

LAMİVUDİN TEDAVİSİ ALAN KRONİK HEPATİT B OLGULARINDA INNO-LİPA HBV DR YÖNTEMİ İLE SAPTANAN YMDD MOTİF DEĞİŞİKLİKLERİ

YMDD MOTIF VARIANTS DETECTED BY INNO-LIPA HBV DR ASSAY IN CHRONIC HEPATITIS B PATIENTS DURING LAMIVUDINE THERAPY

Uğur ARSLAN¹, Onur URAL², Duygu FINDIK¹

¹ Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya. (duygufin@yahoo.com)

² Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Bakterioloji Anabilim Dalı, Konya.

ÖZET

Lamivudin direncinin, hepatit B virusu (HBV) polimeraz enziminin katalitik parçası olan revers transkriptazın rt203-206. kodonlarının (tirozin, metiyonin, aspartat, aspartat) yer aldığı YMDD motifinde oluşan mutasyonlar sonucu geliştiği bilinmektedir. Bu çalışmada, lamivudin tedavisi sırasında viral polimeraz gen mutasyonuna bağlı ilaç direnci geliştiği düşünülen kronik HBV hastalarının YMDD motifinde oluşan değişikliklerinin irdelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya lamivudin tedavisi alan 20 olgu dahil edilmiş, olgulara ait serum örneklerinden HBV-DNA'nın eldesi için ekstraksiyon kiti (Invisorb, Instant Spin DNA/RNA Virus Mini Kit, Germany) kullanılmıştır. Olguların HBV-DNA örneklerinde viral polimeraz gen bölgesindeki YMDD motif değişiklikleri, Inno-Lipa (INNO-LIPA HBV DR; INNOGENETICS N.V., Ghent, Belgium) yöntemi ile incelenmiş ve kolorimetrik olarak değerlendirilmiştir. Çalışmaya alınan 20 olguya ait örneklerin 12 (%60)'sinde lamivudin direncine neden olan YMDD motif değişikliği belirlenmiştir. Motif değişikliği olan 12 HBV-DNA örneğinin 11 (%91.6)'inde, YMDD değişikliği ve sokak tipi (wild type) kombinasyonu birlikte tespit edilmiştir. YMDD + YVDD kombinasyonu altı örnekte belirlenirken, YMDD + YIDD kombinasyonu sadece bir örnekte belirlenmiştir. YMDD + YVDD + YIDD karma kombinasyonu ise dört örnekte saptanmıştır. Motif değişikliği olan 12 HBV-DNA örneğinin 8 (%66.6)'inde, YMDD değişikliği ile birlikte L180M değişikliğinin eşlik ettiği bulunmuştur. Lamivudin tedavisi sırasında olguların fenotipik direnç göstermelerini beklemeden genotipik direncin tespit edilmesi ve tedaviye erken dönemde adefovir eklenmesi, mutant suş ile hepatit gelişmesini önleyebilecektir. Bu nedenle lamivudin tedavisi alan tüm kronik hepatit B'li hastalarda lamivudin direncinin yakından takip edilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Hepatit B virusu, line prob assay (LIPA), direnç, YMDD mutasyonu.

ABSTRACT

Lamivudine resistance is a result of mutations in YMDD motif in which rt203-206th codons (Y: tyrosine; M: methionin; D: aspartic acid; D: aspartic acid) of reverse transcriptase; the catalytic part of hepatitis B polymerase enzyme, takes place. In this study we aimed to show the YMDD motif variants in chronic hepatitis B patients who have presumably developed lamivudine resistance due to viral polymerase gene mutation during lamivudine therapy. Twenty lamivudine treated patients were included in the study, and HBV-DNA was extracted from the sera of the patients by using extraction kit (Invisorb, Instant Spin DNA/RNA Virus Mini Kit, Germany). A line probe assay (INNO-LIPA HBV DR; INNOGENETICS N.V, Ghent, Belgium) was used to determine YMDD motif variants at viral polymerase gene fragment in HBV-DNA samples of these patients and evaluated colorimetrically. In 12 (60%) patients' samples YMDD motif variants were detected leading to lamivudin resistance. Eleven (91.6%) of the 12 samples having motif variants were YMDD variant and wild-type combination. While YMDD + YIDD combination was determined in only one specimen, YMDD + YVDD combination was determined in six. Mixed combination of YMDD + YVDD + YIDD were detected in four samples. In 8 (66.6%) HBV-DNA samples YMDD variants were accompanied with L180M variants. It can be concluded that determination of genotypic resistance before the expression of phenotypic resistance during lamivudin therapy is important since addition of adefovir to the therapy at an early stage will prevent the occurrence of hepatitis with mutant species. Thus lamivudin resistance should be followed up regularly in all of the chronic hepatitis B patients under lamivudin therapy.

Key words: Hepatitis B virus, line probe assay (LIPA), resistance, YMDD mutation.

GİRİŞ

Hepatit B virusu (HBV), dünya genelinde 350 milyon kişide kronik enfeksiyona ve yılda 500.000-1.000.000 ölüme neden olan bir virustur. Afrika, Asya ve Pasifik kıyılarında HBV'ye bağlı hastalıklar en önemli üç ölüm nedeninden biridir. Dünyada HBV ile karşılaşmış insan sayısı ise 2 milyardır¹. Kronik HBV enfeksiyonunun karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinoma gibi ölümcül komplikasyonlara yol açması nedeniyle tedavi edilmesi gerekmektedir. Hastalığın patogenezinde, HBV ile enfekte hepatositlere karşı yetersiz ve süregen bir immün yanıt rol oynar. Bu sebeple tedavinin iki yönü vardır; birincisi HBV antijenlerine karşı immün yanıtı kuvvetlendirmek, ikincisi ise virusu bloke veya eradike etmek². Günümüzde bu amaca yönelik kabul gören iki tedavi seçeneğinden birincisi immünmodülatörler (alfa interferon ve pegile formları), diğeri ise viral polimeraz inhibitörleri (lamivudin, adefovir, entekavir)'nin kullanımıdır³.

Bir sitozin analogu olan lamivudin (3-thiacytidine), 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine'in (-) "enantiomer"idir. Bu ilaç, Hepadnavirus DNA'sında zincir sentezini bloke ederek virus replikasyonunu inhibe eder. Bu sayede kısa zamanda HBV-DNA negatifleşir ve buna paralel olarak alanin aminotransferaz (ALT) düzeylerinde düşme meydana gelir. Tedavi süresi, HBeAg negatif ve pozitif hastalar için değişmekte olup minimum bir yıldır; ancak optimal tedavi süresi tam olarak belirlenememiştir. Uzun süreli tedavi, etkinliği artırmakla birlikte en önemli sorunu direnç gelişimidir^{2,4,5}. Bu çalışmada, lamivudin tedavisi sırasında viral polimeraz gen mutasyonuna bağlı ilaç direnci olduğu düşünülen, kronik HBV hastalarına ait HBV-DNA'ların YMDD motifinde oluşan değişikliklerinin "Inno-Lipa HBV DR assay" yöntemi ile irdelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Grubu

Kasım 2006-Mart 2007 tarihleri arasında lamivudin tedavisi sırasında üçüncü ayda erken virolojik yanıt vermeyen ve birinci yılın sonunda tedaviye devam edilmesine rağmen ALT yükselmesi saptanan 20 kronik HBV'li olguda YMDD (Y: tirozin, M: metiyonin, D: aspartik asit, D: aspartik asit) mutasyonu araştırıldı. Olgulara ait kan örnekleri EDTA içeren tüplere alındı ve çalışma Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapıldı. Ayrılan serumlar çalışma zamanına kadar -20°C'de saklandı.

DNA Ekstraksiyonu

Serum örneklerinden HBV-DNA'nın eldesi için ekstraksiyon kiti (Invisorb, Instant Spin DNA/RNA Virus Mini Kit, Germany) kullanıldı. Üretici firmanın önerdiği protokole göre DNA izolasyonu yapıldı.

Inno-LIPA Yöntemi ile YMDD Motif Değişikliklerinin İncelenmesi

Olguların örneklerinde viral polimeraz gen mutasyonları Inno-LIPA (Inno-Lipa HBV DR; Innogenetics N.V., Ghent, Belgium) yöntemiyle incelendi. DNA izolasyonu sonrasında örnekler, kit içinde bulunan ve viral polimeraz gen bölgesine yönelik HBV-DNA pre-S primerleri ile "nested" polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. İlk amplifikasyon 50 µL'lik reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışım örneği; 10 µL genomik DNA, 25 pmol dış primerler, 2.5 mM dNTP, 25 mM MgCl₂, 10x Taq amplifikasyon tamponu ve 5 U/µL Taq DNA polimeraz olacak şekilde düzenlendi. Birinci tur PCR reaksiyonu için program; 94°C'de dört dakika bekletildikten sonra bir siklusu 94°C'de 30 saniye, 45°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye olmak üzere toplam 40 döngü yapıp 72°C'de 10 dakika Gene Amp 9700 PCR (Applied Biosystems, USA) cihazı ile istenilen ürün amplifiye edildi. İkinci tur PCR reaksiyonu için, ilk PCR reaksiyonundan elde edilen üründen 2 µL alınarak reaksiyon karışımı hazırlandı ve 94°C'de dört dakika bekletildikten sonra bir siklusu 94°C'de 30 saniye, 45°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye olmak üzere toplam 35 siklus yapıp 72°C'de 10 dakika olacak şekilde PCR programı uygulanarak ikinci ürün amplifiye edildi.

Amplifikasyonların kontrolü için, amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin her birinden 10 µL alınıp etidyum bromür (0.5 µg/mL) ile boyanmış %1'lik agaroz jele yüklendi. Daha sonra agaroz jel elektroforezi gerçekleştirildi. Jelde ilk amplifikasyon sonrası ürün 409 baz çifti (bp)'nde ve ikinci amplifikasyon sonrası ürün 342 bp'de band gözlemlendi.

Elde edilen biyotinlenmiş PCR ürününde, nitroselüloz şeritler üzerinde mutasyon noktalarına özgül "line prob"larla üretici firmanın önerilerine göre ters hibridizasyon yöntemiyle mutasyon varlığı araştırıldı. "Line prob"lardaki HBV polimeraz, sokak tipi (wild type) ve lamivudin direnci ile ilişkili direnç kodonları (180 ve 204) kolorimetrik olarak görüntülenerek değerlendirildi⁶.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 20 olguya ait örneklerin 12 (%60)'sinde lamivudin direncine ait YMDD motif değişikliği tespit edilmiştir. Motif değişikliği olan 12 HBV-DNA örneğinin 11 (%91.6)'inde YMDD değişikliği ve sokak tipi kombinasyonu birlikte bulunmuştur. YMDD + YVDD kombinasyonu altı örnekte belirlenirken YMDD + YIDD kombinasyonu sadece bir örnekte belirlenmiştir. YMDD + YVDD + YIDD karma kombinasyonu ise dört örnekte saptanmıştır.

Motif değişikliği olan 12 HBV-DNA örneğinin 8 (%66.6)'inde, YMDD değişikliği ile birlikte L180M değişikliğinin mevcut olduğu izlenmiştir. Bunlardan yedisi YVDD değişikliği ile birlikte iken, bir örnek YVDD olmaksızın YIDD değişikliği ile birlikte dir. YMDD + YVDD + YIDD karma kombinasyonlarının üçünde L180M değişikliğinin eşlik ettiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda YMDD motif değişikliği saptanan 12 hastanın örtüşen (overlapping) HBsAg'deki aminoasit ve YMDD motif değişiklikleri Tablo I'de özetlenmiştir.

TARTIŞMA

Lamivudin, kronik hepatit B tedavisinde potansiyel bir tedavi stratejisi olarak 1998 yılından bu yana kullanımdadır. HBV'ye karşı seçici ve potansiyel etkisi ile kronik HBV enfeksiyonu tedavisinde çok önemli bir kilometre taşı olmuştur⁷. Bunda, lamivudinin hepatit B'ye karşı kuvvetli ve süratle gelişen antiviral etkisinin yanı sıra ciddi yan etkilerinin olmaması ve kullanım kolaylığı da etkilidir⁸. Lamivudin şu ana kadar, en emniyetli nükleozid analogu olmasına karşılık, yanıt kaybı ve histolojik progresyon ile neticelenen direnç

Tablo I. YMDD Motif Değişikliği Tespit Edilen Hastalarda YMDD Motif ve Örtüşen HBsAg'deki Aminoasit Değişiklikleri

Hasta no	YMDD motifi değişiklikleri	L180M mutasyonu	HBsAg mutasyonu değişiklikleri
1	YMDD + YVDD	-	I195M
2	YMDD + YVDD + YIDD	+	I195M + W196L
3	YMDD + YVDD	+	I195M
4	YMDD + YVDD + YIDD	+	I195M + W196L
5	YMDD + YVDD	+	I195M
6	YMDD + YIDD	+	W196L
7	YMDD + YVDD + YIDD	+	I195M + W196L
8	YMDD + YVDD	-	I195M
9	YMDD + YVDD + YIDD	-	I195M + W196L
10	YVDD	+	I195M
11	YMDD + YVDD	+	I195M
12	YMDD + YVDD	-	I195M

gelişimi en önemli sorundur. Lamivudin direncine yol açan mutasyonlar, genellikle revers transkriptazın C bölgesinde yer alan YMDD (Y: tirozin, M: metiyonin, D: aspartik asit, D: aspartik asit) motifindedir. YMDD mutasyonlu olgularda, metiyonin (M) yerine valin (V) (M204V dizayn olarak YVDD) ve/veya izolösin (I) (M204I dizayn olarak YIDD) ile yer değiştirmiş şekilde görülür. YMDD mutasyonları ayrıca B bölgesinde yer alan L180M gibi kompensatuvar mutasyonlar ile bir arada olabilir^{9,10}. Lamivudin tedavisi alan bir olguda YMDD mutasyonlarının oranı, birinci yılda %16-32 ve ikinci yılda %47-56 iken, üçüncü yılda %69-75'e ulaşır¹¹.

Lamivudin için genotipik ilaç direnci birkaç yöntem ile bakılabilmektedir. Bunlar DNA dizi analizleri, matris hibridizasyon, PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) ve ticari bir kit olan "Line probe assay" (LPA) gibi yöntemlerdir. LPA, bir membran şeritte immobilize (mutasyonlara özgü) proba uygulanan hibridizasyon ve PCR amplifikasyonu ile ters hibridizasyon gen analizi sağlayan bir yöntemdir¹². Lok ve arkadaşları⁶, lamivudin tedavisi alan kronik hepatit B'li hastalarda ilaç direncinin takibi için LPA yönteminin, sokak tiplerini ve karma tip mutasyonları tespit etme bakımından dizi analizinden daha duyarlı olduğunu ve kolay uygulanabilir olduğunu ifade etmişlerdir⁶. Bu yöntemin en önemli dezavantajı ise, sadece bilinen mutasyonlarla birlikte olan direnci tespit edebilmesidir¹². Bu yöntemi uygulayarak yaptığımız çalışmamızda olguların %60'ında lamivudin direncine ait YMDD motif değişikliği tespit edilmiştir. Motif değişikliği olan 12 HBV-DNA örneğinin 11 (%91.6)'inde YMDD değişikliği ve sokak tipi kombinasyonu birlikte bulunmuştur. YMDD + YVDD kombinasyonu altı örnekte belirlenirken, YMDD + YIDD kombinasyonu sadece bir örnekte belirlenmiştir. YMDD + YVDD + YIDD karma kombinasyonu ise dört örnekte saptanmıştır. Aynı yöntemin kullanıldığı diğer bir çalışmada da, YMDD değişikliği ve sokak tipi kombinasyonu birlikteliği 39 olgunun sadece ikisinde bulunmuştur¹³. Bu olguların da YVDD + L180M ve sadece L180M şeklinde olduğu ifade edilmiştir¹³. Akarsu ve arkadaşlarının¹⁰ inaktif hepatit B taşıyıcılarında YMDD motif değişikliğini araştırdıkları çalışmada aynı yöntem kullanılmış ve 71 anti-HBe pozitif HBV taşıyıcı olgularının 13'ünde YMDD motif değişikliği tespit edilmiştir. On üç hastanın 11'inde YMDD motif değişikliği ile birlikte sokak tipinin varlığı tanımlanmıştır. Çalışmadaki 13 YMDD motif değişikliğinin sekizinde L180M'nin eşlik ettiği ve L180M mutasyonu taşıyan olguların hepsinin YVDD motif değişikliği bulundurduğu bildirilmiştir¹⁰.

Çin'de yapılan bir çalışmada, Liang ve arkadaşları¹⁴ RFLP yöntemi ile 35 olgunun 14'ünde YMDD motif değişikliği tespit etmişler; değişikliklerin dördünün YIDD, altısının YVDD, üçünün YIDD + YVDD ve birinin YIDD + YMDD şeklinde olduğunu belirlemişlerdir. Çin'de yapılan diğer bir çalışmada ise, lamivudin tedavisi altındaki olguların 80'inde (%56.3) YMDD mutasyonu saptanmış; bunların da 34'ünün YIDD, 21'inin YVDD, 18'nin YIDD + YVDD, dördünün YMDD + YIDD ve üçünün YMDD + YVDD şeklinde motif değişikliği olduğu ifade edilmiştir¹¹.

Çalışmamızda yedi olguya ait örnekte YVDD + L180M mutasyonu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, YVDD mutasyonuna hemen daima L180M mutasyonunun eşlik ettiği, YIDD tipi mutasyonların ise tek başına da görülebileceği belirtilmektedir¹⁵. Ancak Akarsu

ve arkadaşlarının¹⁰ yaptığı çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da tek başına YVDD mutasyonu tespit edilmiştir. L180M ve YVDD mutasyonlarının, lamivudin direncini artırır-
mada sinerjik etki gösterdiği ifade edilmektedir¹⁵. Bu nedenle tek başına YVDD belirledi-
ğimiz olgulara ileride L180M mutasyonunun eşlik edeceği düşüncesindeyiz.

Yapılan çalışmalarda ve bu çalışmada da görüldüğü gibi, lamivudin direnç oranları ve
direnç tipleri farklılık göstermektedir. Lamivudine karşı genotipik direnç ile fenotipik yan-
sıması arasında 3-24 ay gibi değişken bir süre mevcuttur. Hastaların fenotipik direnç gös-
termelerini beklemeden genotipik direncin tespit edilmesi, tedaviye erken dönemde
adefovir eklenmesini sağlayarak mutant suş ile enfeksiyon gelişimini önleyebilecektir¹⁵.
Bu nedenle lamivudin tedavisi alan kronik hepatit B olgularında, lamivudine karşı gelişen
genotipik direncin erken tespit edilmesinin, özellikle hepatosit rezervi azalan hastalarda
tedavinin hızlı değiştirilmesi için önemli bir yol gösterici olacağını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Özdemir D, Kurt H. Hepatit B virusu enfeksiyonlarının epidemiyolojisi, s: 107-16. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (ed), Viral Hepatit 2007. 2007, Viral Hepatit Savaşım Derneği, Ankara.
2. Akarca US. Kronik B hepatiti tedavisi, s: 190-7. Ustaçelebi Ş, Badur S, Abacıoğlu H (eds), Uluslararası Katılımlı I. Ulusal Viroloji Kongresi, Konferanslar ve Bildiriler Kitabı. 2003, Öncü Basımevi, Ankara.
3. Beşşik F. Kronik B hepatiti tedavisinde nükleozid analogları, s: 192-202. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (eds), Viral Hepatit 2007. 2007, Viral Hepatit Savaşım Derneği, Ankara.
4. Liaw YF. The current management of HBV drug resistance. J Clin Virol 2005; 34(Suppl 1): 143-4.
5. Zoulim F. Detection of hepatitis B virus resistance to antivirals. J Clin Virol 2001; 21: 243-53.
6. Lok ASF, Zoulim F, Locarnini S, et al. Monitoring drug resistance in chronic hepatitis B virus (HBV)-infected patients during lamivudine therapy: evaluation of performance of Inno-Lipa HBV DR assay. J Clin Microbiol 2002; 40: 3729-34.
7. Bozdayı AM. Hepatit B virus enfeksiyonlarında antiviral ilaç direnci, s: 91-7. IV. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongre Kitabı. 2006, Ankara Mikrobiyoloji Derneği, Ankara.
8. Çakaloğlu Y. Hepatit B tedavisi: kronik hepatit dışı indikasyonlar, s: 187-9. Ustaçelebi Ş, Badur S, Abacıoğlu H (eds), Uluslararası Katılımlı I. Ulusal Viroloji Kongresi, Konferanslar ve Bildiriler Kitabı. 2003, Öncü Basımevi, Ankara.
9. Yuen MF, Kato T, Mizokami M, et al. Clinical outcome and virologic profiles of severe hepatitis B exacerbation due to YMDD mutations. J Hepatol 2003; 39: 850-5.
10. Akarsu M, Şengönül A, Tankurt E, et al. YMDD motif variants in inactive hepatitis B carriers detected by Inno-Lipa HBV DR assay. J Gastroenterol Hepatol 2006; 21: 1783-8.
11. Li D, Gu HX, Zhang SY, et al. YMDD mutations and genotypes of hepatitis B virus in Northern China. Jpn J Infect Dis 2006, 59: 42-5.
12. Sönmez E. Antiviral direnç monitorizasyonu ve klinik yararı. Klimik Derg 2001; 14: 66-70.
13. Alvarado-Esquivel CA, de la Ascensión Carrera-Gracia M, Conde-González CJ, et al. Genotypic resistance to lamivudine among hepatitis B virus isolates in Mexico. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 221-3.
14. Liang WF, Yang DH, Shen YH, Xie YJ, Zhao NF. Types and emergence time of YMDD motif mutation in hepatitis B virus polymerase gene during lamivudine treatment. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi 2003; 11: 302-4.
15. Eyigün CP. Hepatit B virüsü mutasyonlarının klinik önemi ve tedaviye etkileri, s: 131-44. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (ed), Viral Hepatit 2007. 2007, Viral Hepatit Savaşım Derneği, Ankara.