

ANTİRETROVİRAL TEDAVİ: DİRENCİN MOLEKÜLER TANISI VE KLİNİK YANSIMALARI

Kenan MİDİLLİ

İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL
kmidilli@gmail.com

ÖZET

Antiretroviral tedavinin (ART) giderek daha erişilebilir hale gelmesi ve tedavi seçeneklerinin artması ile birlikte kaynakları kısıtlı ülkelerde bile HIV ile infekte kişilerin önemli bir kısmının tedavi alması olanaklı hale gelmiştir. Bu durum direnç gelişimi ve yayılımını arttırdığından tedavi rejimlerinin daha dikkatli bir biçimde düzenlenmesini gerektirmektedir. Antiretroviral direnç testlerinin klinik ve farmakoeconomik etkinlikleri daha önce yapılmış olan çalışmalara kanıtlanmıştır. Bu yazıda, direnç testleri ile birlikte direncin kaynağı ve klinik yansımaları ele alınmıştır.

Anahtar sözcükler: antiretroviral direnç

SUMMARY

Antiretroviral Therapy: The Molecular Diagnosis of Antiretroviral Resistance and Its Clinical Implications

With the wider accessibility of antiretroviral therapy (ART) and the increasing options of ART regimens, even in countries with limited resources, the number of HIV infected persons receiving ART is also increasing. The increase in development and spread of antiretroviral resistance in these circumstances necessitates more carefully designed ART regimens. The clinical and pharmacoeconomical effectiveness of ARV resistance tests have been proven by previous studies. Herein along with the resistance tests, the source and clinical implications of the antiretroviral resistance are reviewed.

Keywords: antiretroviral resistance

Antiretroviral (ARV) ilaç direnci HIV'in replikasyonunu baskılayabilmek için kullanılmakta olan ARV'nin konsantrasyonunun dirençli olmayan suşlara kıyasla artırılması gereksinimi şeklinde tanımlanabilir. Virüslerin ilaçlara duyarlılığı virüsün in vitro koşullarda replikasyonunu % 50 ya da % 90 oranında baskılayabilen ilaç konsantrasyonu şeklinde ifade edilir. Duyarlılığı azalan (kısmi duyarlı) bir virüsün çoğalması ilaç konsantrasyonu yükseltilecek baskı altına alınabilir. IC₅₀ değeri referans virüsün IC₅₀'sine bölünerek test edilen virüsün IC₅₀'sinin referans virüsüne oranla kaç katı olduğu belirlenir ve bu değer sınır değer ile kıyaslanır. Sınır değer virüsün baskılanması ya da duyarlı olarak sınıflandırılabilmesi için virüsün IC₅₀ değerinin kaç kat artırılması gerektiğini gösterir. Bu nedenle antivirallere direnç süreklilik arz eden bir durumdur. Ancak ko-reseptör antagonistlerinde durum farklıdır ve bunlara karşı direnç ilaç kullanımı ile virüsün maksimum

inhibisyonunda azalma şeklinde değil IC₅₀ değerinde kaymalar şeklindedir^(1,5).

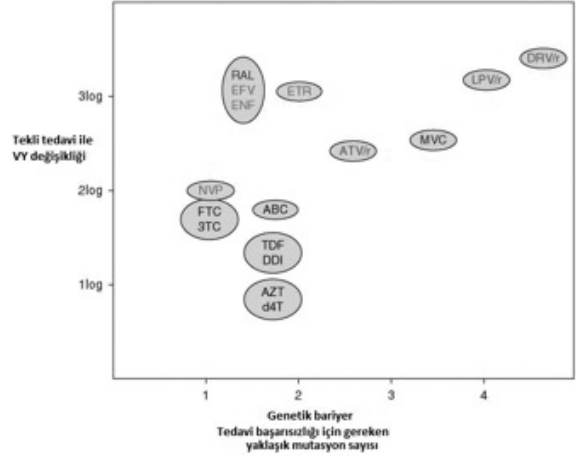
Genotipik direnç testleri direnç ile ilişkili mutasyonların saptanmasına dayanır. Bunun için HIV genomunun ilgili bölgeleri (Proteaz inhibitörü-PI için proteaz gen bölgesinin tamamı; Non nükleozid revers transkriptaz inhibitörü-NNRTI'ler ve Nükleozid revers transkriptaz inhibitörü-NRTI'ler için revers-transkriptaz gen bölgesinin ilk 240 aminoasitlik kısmını kapsayan bölge; integraz inhibitörleri direnci için integraz geninin integraz inhibitörlerine direnç ile ilişkili mutasyonlarının bulunduğu bölge, 50-160. aminoasitler ve füzyon inhibitörleri için GP41 geni, HR1 bölgesinin 35-45. aminoasitlerini kapsayan kısmı) revers transkripsiyon sonrası polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işlemi ile çoğaltılırlar. Elde edilen ürünlerinin dizi analizi ne dayanarak daha önceden direnç ile ilişkilendirilmiş mutasyonlar belirlenir. Dizi analizi ile genotipik ARV direnç testi için kullanıma sunul-

muş ticari kitler sınırlı sayıdadır. Bunların yanı sıra laboratuvarlarda tasarlanmış testler de direnç analizi için kullanılmaktadır. Ticari kitler sonuçların yorumlanması için üreticilerinin geliştirdikleri veri tabanlarını içermektedir. Laboratuvarlarda tasarlanmış testler ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde ise çoğunlukla açık erişimli web sitelerinde bulunan değerlendirme programları kullanılmaktadır. Bu değerlendirme programları sonuçların yorumlanmasında farklı algoritmalarından (kurala dayalı, uzman görüşüne dayalı, yapay zekaya dayalı) yararlanmaktadır. Hasta bazında elde edilen direnç sonuçları bu veri tabanlarındaki veriler ile karşılaştırılarak test edilen virüsün direnç durumu ve ilaçlara özgü IC_{50} değerleri tahmin edilmektedir. Genotipik testlerin üstünlükleri görece hızlı sonuç vermeleri, özel güvenlik önlemleri gerektirmemeleri, tüm nükleotid değişimlerinin izlenmesine ve HIV-1 alt tiplerinin belirlenmesine olanak vermeleri şeklinde sıralanabilir. Dezavantajları ise direncin dolaylı olarak ölçülmesi, virüs topluluğu içinde ancak % 20-30'un üzerinde bir orana sahip mutantların saptanmasına olanak tanınması, değerlendirme algoritmalarına girmemiş yeni mutasyonlarının yorumlanamaması dolayısı ile veri tabanlarının devamlı güncellenmesinin gerekliliği ve karmaşık direnç kalıplarının yorumlanmasında karşılaşılan güçlükler olarak özetlenebilir. Direnç testleri ile ilgili giderek daha nadir olmakla birlikte karşılaşılan bir diğer sorun da değerlendirme programları arasındaki uyumsuzluklardır^(1,2,5).

ARV direnç gelişme olasılığı uygulanan tedavinin gücü ve tedavi altında iken virüsün replikasyonunun ne derece de devam ettiği ile bağlantılıdır. Antiviral etki gücü düşük bir tedavide replikasyon devam etse bile tedavinin seçtirici baskısı da düşük olacak ve dolayısı ile virüsün evrimi de yavaş olacaktır. Virüsü tam olarak baskılayamayacak daha güçlü bir tedavi ise daha fazla seçtirici baskıya sahip olacağından direnç ile ilişkili mutasyonlar hızla birikebilecektir. Yüksek derecede etkili bir tedavi ise seçtirici baskısı çok yüksek olsa bile virüsün replikasyonunu çok iyi baskılayacağı için direnç gelişimini yavaşlatacağıdır⁽⁴⁾.

Genetik bariyer direnç gelişimi için gerekli mutasyon sayısının bir yansımasıdır. Düşük gene-

tik bariyere sahip ilaçlar kendilerine karşı bir mutasyonla bile direnç gelişen ilaçlardır (NRTI: Lamivudin, emtrisitabin; NNRTI: Nevirapin, efavirenz, delavirdin; füzyon inhibitörü: enfuvirtid)⁽⁴⁾.



Şekil. Antiretroviral ajanlar ve genetik bariyer⁽⁵⁾.

Orta derecede bariyere sahip ilaçlar: integraz inhibitörleri, 2. kuşak NNRTI olan etravirin ve NRTI'lerden didanozin, tenafovir ve abakavir.

Yüksek genetik bariyere sahip ilaçlar: ritonavir ile güçlendirilmiş PI'lar ve NRTI'lerden zidovudin ve stavudin^(4,5).

HIV virüsünün çok değişken olması ve yüksek evrim hızı hem tip-B hem tip-B dışı HIV-1 kökenlerinde direnç gelişimini kolaylaştırmaktadır ve uygun tedavi uygulanmasına rağmen direnç gelişimi ve tedavi başarısızlıkları meydana gelmektedir. Her bir viral varyant farklı replikasyon kapasitesi ve "fitness"a sahiptir. Tedavi görmemiş kişilerdeki varyantlar ilaçsız ortamlarda daha iyi replike olduğundan baskın hale gelirler. Suboptimal tedavi ile birlikte yabancı varyantların replikasyonu ilaç ile baskılanırken ilaç varlığında daha iyi replike olabilen varyantlar seçilebilir. Mutantların tedavi sırasındaki seçilimi virüsün ilaç varlığındaki replikasyon düzeyi ve elde ettiği "fitness" avantajı ile paralellik gösterir⁽⁴⁾.

İnfekte bir kişide enfeksiyonun herhangi bir noktasında virüs popülasyonu heterojen kökenlerin bir karışımı halinde "quasispecies" olarak bulunmaktadır. Farklı genotipik ve feno-

Tablo 1. HIV virüsünün değişkenliği^(3,4,6).

Günlük:	10^9 - 10^{12} yeni viryon oluşumu
	10^3 - 10^4 Mutasyon/replikasyon döngüsü
	3-4 Rekombinasyon/replikasyon döngüsü

tipik özelliklere sahip olan bu kökenler birbirleri ile yarış halindedirler. Bunlar içinde en iyi adapte olan ve en yüksek "fitness"a sahip olan köken zaman içerisinde baskın hale gelmektedir. Yüksek viral "turn-over" ve mutasyon hızından dolayı farklılaşan bu kökenlerden hızla dirençli varyantlar türemektedir. Tedavi altında iken ortaya çıkan kaçak mutantlar selektif avantajdan yararlanarak baskın hale gelerek virüs yükünde artışa dolayısı ile tedavi başarısızlığına yol açarlar⁽¹⁾.

Baskın hale gelen bu dirençli yeni popülasyonun yeni bir tedavi düzenlemesi ile ortadan kaldırılması o kadar kolay olamayabilir. Bu kökenlere karşı varsa tam ya da tama yakın düzeyde etkili olacak yeni ilaç seçeneklerinin belirlenmesinde yararlanmak üzere ilaç direnç analizleri yol gösterici olabilmektedir. Farmakoekonomik çalışmalarda ilaç direnç testlerinin hem daha iyi tedavi stratejilerinin oluşturulması hem de tedavi maliyetleri açısından yararlı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle güncel HIV kılavuzlarında hem tedavi öncesinde (ilk tanı konduğu sırada) hem de tedavi sonrasında (virolojik başarısızlıklarda) testlerin uygulaması

önerilmektedir. Batıdaki HIV tipinin B olmasından dolayı tedavi stratejileri ve direnç testlerini yorumlama algoritmaları, B tipi ile ilgili bilgilere dayanmaktadır. Bu nedenle uyumsuzluklar sürmektedir. Oysa B tipi, tüm HIV-1 enfeksiyonlarının % 10'unu oluşturmaktadır ve B dışı HIV genotipleri artış eğilimindedir^(3,4,6).

HIV alt tiplerinin NNRTI, NRTI ve PI sınıfı ilaçlara karşı direnç tipleri ve düzeyleri farklılık gösterir. Örneğin B ve G alt tiplerinde nelfinavir direnci yaygındır. C ve F subtiplerine kıyasla CRF02_AG nelfinavir ve ritonavire daha duyarlıdır. G alt tipi ise tenofovir ve lopinavire daha duyarlıdır. Buna karşın C alt tipi tenofovir hızla direnç geliştirir⁽⁴⁾.

Proteaz geninin 20 ve 36. pozisyonlarındaki polimorfizmler A, C, G ve F alt tiplerinde tipranavir direncine karşı genetik bariyeri düşürürken C alt tipinde revers transkriptazın 64 ve 65. pozisyonlarındaki polimorfizmler K65R gelişimini hızlandırır⁽⁴⁾.

Proteaz genindeki yüksek derecedeki polimorfizmlerden dolayı B dışındaki alt tipler ile enfekte naif hastalarda belli bir düzeyde PI direnci olduğu kabul edilir. Bu polimorfizmlerin

Tablo 2. HIV tedavisinde kullanılan antiretroviral ajanlar^(3,4,6).

İlaç sınıfı	Etki mekanizması	Direnç mekanizması
NRTI ya da NtRTI (nükleozid ya da nükleotid revers transkriptaz inhibitörleri)	Zincir sonlandırıcıdır. 3' hidroksil gruplarının olmamasından dolayı uzamakta olan DNA zincirine girdiklerinde kendilerine yeni bir nükleotid eklenemez.	Nükleotidlerin eklenmesi bozulur: M184V, K65R ve Q151M kompleksi seçici olarak viral RT'nin nükleotid analoglarını yeni DNA molekülüne eklemeye yeteneğini azaltırlar. Nükleotidlerin DNA zincirinden çıkartılması: TAM'lar ATP'nin RT'ye nükleozid analogunun sokulması ile sonlanmış olan DNA zincininin 3' ucuna yakın bir yerden bağlanmasına olanak verirler ve bağlanan ATP, nükleozid analogunu viral DNA'dan ayırır. Böylelikle revers transkripsiyon işlemi kaldığı yerden devam eder.
NNRTI (non-nükleozid revers transkriptaz inhibitörleri)	RT enziminin katalitik bölgesine yakın bir yerdeki hidrofobik cebe yüksek affinite gösterirler. Bu cebe bağlandıklarında enzimin esnekliği bozarlar ve RT DNA sentezleyemez hale gelir.	Direnç mutasyonlarının çoğu inhibitörlerin bağlanma bölgesi içinde yer alır. Az sayıdaki mutasyonsa inhibitörle doğrudan temas halindeki amino asitlerin pozisyon ya da yönünde değişikliğe yol açar. Etravirin (ETV), konformasyonel izomerizm gösteren bir diarilprimidindir ve RT enzime değişik konformasyonlarda bağlanabilme özelliği, bazı direnç mutasyonlarının (K103N) varlığında bile RT enzimine bağlanmasına olanak verir.
PI (Proteaz inhibitörleri)	PI'leri HIV proteaz enziminin doğal viral substratlarını taklit eder ve enzimin aktif kısmına bağlanmada doğal substratlarla yarışa girer.	İnhibitörlerle doğrudan temas halindeki amino asitlerdeki mutasyonlar ya da enzimin oluşumunun genel yapısında değişikliğe yol açan amino asit değişiklikleri, inhibitörlerin enzimin oyuğa uyumunu bozarak dirence yol açar.
InSTI (integraz inhibitörleri)	Raltegravir ve Elvitegravir, integrazın katalitik çekirdekindeki katyonlara (Mg++) bağlanarak integraz ile konak DNA'sı arasında kovalent bağ oluşumunu engeller.	Katalitik çekirdekdeki katyonlara bağlanan bölgelerdeki mutasyonlar direnç gelişimi ile ilişkilidir. Çapraz direnç son derece yaygındır.
Füzyon inhibitörleri (Enfuvirtid)	Enfuvirtid, 36 merlik bir sentetik oligopeptidtir ve trimerik HR-1 kompleksine bağlanarak, HR-1 ve HR-2 birleşmesini ve böylelikle füzyonu engeller.	Gp41'in HR1 bölgesinin 36-38 ve 39-45. pozisyonlarında korunmuş olan amino asit üçlülerindeki değişiklikler enfuvirtidin bağlanmasını engeller.
Ko-reseptör antagonistleri	CCR5 antagonistlerinin bağlanması, CCR5 reseptörünün üç boyutlu yapısında değişikliğe yol açar ve gp120, CCR5'e bağlanamaz.	Dirençli virüsler (V3 halkasındaki mutasyonlar), CCR5 antagonistlerinin CCR5 reseptörlerinde oluşumuna yol açtıkları üç boyutlu yapı değişikliklerini tanıyabilme yeteneği kazanırlar.

dışında suboptimal tedavi ve tedaviye erişim konusundaki aksaklıklar da direnç gelişimini çabuklaştırır^(4,6).

Günümüzde kullanılmakta olan anti-retroviral ilaçlar altı sınıfta yer almaktadır (Tablo 2). B dışı alttıplerde B tipinde direnç ile ilişkili bulunan bazı mutasyonların bulunduğu pozisyonlarda alt tiplere özgü nükleotid değişiklikleri bulunabilmektedir. Bu tarz polimorfizmler;

1. İlaça dirençli varyantların ortaya çıkışını hızlandırabilirler.
2. Direnç gelişim yol izini değiştirebilir ya da alternatif direnç yol izlerinin ortaya çıkmasına yol açabilir.
3. Replikasyon kapasitesini değiştirebilir.
4. Genetik direnç analiz sonuçlarının yorumlanmasını güçleştirebilir.
5. İlacın hem bağlanma hem de afinitesini değiştirebilir^(3,4,6).

Belli direnç mutasyonlarının ortaya çıkması virüsün interensek özelliklerinin yanı sıra virüsün maruz kaldığı ilaç baskısına bağlı olarak değişmektedir. Bu durumda etkili olan faktörler:

1. Kodon kullanım farklılıkları: Farklı ilaç sınıfları direnç gelişmesi için gerekli olan transisyon ve transversiyonların sayısı, dirence karşı genetik bariyer üzerinde etkili olabileceği ve farklı HIV proteinlerindeki mutasyonların ortaya çıkışındaki farklılıklarla da gösterilmektedir.
2. Alt tipler arasında minör yapısal değişikliklere yol açan aminoasit farklılıkları ilacın hedefinde değişikliklerle sonuçlanmaktadır. Örneğin aynı ilaç baskısı altında farklı mutasyonlar ortaya çıkabilmektedir.
3. Alt tipler arasında belli aminoasit dizilimleri ilaç direnci ile ilişkili nükleotid değişimlerini kolaylaştırabilmektedir.

Tedavi uyumsuzluğu ve direnç gelişimi arasındaki ilişki ARV ilaç sınıfları arasında farklılık gösterir. Sıkı bir tedavi uyumunda NNRTI'lara direnç gelişimi nadirdir. NNRTI'ların viral fitness üzerine etkileri zayıf olduğundan düşük ya da orta düzeyde NNRTI direnci varlığında hızla yüksek düzeyde direnç gelişir. Tekli PI kullanımı sırasında rezidüel viral replikasyon

devam ettiği için tedavi uyum düzeyi yüksek olsa bile direnç gelişebilir. Ancak PI direnci ile ilişkili mutasyonların 'viral fitness'ı olumsuz etkilemelerinden dolayı tedavi uyumsuzluklarına rağmen direnç gelişimi yaygın değildir. Ritonavir ile güçlendirilmiş PI'lara direnç ancak belli bir tedavi uyum düzeyinde mümkündür. Direnç gelişimi için ilaç düzeyinin mutantların seçimini sağlayacak fakat rezidüel replikasyonun da devam etmesine izin verecek düzeyde olması gerekmektedir^(3,6).

Direnç gelişimine bağlı virolojik başarısızlık giderek artan bir şekilde uygulanacak yeni tedavi rejimlerinin etkililik sürelerinde kısalma ve ileride ortaya çıkabilecek her yeni virolojik başarısızlıkta daha fazla direnç mutasyonu birikimi ile sonuçlanacaktır. Böyle bir kısır döngü içerisine giren hastaların sonu genellikle tüm ilaç sınıflarına karşı direnç gelişimidir^(4,6).

Bir ilaca karşı direnç kazandıran belli mutasyonlar bir başka ilaca karşı ise artan duyarlılığa yol açabilir. Örneğin proteazda I50L değişimi atazanavire karşı direnç gelişimine yol açarken tipranavir ve diğer PI'lara karşı duyarlılığı artırır.

Bazı çalışmalarda ilk antiretroviral tedaviye direnç geliştiren hastalarda ölüm riskinin iki kat arttığı gösterilmiştir. İlginç bir şekilde NNRTI'lara karşı direnç gelişimi ölüm riskini daha da fazla (üç kat) arttırmaktadır. Tedavi sırasında direnç gelişimi hem dirençli suşlara bağlı primer infeksiyonların yayılımını hem de dirençli süperinfeksiyonların da ortaya çıkışını arttırmaktadır^(4,6).

HIV infeksiyonlarının uygun bir şekilde tedavi edilmesinin önündeki en büyük engellerden birisi olan antiretroviral ilaç direncinin belirlenmesi antiretroviral tedavinin başarısının yanı sıra primer direncin yayılımının önlenmesi açısından son derece önemlidir. Viral yük düzeyleri belli aralıklarla izlenerek virolojik başarısızlık şüphesi durumlarında antiretroviral direnç paternlerinin belirlenmesi daha etkili tedavi rejimlerinin belirlenmesini ve hastaya ileride uygulanabilecek tedavilerin başarı şansını olumlu yönde etkileyecektir.

KAYNAKLAR

1. Braun P and Wolf E. HIV resistance and viral tropism testing, "Hoffmann C Rockstroh JK (eds). HIV 2012/2013" kitabında s.302-23, Medizin Fokus Verlag, Hamburg (2012).
2. Johnson VA, Calvez V, Günthard HF et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1, *Topics in Antiviral Medicine* 2013;21(1):6-14.
3. Paredes R, Clotet B. Clinical management of HIV-1 resistance, *Antiviral Res* 2010;85(1):245-65.
4. Santoro MM, Perno CF. HIV-1 genetic variability and clinical implications, *ISRN Microbiol* 2013; 481314.
5. Tang Mw, Shafer RW. HIV-1 antiretroviral resistance, *Drugs* 2012;72(9):e1-25.
6. Wainberg MA, Brenner BG. The impact of HIV genetic polymorphisms and subtype differences on the occurrence of resistance to antiretroviral drugs, *Mol Biol Int* 2012;256982. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/256982>.