – tai standartinio retrovirusinio gydymo dalis.

Integrazės poveikį galima blokuoti. Proteazės inhibitoriai taip pat yra standartinio retrovirusinio gydymo dalis. Nutraukus viruso replikacijos procesą bet kurioje stadijoje, ŽIV infekciją galima kontroliuoti [1, 10, 21].

Viruso membrana  
susijungia su ląstelės (T helperio) membrana



7pav. ŽIV dauginimasis Ląstelėje

### 1.13 ŽIV infekcijos gydymas

ŽIV infekcijos gydymui skiriami viruso dauginimąsi slopinantys vaistai, vadinami antiretrovirusiniais vaistais. Standartinis ŽIV infekcijos gydymas – tai gydymas mažiausia trijų antiretrovirusinių preparatų deriniais (HAART – padidinto intensyvumo ARV terapija). Pasaulyje registruota daugiau, nei 20 antiretrovirusinių vaistų, dauguma vaistų yra registruoti ir Lietuvoje.

Gydymas skiriamas imunitetui susilpnėjus iki tam tikros ribos. Vieną kartą paskyrus gydymą, vaistus reikia vartoti iki gyvenimo pabaigos. Vartojant šiuos vaistus reikia laikytis griežto gydymosi režimo.

Gydymas antiretrovirusiniais vaistais sumažina ŽIV koncentraciją kraujyje bei padidina CD4+ ląstelių skaičių kraujyje. Padaugėjus CD4+ ląstelių, sumažėja tikimybė susirgti bet kuria indikacine liga, sumažėja ŽIV užsikrėtusių žmonių mirties rizika [10, 1, 4, 8, 16].

### 1.14 ARV preparatai ir jų veikimo būdai

Antivirusinis šių preparatų veikimas remiasi dviejų svarbiausių ŽIV-1 gyvybinio ciklo fermentų (atvirkštinės transkriptazės (AT) ir proteazės (P)) aktyvumo slopinimu [4].

Didžioji dauguma šių vaistų yra viruso polimerazių substratai – nukleozidų ir nukleotidų analogai. Nukleozidų analogai iš tikrųjų yra vaistai pirmtakai: tam, kad taptų aktyvūs, jie turi būti fosforilinami. Ši savybė dažnai ir lemia jų atrankumą. Plačiai taikomi ir virusų polimerazės slopikliai, nepriklausantys modifikuotų nukleozidų grupei [5, 9].

Šiuo metu naudojami keturių grupių vaistai, kurie skirtingai veikia ŽIV ląstelėse.

Atvirkštinės transkriptazės inhibitoriai (ATI; angl. *RTIs*)

- Nukleozidiniai ir nukleotidiniai viruso fermento atvirkštinės transkriptazės inhibitoriai (NATI; angl. *NRTIs*), kurie stabdo virusinės DNR formavimąsi [4, 10]. Tokia DNR negali įsiterpti į CD4+ ląstelės DNR. Šios grupės vaistai: stavudinas (d4T), zidovudinas (AZT) - veikia aktyvuotas CD4+ ląsteles, o didanozinas (ddI), zalcitabinas (ddc), lamivudinas (3TC), tenofoviras - ramybės būsenos CD4+ ląsteles [20];
- Nenukleozidiniai viruso fermento atvirkštinės transkriptazės inhibitoriai (NNATI, angl. *NNRTIs*) (delavirdinas, nevirapinas, efavirenza) prisijungia prie fermento - atvirkštinės transkriptazės aktyvios vietos, pakinta fermento konformacija ir fermentas inaktyvuojamas [4, 10, 20].

Nuo 2003 metų atsirado naujų vaistų: tai antrosios kartos NNATI [4].

Proteazių inhibitoriai (PI; angl. *PIs*), kurie slopina viruso fermentus proteazes [4, 10]. Sustoja viruso apvalkalo formavimas. Veikiant visų grupių vaistams ląstelė nebegamina viruso, arba pagamina nepilnavertį, negalintį užkrėsti naujos ląstelės. Imuninė sistema išlieka sveika. Šios grupės vaistai – sakvinaviras, indinaviras, ritonaviras, nelfinaviras, amprenaviras, atanaviras, lopinaviras/ritonaviras [10, 20].

Fuzijos inhibitoriai – naujos kartos vaistai nuo ŽIV enfuvirtide (FUZEON) yra trumpi (~36 a. r. liekanos) peptidai, kurie prisijungia prie ŽIV paviršiaus baltymo gp41 (suliejamojo baltymo) ir neleidžia viruso ir ląstelės membranoms susiliesti ir virusui patekti į ląstelę. Šie vaistai vertingi tuo, kad veikia ne ląstelėje, o už jos ribų ir slopina ankstyviausią ŽIV infekcijos stadiją [5, 10].

Integrazių inhibitoriai – tik 2007 Jungtinių Valstijų maisto ir vaistų administracijos patvirtintas preparatas Raltegraviras (anksčiau vadintas MK-0518). Šis vaistas blokuoja fermentą integrazę, neleidamas integruoti virusinio genomo į ląstelės šeimininkės DNR. Tokiu būdu visiškai blokuojamas tolimesnis viruso vystymasis dėl ko viruso kopijų skaičius kraujyje sumažėja iki 50 kopijų/ml ir dar mažiau [12, 13, 14].

Dalis užsikrėtusių ŽIV žmonių nesugeba laikytis vaistų vartojimo režimo, griežtų gydymo reikalavimų, netoleruoja šalutinio, toksiško vaistų poveikio. Geriamos tabletės sąveikauja tarpusavyje, be to, reikia atsižvelgti į tai, ar vaistai vartojami po valgio ar nevalgius. Dažnai dėl šių priežasčių atsiranda vaistams atsparūs ŽIV potipiai, kurie trukdo efektyviai gydyti asmenis, užsikrėtusius ŽIV.

Daugumai pacientų antiretrovirusinis gydymas nuslopina viruso dauginimąsi, tačiau visiškai jo nesunaikina. Nustojus gerti vaistus, virusas vėl pradeda daugintis. Dėl šios priežasties labai brangius ir sunkiai toleruojamus vaistus reikia vartoti visą gyvenimą.

Šalutinis vaistų dėl ŽIV ir AIDS poveikis:

- Galvos skausmas.
- Pykinimas ir vėmimas.
- Nuovargis.
- Viduriavimas.
- Bėrimas.

Lietuvoje gydymas taikomas:

1. Diagnozavus AIDS.
2. Kai CD4+ ląstelių yra mažiau nei 200 ląst/mm<sup>3</sup>.
3. Kai CD4+ ląstelių sk. yra 200-250 ląst/mm<sup>3</sup> ir ŽIV RNR daugiau, nei 50000 kopijų mililitre.
4. Moterims, užsikrėtusioms ŽIV nėštumo ir gimdymo metu, jų pagimdytiems vaikams.
5. Asmenims, turėjusiems kontaktą su užsikrėtusiu asmeniu [10].

### **1.15 Atsparumo ARV preparatams mechanizmai**

Atsparumą vaistams sukelia labai didelis ŽIV kintamumas. Vieno žmogaus organizme gali būti tūkstančiai to pačio subtipo atmainų arba kvazirūšių. Virusas nuolat mutuoja, todėl atsiranda vis naujesnių variantų arba atsikartoja jau buvę. Šios kvazirūšys suformuoja daugialypę virusų su skirtingais požymiais populiaciją. Vaistai suveikia kaip atrankinis veiksnys, užtikrinantis selektyvų tam tikrų izoliatų išlikimą. Todėl svarbu išnagrinėti, kokie vaistai yra vartojami, kaip jie veikia ir kokias mutacijas sukelia [4].

Pirmieji pacientai, kuriems pasireiškė atsparumas antiretrovirusiniams vaistams, bet jie ankščiau nebuvo gydyti šiais preparatais, pastebėti 1993 metais, praėjus šešiams metams po to, kai rinkoje buvo pristatytas zidovudinas. Po to kai 1996 metais pradėta taikyti HAART (padidinto intensyvumo ARV terapija), padaugėjo pranešimų apie tai, jog pastebėtas atsparių ARV viruso štamų plitimas [9]. Pirminio ŽIV atsparumo pasireiškimas skirtingose bendruomenėse gana skirtingas, tačiau yra tendencija, kad atsparių štamų vis daugėja [9]. Dauguma tokių atsparių ŽIV štamų atsiradę po gydymo, tačiau yra ŽI virusų, kurie iš prigimties atsparūs tam tikriems preparatams. Pavyzdžiui: ŽIV-2 natūraliai atsparus daugumai nenukleozidinių atvirkštinės transkriptazės inhibitorių. B subtipas (dominuojantis JAV ir Europoje) yra jautresnis proteazės inhibitoriams, nei kai kurie kiti ŽIV-1 [9].

Jungtinėse Amerikos valstijose beveik 50 proc. ARV gydomų pacientų užsikrėtę virusais turinčiais mutacijas, nulemiančias atsparumą bent vienam iš šiuo metu naudojamų preparatų [9]. Iš to išplaukianti problema – atsparių antiretrovirusiniams preparatams ŽI virusų štamų plitimas.

Gydymą ARV apsunkina tai, kad dažnai pasireiškia ŽIV atsparumas ne vienam, bet keliems preparatams iš skirtingų grupių, o taip pat ir tai, kad pasireiškia kryžminis atsparumas tarp vaistų iš skirtingų grupių [9].

NATI – pirmoji vaistų grupė, kuriai aptiktas atsparumas. Vienas iš pagrindinių procesų, lemiančių atsparumą NATI - pirofosforolizė (pradmenų išblokavimas), kurios metu nukleozidas (AZT trifosfatas) pašalinamas iš grandinės. Tai leidžia atvirkštinei transkriptazei tęsti savo darbą. NATI selektyvinio spaudimo metu atrenkamos mutacijos struktūriškai pakeičiančios AT taip, kad sumažėja fermento afiniškumas vaistams. Tuomet NATI negali įsijungti į grandinę [4, 9].

NNATI monoterapija labai greitai sukelia labai aukšto lygio atsparumą dėl įvykstančių mutacijų vaistų sukibimo vietose ir aplink jas.

Atsparumas PI priskirtinas mutacijoms ŽIV-1 aktyviame proteazės lokuse arba kitur. Atsparumas PI paprastai vystosi lėtai, kol atsiranda kelios genetinės mutacijos. Tai dar vadinama mutaciniu “barjeru”.

PI atsparumą sąlygojančios mutacijos skirstomos į pirmines ir antrines.

1. Pirminės mutacijos vyksta aktyviame proteazės saite. Tai 52 mutacijos, įvykstančios daugiau, nei 27 kodonuose, kurios pakeičia mažiausiai 33 amino rūgštis koduojančiame proteazės gene. PI konkuruoja su substratu dėl prisijungimo prie aktyvių proteazės



centrų. Šios mutacijos sumažina tokią galimybę. Tai gali baigtis ir sumažėjusiu fermento aktyvumu.

2. Antrinės mutacijos vyksta už aktyvių proteazės saitų ribų ir didina proteazės aktyvumą, tiesiogiai neveikdamos inhibitorių jungimosi. Rezultatas – fenotipinis atsparumas [4].

## **2. Eksperimentinė dalis**

### **2.1 Tyrimo medžiaga**

2006, 2007 ir 2008 metais ištirti 73 naujai ŽIV infekuoti asmenys, kurių kraujyje ŽIV virusinis krūvis viršijo 2000 kopijų/ml. Iš pacientų plazmos pagal gamintojo instrukcijas išskirta virusinė RNR, kuri toliau apdorojama naudojantis „ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0“ (Celera Diagnostics) reagentų rinkiniu. Nusekvenavus pol geną nustatomas pirminis ŽI viruso atsparumas antiretrovirusinams vaistams. Duomenys tikrinami Stanfordo universiteto duomenų bazėje, kurioje taip pat patikrinama nusekvenotų sekų kokybė bei nustatomas viruso subtipas.

### **2.2 Priemonės:**

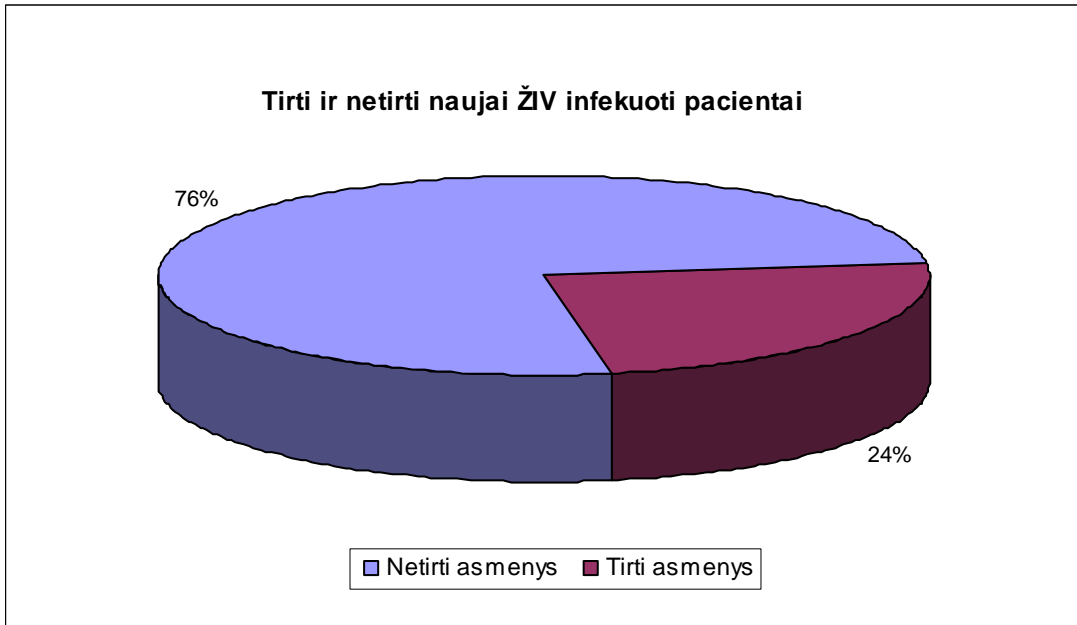
Naudojant "RealTime HIV-1 Amplification Reagent" rinkinį su M2000 sistema atliekamas automatinis nukleino rūgščių skyrimas ir amplifikavimas. „ViroSeq HIV-1 Genotyping system v2.0“ (Celera Diagnostics) reagentų rinkinys ir kai kurios papildomos medžiagos naudojamas bandinių paruošimui sekos nuskaitymui ir analizei 3100-Avant (ABI Prism) genetiniu analizatoriumi. Pirminei duomenų analizei naudojama progama ViroSeq HIV-1 Genotyping System software v2.6.

### **2.3 Tyrimo metodai**

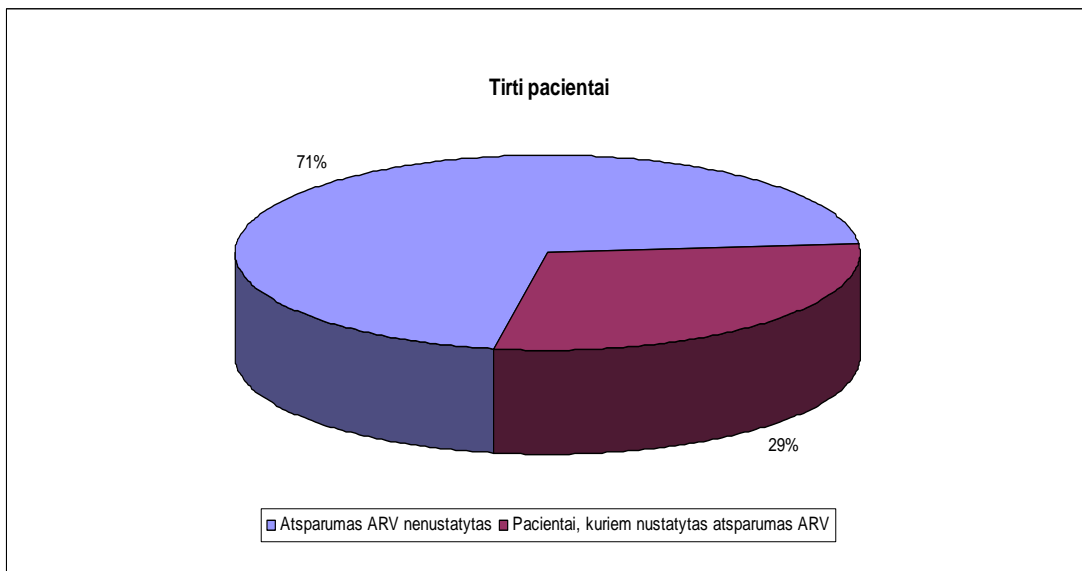
Tyrimas atliekamas remiantis gamintojo instrukcija - ViroSeq HIV-1 Genotyping system v2.0 [19].

### 3. Tyrimų rezultatai

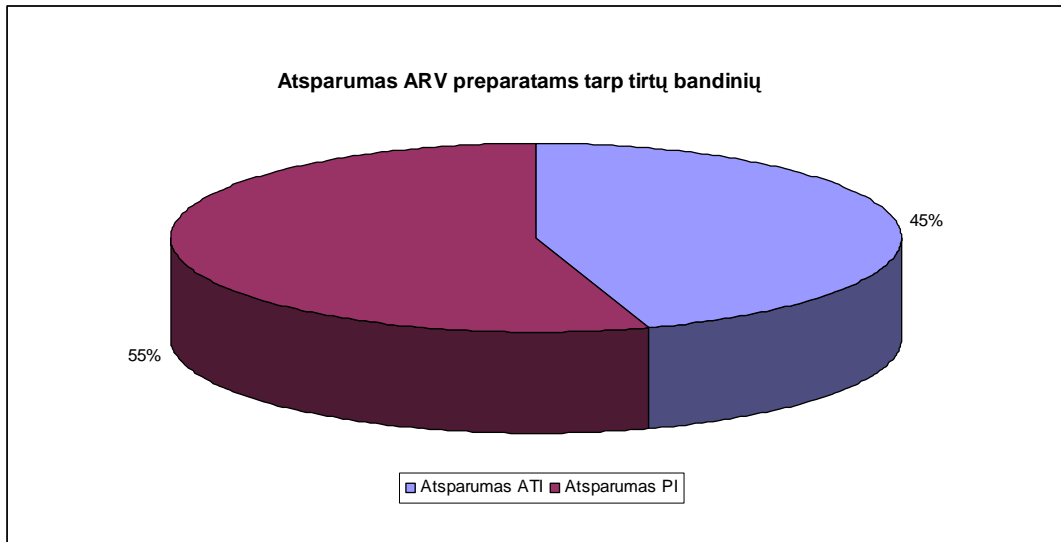
2006, 2007 ir 2008 buvo nustatyti 301 naujai ŽIV infekuotas asmuo. Iš jų ištirti 73.



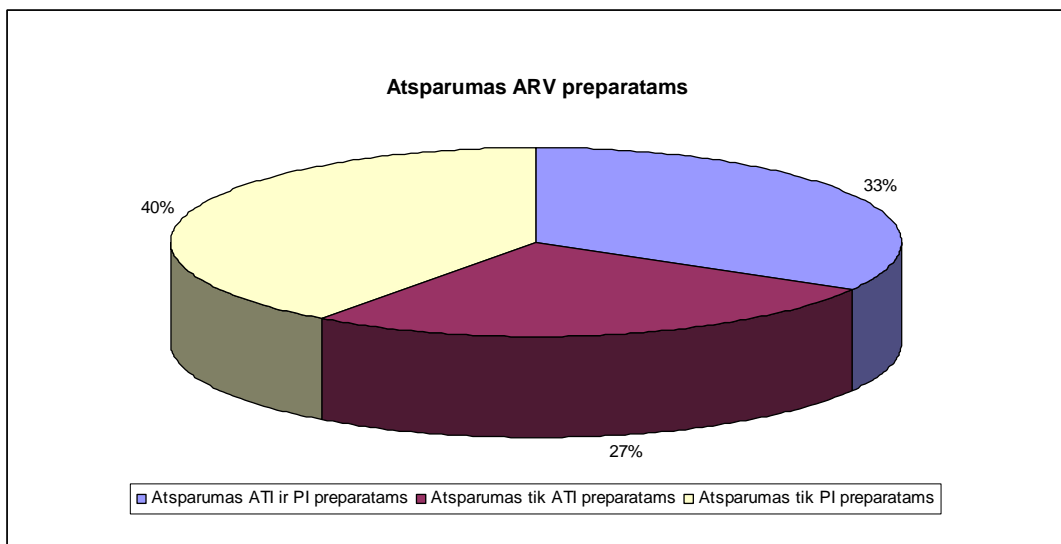
Iš ištirtų 73 bandinių. 30 pacientams nustatytos mutacijos, nulemiančios atsparumą vaistams.



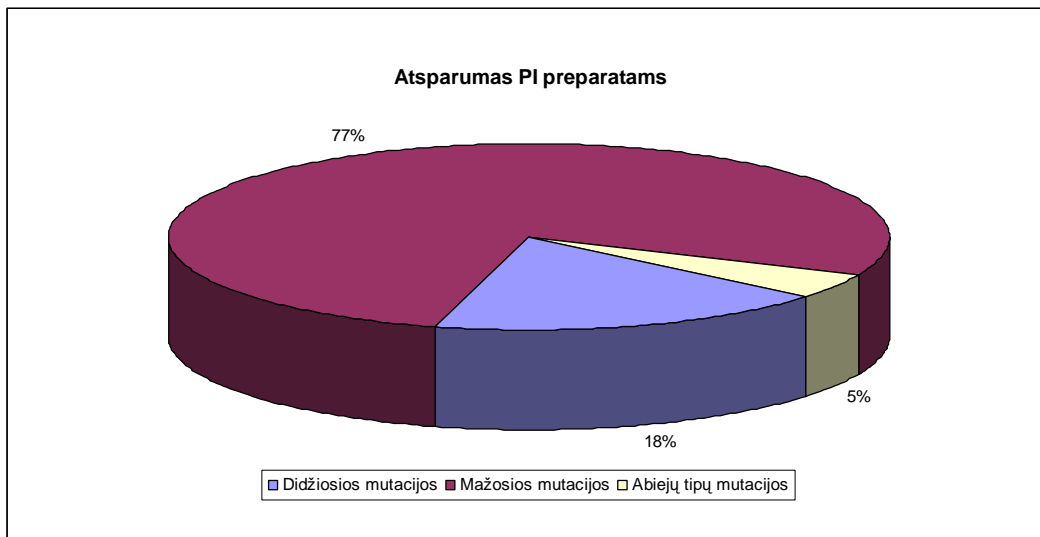
22 nustatytas atsparumas PI preparatams, o 18 bandinių buvo atsparūs ATI.



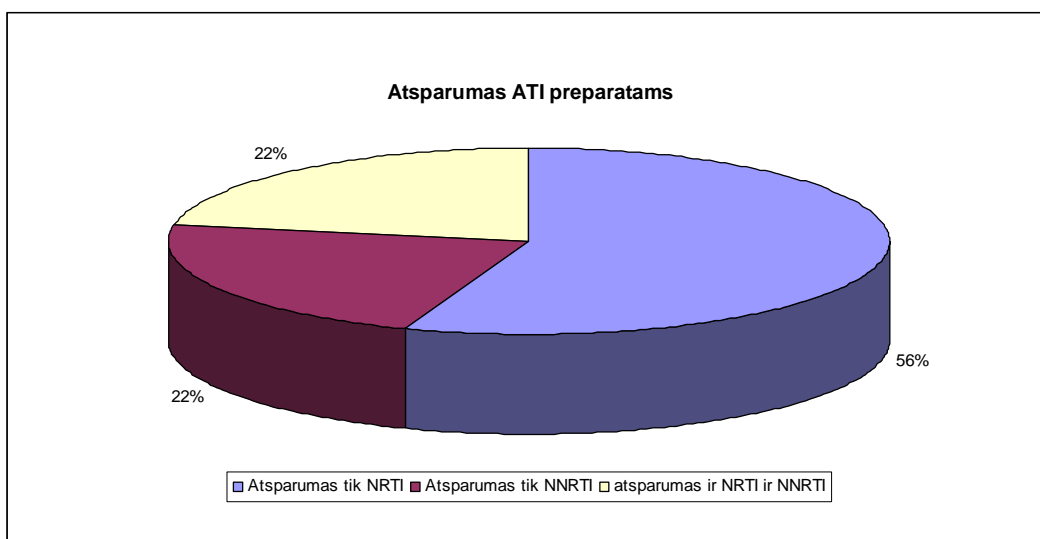
10 pacientų nustatytas atsparumas ir PI ir ATI preparatams, 12 – tik PI, o 8 – tik ATI preparatams.



4 pacientams nustatytos didžiosios mutacijos nulemiančios atsparumą PI preparatams, 17 pacientų nustatytos mažosios atsparumą PI nulemiančios mutacijos. 1 pacientas kuriam nustatytos abiejų tipų mutacijos.



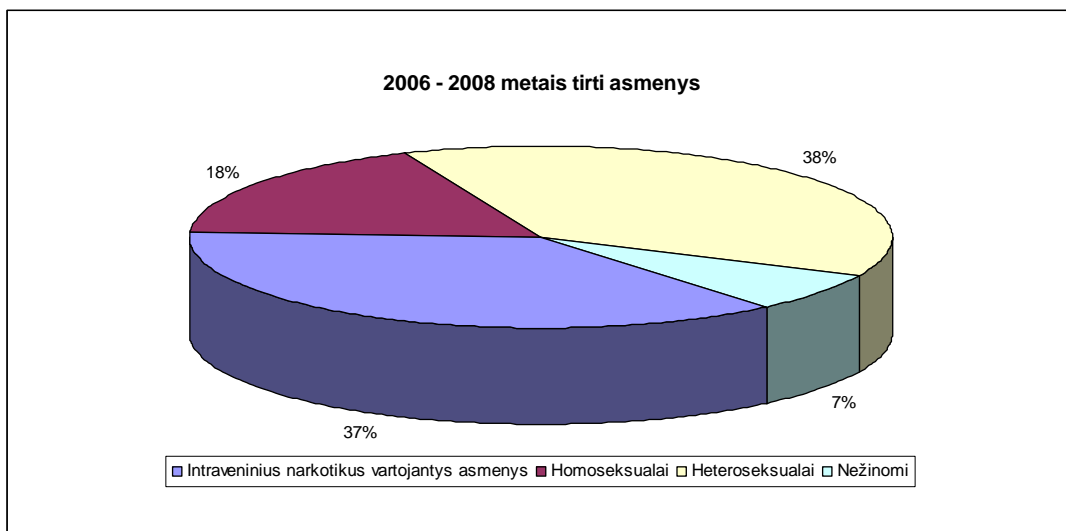
Tik NRTI atsparumas nustatytas 10 pacientams. Tik NNRTI atsparumas nustatytas 4 pacientams. Buvo 4 asmenys kuriems nustatytas atsparumas ir NRTI ir NNRTI preparatams.



Per šiuos tris metus tarp naujai infekuotų asmenų buvo 163 intraveninių narkotikų vartotojai, 22 homoseksualūs, 68 – heteroseksualūs asmenys. 47 – nežinomi.

	2006	2007	2008
<b>Intraveninius narkotikus vartojantys asmenys</b>	62	59	42
<b>Homoseksualai</b>	9	4	9
<b>Heteroseksualai</b>	15	27	26
<b>Nežinomi</b>	14	15	18
<b>Iš viso per metus</b>	<b>100</b>	<b>106</b>	<b>95</b>

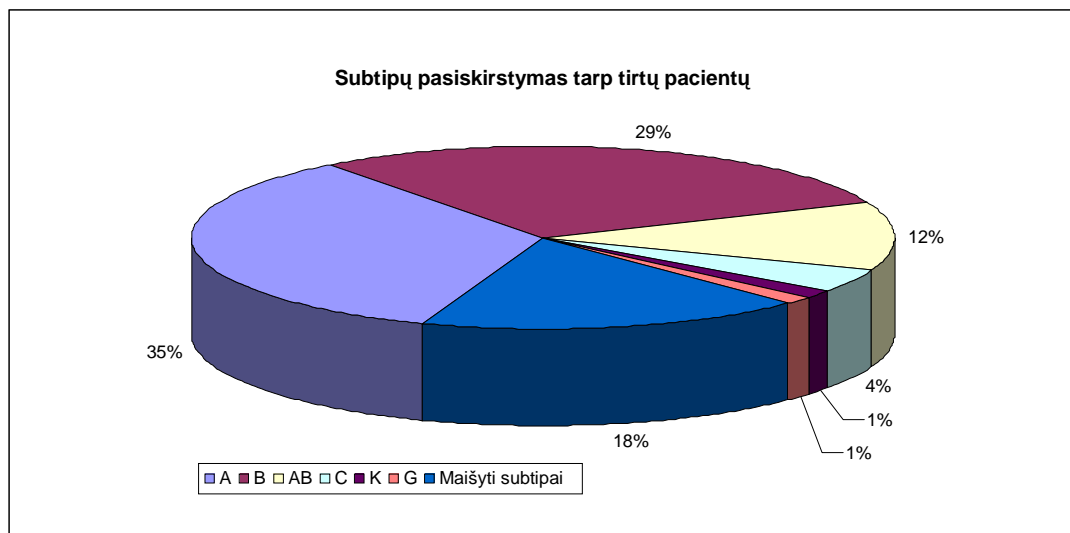
Tarp asmenų kuriems 2006-2008 metais buvo darytas atsparumo antiretrovirusiniams vaistams tyrimas buvo 27 intraveninius narkotikus vartojantys, 13 – homoseksualūs ir 28 – heteroseksualūs asmenys, 5 – nežinomi.



Atsparumo vaistams mutacijų pasiskirstymas tarp skirtingų pacientų grupių

	<i>Atsparumas PI</i>	<i>Atsparumas ATI</i>	<i>Atsparumas PI ir ATI</i>	<i>Atsparumą nulemiančių mutacijų nenustatyta</i>
<b>Intraveninius narkotikus vartojantys asmenys</b>				
<b>Homoseksualai</b>	3	3	1	20
<b>Heteroseksualai</b>	1	2	5	5
<b>Nežinomi</b>	7	3	4	14
<b>Nežinomi</b>	1	0	0	4
<b>Iš viso</b>	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>43</b>

Dauguma pacientų yra A subtipo – 25, B subtipo – 21, AB subtipo – 9, 3 bandiniai yra C subtipo, ir po 1 bandinį priklauso G ir K subtipams. 13 bandinių priklauso maišytiems subtipams (ARF01\_AE ir CRF02\_AG).



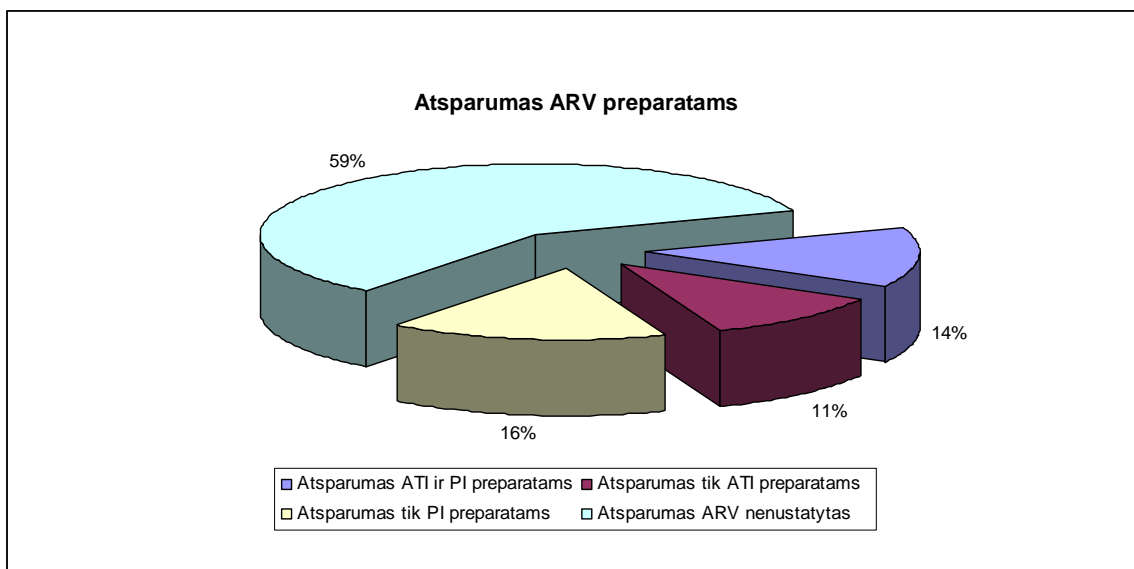
Atsparumo vaistams mutacijų pasiskirstymas tarp skirtingų ŽIV subtipų.

	<i>Atsparumas PI</i>	<i>Atsparumas ATI</i>	<i>Atsparumas PI ir ATI</i>	<i>Atsparumą nulemiančių mutacijų nenustatyta</i>
<b>A</b>	4	3	1	17
<b>B</b>	2	3	8	8
<b>AB</b>	3	0	0	6
<b>C</b>	1	1	0	1
<b>G</b>	1	0	0	0
<b>K</b>	0	0	0	1
<b>CRF01_AE</b>	1	1	1	9
<b>CRF02_AG</b>	0	0	0	1
<b>Iš viso</b>	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>43</b>

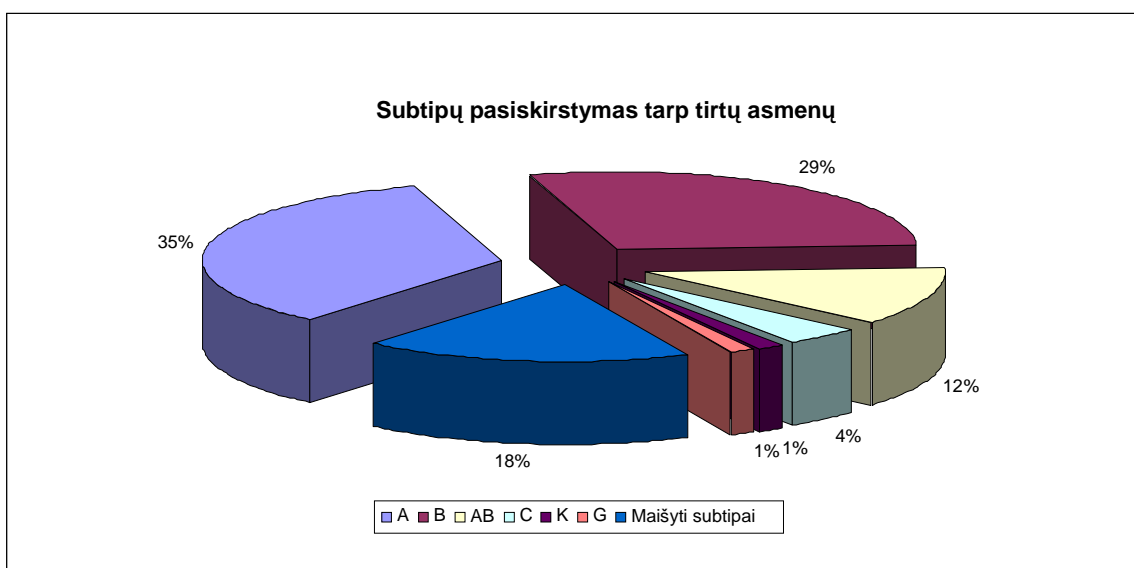


#### 4 Išvados:

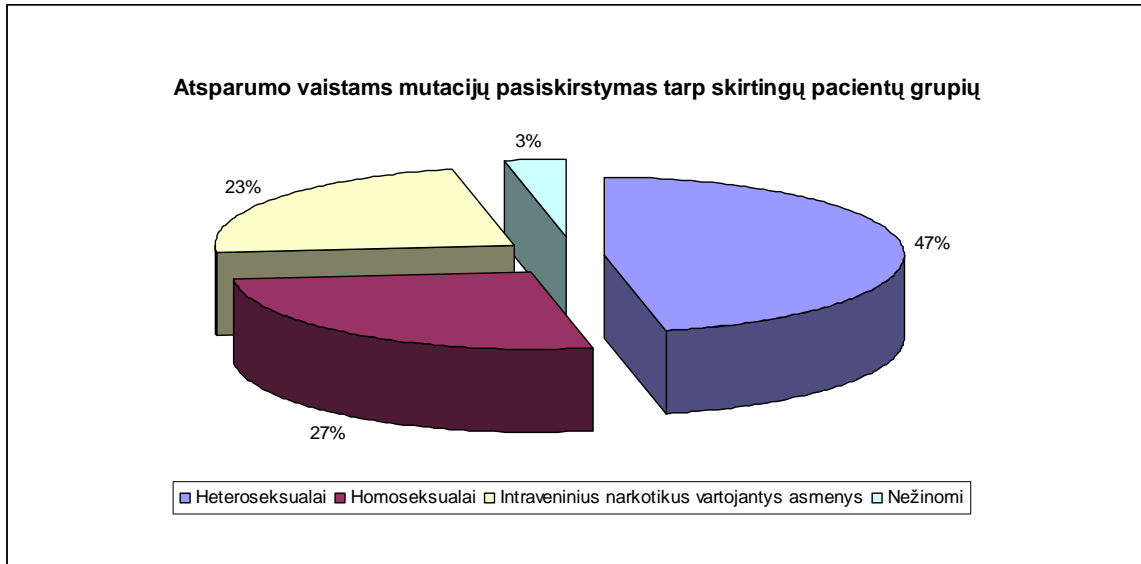
1. 59% visų tirtų asmenų neturėjo atsparumo ARV. 16% buvo atsparūs tik PI preparatams, o mutacijas, lemiančias atsparumą ATI preparatams, turėjo 11%. 14% bandinių nustatytos mutacijos, nulemiančios atsparumą tiek ATI tiek PI preparatams.



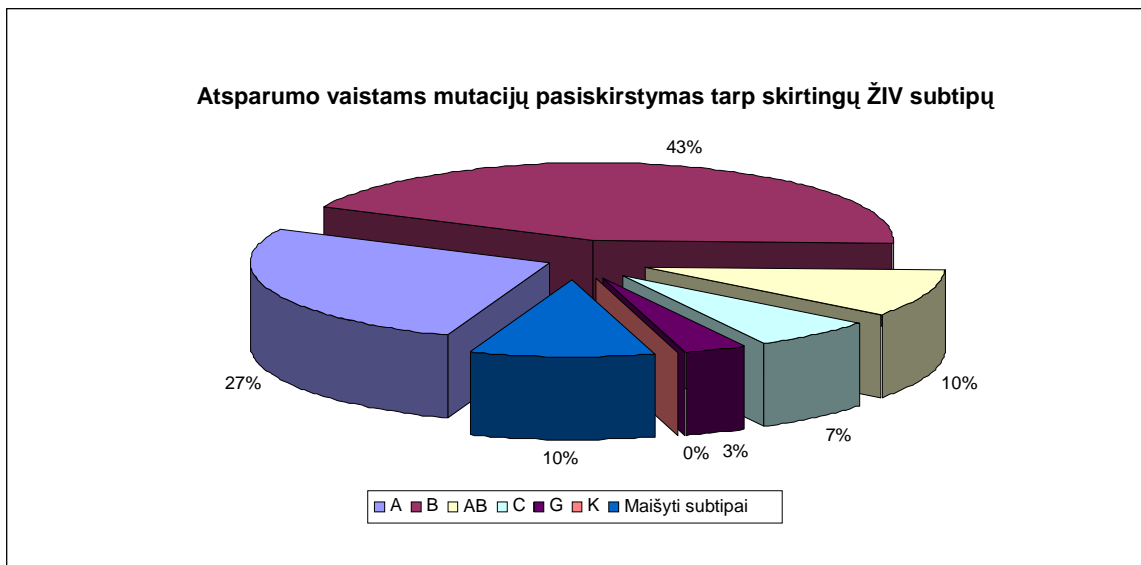
2. 25 pacientai yra A subtipo, B subtipo – 21, AB subtipo – 9, 3 bandiniai yra C subtipo, ir po 1 bandinį priklauso G ir K subtipams. 13 bandinių priklauso maišytiems subtipams (ARF01\_AE ir CRF02\_AG).



3. daugiausiai mutacijų aptikta tarp heteroseksualių pacientų – 14, tarp homoseksualių pacientų – 8, tarp intraveninius narkotikus vartojančių asmenų nustatyti 7 pacientai turintys atsparumą ARV. Vienas nežinomas pacientas taip pat turėjo atsparumą antiretrovirusiniams preparatams.



4. daugiausia mutacijų pastebėta tarp pacientų užsikrėtusių B subtipo virusu – 13. Mažiau mutacijų nustatyta tarp asmenų infekuotų A subtipo virusu – 8. Tarp AB ir maišytų subtipų virusų po 3 mutacijas. C subtipas – 2 mutacijos, G – 1. o K subtipo virusu užsikrėtusiam asmeniui nenustatytos mutacijos.



## SANTRAUKA

Nuo 9-ojo dešimtmečio pabaigos kai buvo pradėti naudoti antiretrovirusiniai vaistai ŽIV pacientų gydymo srityje įvyko didžiulė pažanga. Šiuo metu naudojami vaistai suskirstyti į penkias klases pagal veikimo mechanizmą:

- nukleozidiniai arba nukleotidiniai atvirkštinės transkriptazės inhibitoriai (NATI);
- nenukleozidiniai atvirkštinės transkriptazės inhibitoriai (NNATI);
- proteazių inhibitoriai (PI);
- susijungimo (fuzijos) inhibitoriai (FI);
- integrazių inhibitoriai (II) .

Netgi gydant šiuolaikiniu būdu, kai taikoma kombinuota antiretrovirusinė terapija (ART), viruso organizme visiškai sunaikinti neįmanoma. Tačiau dėl ŽIV infekcijai būdingo ypač dinamiško kintamumo, vystosi atsparumas vaistams. Tai vyksta greičiau negu kitų gydomų infekcijų atvejais. Veikiant evoliucijos principams, dalinio slopinimo sąlygomis vyksta atsparių virusų selekcija, todėl vaistui atsparios padermės greitai tampa dominuojančios. Proceso pasekmės paliečia ir gydomą asmenį, ir visuomenę. Žala asmeniui pasireiškia tuo, kad, tęsiant pradėtą gydymą, viruso krūvis didėja, ir liga progresuoja. Žalą visuomenei apibūdina tai, kad dauginio atsparumo viruso padermės perduodamos kitiems, todėl dar negydytiems pacientams gydymo sėkmės tikimybė sumažėja. Norint išvengti atsparumo viremijos slopinimas turi būti maksimaliai stiprus ir ilgalaikis. Tai galima pasiekti tik skiriant ART derinį, kuris yra efektyvus ir nesudėtingas vartoti.

Dėl šių priežasčių sėkmingas ŽIV pirminio atsparumo antiretrovirusiniams vaistams nustatymas naujai infekuotiems pacientams turi didelės įtakos tolimesniam sėkmingam jų gydymui, bei bendram atsparių štamų paplitimo įvertinimui Lietuvoje.

## SUMMARY

From the end of the 9th decade when the use of antiretroviral drugs was initiated in the treatment of HIV patients it lead to the enormous progress. Currently used drugs are divided into five classes according to the mechanism of action:

- nucleoside/ nucleotide reverse transcriptase inhibitors (NRTIs);
- non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNATI);
- protease inhibitors (PI);
- fusion inhibitors (FI);
- integrase inhibitors (II).

Even in the treatment of modern method of application of combined antiretroviral therapy (ART), a virus can not be completely destroyed. However, for HIV infection in particular, the dynamic inherent variability develops resistance to drugs. This is happening more quickly than in other treated infection cases. The operation principles of evolution, in partial inhibition, drug-resistant virus strains are selected and rapidly become dominant. Damage to a person is that following the initiated treatment the viral load increases and the disease progresses. Damage to the public is that the multiple resistance virus strains are transmitted to others, so untreated patients decreases the likelihood of treatment success. To avoid resistance, viremia suppression should be the most potent and long-term. This can be achieved only through the combination of ART, which is efficient and easy to use.

For these reasons, the initial success of HIV resistance to antiretroviral drugs in a new infected patients have a significant impact on the future success of their treatment, and the overall assessment of the prevalence of resistant strains in Lithuania.

## Literatūra:

1. Hoffmann, Ch.; Rockstroh, K. J.; Kamps, S. B. *HIV Medicine* 2007. 2007. ISBN: 3-924774-59-5
2. Centers for Disease Control and Prevention [interaktyvus]. [žiūrėta 2009m balandis 21d]. Prieiga per internetą <<http://www.cdc.gov/hiv/topics/basic/index.htm>>
3. Gallo, R. C.; Montagnier, L. The Discovery of HIV as the Cause of AIDS. *The New England Journal of Medicine*. 2003. Nr. 349. 2283 – 2285.
4. Gorobecas, A. Čaplinskas, S. Griškevičius, A. ŽIV infekcijos atsparumas vaistams. *Lietuvos bendrosios praktikos gydytojas*. 2003, VII tomas, Nr 11. 755 – 761.
5. Bakienė, E. *Virusologijos pagrindai*. [CD-ROM]. Kaunas, 2008. ISBN 978-9955-25-460-7
6. Human Immunodeficiency Virus and HIV Disease [interaktyvus]. [žiūrėta 2008m spalio 11d]. Prieiga per internetą <<http://uhaweb.hartford.edu/bugl/hiv.htm>>
7. The Molecules of HIV - A Hypertextbook [interaktyvus]. [žiūrėta 2008m spalio 11d]. Prieiga per internetą <<http://www.mcl.d.co.uk/hiv/?q=HIV%20genome>>
8. Clacel, F.; Hance, A. HIV Drug Resistance. *The New England Journal of Medicine*. 2004. Nr. 350. 1023-1035.
9. ŽIV antiretrovirusinė terapija ir oportunistinių infekcijų profilaktika [interaktyvus]. [žiūrėta 2009m spalio 11d]. Prieiga per internetą <<http://www.medicine.lt/index.php?pagrid=1eidiniai&strid=6507&subid=gm>>
10. Lietuvos AIDS centras prie LR sveikatos apsaugos ministerijos [interaktyvus]. [žiūrėta 2008m sausio 20d]. Prieiga per internetą <<http://www.aids.lt/>>
11. ŽIV/AIDS plitimo būdai, laboratorinė diagnostika [interaktyvus]. [žiūrėta 2009m kovo 20d]. Prieiga per internetą <[http://www.jppc.lt/?\\_nm\\_mid=TIN3ekxERXNOQ3d3&\\_nm\\_lid=0&session=no](http://www.jppc.lt/?_nm_mid=TIN3ekxERXNOQ3d3&_nm_lid=0&session=no)>
12. Wikipedia The Free Encyclopedia [interaktyvus]. [žiūrėta 2009m gegužės 2d]. Prieiga per internetą <[http://en.wikipedia.org/wiki/Integrase\\_inhibitor](http://en.wikipedia.org/wiki/Integrase_inhibitor)>
13. Averting HIV and AIDS [interaktyvus]. [žiūrėta 2009m gegužės 2d]. Prieiga per internetą <<http://www.avert.org/treatment.htm>>

14. Integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) doubles HIV suppression in treatment-experienced patients at 16 weeks [interaktyvus]. [žiūrėta 2009m gegužės 2d]. Prieiga per internetą <<http://www.aidsmap.com/en/news/D8457D0C-2A61-4436-B416-B9627821E50C.asp>>
15. Zuckerman, A. J.; Banatvala, J. E.; Pattison, J. R. Principles and practice of clinical virology. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. 1987. ISBN: 0-471-90341-8
16. Hammer, S. M. et al. Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection. The Journal of the American Medical Association. 2008. Nr. 300. 555 – 567.
17. Ledergerber, B. et al. AIDS-Related Opportunistic Illnesses Occurring After Initiation of Potent Antiretroviral Therapy. The Journal of the American Medical Association. 1999. Nr. 282. 2220 – 2225.
18. Skolnik, R. P. HIV Therapy – What Do We Know, and When Do We Know It? . HIV Drug Resistance. The New England Journal of Medicine. 2009. Nr. 349. 2351 -2352.
19. Rinkinio teikėjas „Celera Diagnostics ”, JAV. Reagentų aprašas
20. Balfour, H. H. Antiviral drugs. The New England Journal of Medicine. 1999. Nr. 340. 1255 – 1266.
21. Stebbing, J.; Gazzard, B.; Douek, D. C. Where Does HIV Live? 2004. Nr. 350. 1872 – 1877.

## **Padėka**

Dėkoju Algirdui Griškevičiui ir Aleksandrui Gorobecui už vertingus patarimus, pastabas ir komentarus rašant šį darbą. Taip pat visiems AIDS centro laboratorijos darbuotojams už šiltą priėmimą ir paramą.