

تعیین فراوانی جهش‌های موتیف YMDD در بیماران هپاتیت B مزمن تحت درمان با لامیوودین

رقیه احسانی^۱، رباب رفیعی طباطبایی^۲، علی پوریاسین^۳، عبدالرضا سودبخش^۴، حیدر شرفی^۵

^۱ دانشجوی کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد شمال، تهران، ایران.

^۲ استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد شمال، تهران، ایران.

^۳ استادیار ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، ارسنجان، ایران.

^۴ دانشیار بیماری‌های عفونی، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

^۵ دانشجوی کارشناس ارشد هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: لامیوودین اولین آنالوگ نوکلئوزیدی است که به منظور مداوای بیماران هپاتیت B مزمن به کار گرفته می‌شود. این دارو در مهار همانندسازی ویروس هپاتیت B و کاهش فعالیت بیماری مؤثر است. اما مهم‌ترین مشکلی که در درمان با لامیوودین وجود دارد؛ پیدایش سویه‌های حاوی جهش مقاوم به لامیوودین در طول مداوا می‌باشد که در این سویه‌های حاوی جهش، تغییر آمینو اسیدی در موتیف YMDD پلیمرز ویروس رخ داده است. هدف این مطالعه بررسی فراوانی جهش‌های موتیف YMDD در بیماران هپاتیت B مزمن تحت درمان با لامیوودین می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه، ۵۶ بیمار هپاتیت مزمن که پیشتر اینترفرون و یا آنالوگ نوکلئوزیدی/ نوکلئوتیدی دریافت نکرده بودند و حداقل برای ۶ ماه تحت درمان با لامیوودین قرار داشتند، بررسی شدند. ابتدا DNA ویروس هپاتیت B از سرم بیماران استخراج شد و جهش‌های موتیف YMDD در ژن پلیمرز ویروس با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، سپس توالی‌یابی مستقیم محصول PCR، تعیین گردید. میزان ویروس هپاتیت B در سرم بیماران به روش PCR کمی مشخص شد.

یافته‌ها: ۵۶ بیمار هپاتیت B مزمن (۳۹ مرد و ۱۷ زن) با میانگین سنی $34/12 \pm 13/6$ سال بررسی شدند. در ۱۵ بیمار (۲۶/۷٪) از ۵۶ بیمار، جهش‌های موتیف YMDD در ژن پلیمرز ویروس هپاتیت B مشاهده گردید. جهش‌ها در ۸ بیمار (۱۴/۲٪) به صورت YIDD و در ۷ بیمار (۱۲/۵٪) به صورت YVDD بود. جهش سرین در موتیف YMDD در هیچ‌یک از بیماران این مطالعه مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی نشان داد فراوانی جهش‌های موتیف YMDD که منجر به مقاومت به داروی لامیوودین می‌گردد، در بین بیماران هپاتیت B مزمن در کشور ایران متداول است (۲۶/۷٪) و تشخیص مولکولی جهش‌های موتیف YMDD با استفاده از روش‌هایی مانند توالی‌یابی مستقیم DNA می‌تواند رخداد مقاومت دارویی را در مراحل اولیه پیدایش در بیماران هپاتیت B مزمن تعیین کند.

کلید واژه‌ها: ویروس هپاتیت بی؛ هپاتیت بی مزمن؛ لامیوودین؛ جهش‌های موتیف YMDD.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد شمال، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: rrtabatabaei@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۲۷۳۶۱۳۵۲

تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۱۸

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۵

مقدمه

میلیون‌ها حامل مزمن ویروس هپاتیت B (Hepatitis B Virus) در سراسر جهان وجود دارد (۱) که جان ۴۰-۱۵٪ این بیماران به علت امکان پیشرفت بیماری به سمت سیروز و سرطان کبد به خطر

هپاتیت B مزمن از جمله بیماری‌های عفونی چالش‌برانگیز در جهان است. طبق برآورد سازمان بهداشت جهانی حدود ۳۵۰

جهش یافته موتیف YMDD، این مطالعه با هدف تعیین فراوانی چنین رخدادی در بین بیماران هپاتیت B مزمن تحت درمان با لامیوودین صورت گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - مقطعی (Cross-Sectional)، نمونه‌های سرمی ۵۶ بیمار هپاتیت B مزمن مراجعه کننده به آزمایشگاه تشخیص طبی قلهک تهران، جمع آوری شد. تمام بیماران بین ۶ ماه الی ۷ سال تحت درمان با لامیوودین قرار داشتند، و پیش از آن اینترفرون و یا سایر آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/ نوکلئوتیدی را دریافت نکرده بودند. تمام بیماران مورد بررسی بیش از ۶ ماه HBsAg مثبت داشتند. DNA ویروسی از ۳۰۰ μl نمونه‌های سرمی بیماران با استفاده از کیت QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) استخراج گردید. به منظور تعیین جهش‌های موتیف YMDD، قطعه ژنی مربوطه از ژن پلیمرز ویروسی به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر شد. براساس انتهای ۳' و ۵' قطعه مورد نظر از ژن پلیمرز ویروسی یک جفت پرایمر با توالی‌های زیر توسط پژوهشگران این تحقیق طراحی، سپس توسط شرکت سینژن (CinnaGen, Tehran, Iran) سنتز گردید.

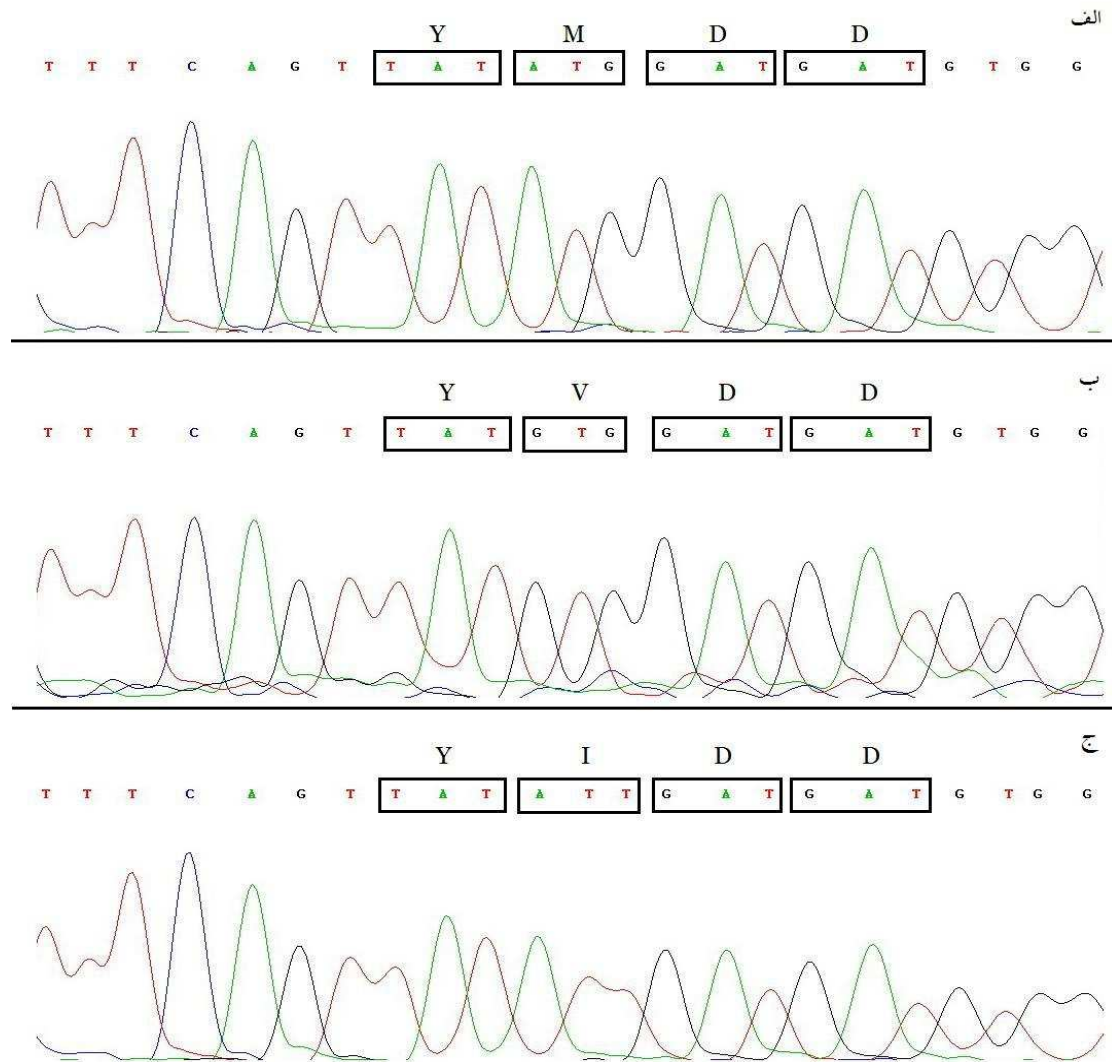
Hbad-F: 5'-CTCGAGGATTGGGGACCCTG-3'
Hbad-R: 5'-TGGTAACAGCGGTA AAAAAGGGAC-3'
واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ μl بهینه‌سازی شد. در هر واکنش DNA ۲۰ μl ویروس (به عنوان الگو)، هر پرایمر به غلظت ۰/۲ μM، dNTP ۱/۵ mM، MgCl₂ (Qiagen, Hilden, Germany) به غلظت ۰/۲ μM و ۲ واحد Taq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) استفاده گردید. برنامه حرارتی مورد استفاده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) طبق جدول شماره ۱ می‌باشد.

جدول شماره ۱: برنامه حرارتی مورد استفاده به منظور تکثیر قطعه حاوی موتیف YMDD از ژن پلیمرز HBV

مراحل	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	زمان
Initial Denaturation	۹۴	۵ دقیقه
Denaturation	۹۴	۴۰ ثانیه
Annealing	۵۵	۳۵ چرخه ۴۰ ثانیه
Extention	۷۲	۴۰ ثانیه
Final Extention	۷۲	۱۰ دقیقه

می‌افتد (۲). درمان‌های رایج برای بیماران هپاتیت B مزمن شامل اینترفرون آلفا، که در کمتر از ۴۰٪ بیماران مفید واقع می‌شود (۳) و آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/ نوکلئوتیدی:

Tenofovir, Adefovir, Telbivudine, Entecavir, Lamivudine می‌باشد (۴). درمان به وسیله آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/ نوکلئوتیدی گام بزرگی در درمان بیماران هپاتیت B مزمن محسوب می‌شود؛ زیرا در اکثر بیماران مفید واقع شده است (۵). لامیوودین (β-L-2',3'-Dideoxy-3'-Thiacytidine) اولین دارو از دسته آنالوگ‌های نوکلئوزیدی است که از طریق رقابت با سوبسترای طبیعی آنزیم DNA پلیمرز ویروس، همانندسازی ویروس را مهار کرده (۶) و این امر به کاهش میزان ویروس (HBV DNA) و آلانین آمینو ترانسفراز (Alanine Amino Transferase) در سرم بیماران می‌انجامد و در نهایت پیشرفت بیماری به تأخیر می‌افتد (۷). اما مشکل عمده‌ای که در استفاده از لامیوودین وجود دارد؛ پیدایش سویه‌های جهش یافته مقاوم به دارو است. به گونه‌ای که در ۳۲-۱۴٪ بیماران پس از یک سال درمان، جهش‌های منجر به مقاومت دارویی در ژنوم ویروس رخ می‌دهد، و با افزایش مدت زمان مصرف دارو خطر پیدایش مقاومت نیز افزایش می‌یابد (۸-۱۰). اساس پیدایش سویه‌های مقاوم به لامیوودین، وقوع جهش در ژن پلیمرز ویروس است که منجر به تغییر آمینو اسیدی در موتیف YMDD (تیروزین - متیونین - آسپاراتات - آسپاراتات) می‌شود. این موتیف که در موقعیت کدون‌های ۲۰۳-۲۰۶ دومین ریورس ترانس کریپتاز از ژن پلیمرز ویروسی قرار دارد، بخشی از جایگاه فعال آنزیم پلیمرز ویروس و محل اثر لامیوودین است (۱۱، ۱۲). تغییر آمینو اسیدی به صورت تبدیل متیونین به ایزولوسین (rtM204I, YIDD) و یا والین (rtM204V, YVDD) (۱۳) و ندرتاً سرین (rtM204S, YSDD) می‌باشد (۱۴). با پیدایش سویه‌های مقاوم به لامیوودین ابتدا میزان ویروس، سپس آلانین آمینو ترانسفراز سرم بیماران افزایش یافته که در نهایت به شدت یافتن بیماری می‌انجامد (۱۵). از سوی دیگر جهش در موتیف YMDD منجر به مقاومت متقاطع با دیگر آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/ نوکلئوتیدی مانند Entecavir و Telbivudine می‌شود و انتخاب دیگر گزینه‌های درمانی را مختل می‌کند (۱۶، ۱۷). لذا با توجه به اهمیت بالینی شناسایی سویه‌های



شکل شماره ۲: نتایج توالی‌یابی مستقیم موتیف YMDD در ژن پلیمراز ویروس هپاتیت B
الف: ویروس هپاتیت B بدون جهش، ب: ویروس هپاتیت B دارای جهش YVDD
ج: ویروس هپاتیت B دارای جهش YIDD

بحث

توسط پژوهشگرانی که جمعیت مورد بررسی آنها از نظر مدت زمان مصرف دارو کنترل شده بود، مشکل می‌باشد، به دلیل اینکه در این مطالعه، بیماران در مدت زمان‌های متفاوت تحت درمان با لامیوودین قرار داشتند. Masaadeh و همکارانش در سال ۲۰۰۸، با بررسی فراوانی مقاومت دارویی بیماران هپاتیت B مزمن در کشور اردن که تحت درمان با لامیوودین به مدت ۱۳-۱ سال قرار داشتند، نشان دادند در ۳۱٪ این بیماران ویروس‌های جهش‌یافته مقاوم به لامیوودین وجود دارد (۲۰). در مطالعه حاضر، علاوه بر تعیین فراوانی جهش‌های موتیف YMDD که به مقاومت دارویی لامیوودین در بیماران هپاتیت B مزمن می‌انجامد، ویژگی‌های بیماران از نظر جنسیت، متوسط سنی، متوسط میزان ویروس و مدت زمان مصرف دارو در دو گروه بیماران دارای جهش و

درمان کوتاه‌مدت با داروی لامیوودین در پاک‌سازی کامل ویروس از سرم بیمار کافی نیست و درمان طولانی‌مدت با پیدایش سویه‌های جهش‌یافته مقاوم به دارو همراه است (۱۸). براساس مطالعات پیشین این مقاومت با تغییر در موتیف YMDD مرتبط می‌باشد. در حال حاضر، لامیوودین به‌طور رایج در ایران به‌منظور مداوای بیماران هپاتیت B مزمن تجویز می‌شود (۱۹). در این مطالعه با بررسی ۵۶ بیمار مبتلا به هپاتیت B مزمن، در ۱۵ بیمار (۲۶٪) جهش‌های موتیف YMDD مشاهده شد، که نشان می‌دهد میزان مقاومت به داروی لامیوودین در بیماران هپاتیت B مزمن در کشور ایران رایج است. البته مقایسه فراوانی مقاومت دارویی مشاهده‌شده در این مطالعه با تحقیقات صورت گرفته

یابد، از لحاظ بالینی به‌عنوان Viral Rebound نامیده شده و احتمال پیدایش مقاومت دارویی در این مرحله وجود دارد و باید ژن پلیمرز ویروس از نظر جهش‌های ایجادکننده مقاومت دارویی به‌وسیله آزمایشات مولکولی بررسی گردد (۲۱)، در صورتی که مقاومت دارویی در این مرحله شناسایی نشود، در پی تکثیر فعال ویروس‌های جهش‌یافته مقاوم به دارو، بافت کبدی آسیب دیده و بیماری پیشرفت می‌کند. بنابراین هرچه پیدایش مقاومت دارویی در مراحل ابتدایی‌تر شناسایی شود، بیمار شانس بیشتری برای درمان مؤثرتر خواهد داشت. لذا پیشنهاد می‌شود در کشور ایران با توجه به فراوانی نسبتاً بالای مقاومت به لامیوودین در بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن، پزشکان با بررسی کامل و دقیق مقاومت دارویی، اندازه‌گیری میزان ویروس و سطح آلانین آمینو ترانسفراز سرم، بیماران را در طی ۲ سال اول مداوا هر ۳ الی ۶ ماه یک‌بار و از سال دوم به بعد هر ۳ ماه یک‌بار لحاظ کرده و در صورت مشاهده Viral Rebound، شناسایی جهش‌های احتمالی در ژن پلیمرز ویروس را به روش مولکولی مدنظر قرار دهند. روش تعیین توالی مستقیم DNA که در این مطالعه به کار رفته است، یکی از روش‌های مولکولی استاندارد با دقت بالا می‌باشد که امکان ردیابی جهش‌ها را در هر منطقه از ژنوم ویروس هپاتیت B امکان‌پذیر می‌سازد (۲۲) و در صورت استانداردسازی و به کارگیری در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی می‌تواند کمک شایان توجهی به بهبود راهکارهای درمانی انتخاب‌شده توسط پزشکان برای درمان بیماران هپاتیت B بنماید.

نتیجه‌گیری

طبق نتایج این مطالعه، فراوانی جهش‌های موتیف YMDD که منجر به مقاومت به لامیوودین می‌شود، در بین بیماران هپاتیت B مزمن در کشور ایران متداول است (۲۶/۷٪)، لذا تشخیص مقاومت دارویی با استفاده از تکنیک‌های مولکولی در مراحل اولیه پیدایش، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و در صورت به کارگیری در زمان مناسب می‌تواند به تشخیص زودهنگام مقاومت دارویی بیانجامد. در این صورت پزشکان می‌توانند با انتخاب گزینه درمانی دیگری که فاقد مقاومت متقاطع با لامیوودین است، تکثیر ویروس‌های جهش‌یافته مقاوم به لامیوودین را مهار کرده و خطر پیشرفت بیماری به سمت سیروز و سرطان کبد را کاهش دهند.

بیماران بدون جهش با استفاده از آزمون‌های آماری ارزیابی گردید (جدول شماره ۲)، نتایج بررسی نشان داد فراوانی جنسیت (زن و مرد) در دو گروه بیماران دارای جهش و بیماران بدون جهش، تفاوت معنی‌داری دارد ($p < 0/003$). همچنین مقایسه متوسط مدت زمان مصرف دارو در بیماران دارای جهش و بیماران بدون جهش نشان داد متوسط مدت زمان مصرف دارو در بیماران دارای جهش به‌طور معنی‌داری از گروه بدون جهش بیشتر است ($p < 0/04$)، و تنها در یک بیمار که زیر یک‌سال تحت درمان با لامیوودین بود، ویروس جهش‌یافته مقاوم به دارو مشاهده گردید. همچنین مقایسه متوسط میزان ویروس و متوسط سنی در دو گروه از بیماران، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. با توجه به اینکه جهش‌های ایجادکننده مقاومت به لامیوودین به مقاومت متقاطع با دیگر داروهای نوکلئوزیدی مانند Entecavir، Telbivudine می‌انجامد، لذا بررسی فراوانی جهش‌یافته‌های موتیف YMDD در بیماران هپاتیت B مزمن از لحاظ بالینی حایز اهمیت است و می‌تواند اطلاعات مفیدی را جهت اتخاذ شیوه‌های درمانی مناسب توسط پزشکان در اختیار آنان قرار دهد. پزشکان در بررسی بالینی بیماران با تکیه بر میزان ویروس و آلانین آمینو ترانسفراز سرم بیماران، پیدایش مقاومت دارویی را نیز ارزیابی می‌کنند. البته میزان ویروس پیش از آلانین آمینو ترانسفراز در سرم بیمار افزایش می‌یابد و از لحاظ بالینی مهم‌ترین نشانگر پیدایش مقاومت دارویی در بیماران هپاتیت B مزمن است. اگر در بیماران هپاتیت B مزمن، با شروع درمان با لامیوودین پس از ۱۲ هفته میزان ویروس (HBV DNA) در سرم کاهش قابل ملاحظه‌ای یابد، بدین معناست که بیمار پاسخ مناسبی به دارو داده است و در اغلب موارد با ادامه مصرف دارو، ویروس از سرم بیمار کاملاً حذف شده و بیمار بهبود می‌یابد. اما در برخی بیماران سطح میزان ویروس به حداقل ممکن (Nadir Value) می‌رسد، ولی کاملاً از سرم بیمار حذف نمی‌شود و این بیماران مستعد پیدایش مقاومت دارویی هستند، و باید به‌دقت توسط پزشک تحت نظر قرار گیرند و هر ۳ الی ۶ ماه یک‌بار میزان ویروس و سطح آلانین آمینو ترانسفراز سرم بیمار اندازه‌گیری شود. از آنجا که احتمال پیدایش مقاومت دارویی پس از ۲ سال افزایش می‌یابد، در این بیماران از سال دوم مداوا به بعد، بهتر است هر ۳ ماه یک‌بار میزان ویروس و سطح آلانین آمینو ترانسفراز سرم بیمار بررسی شود، و اگر میزان ویروس از پایین‌ترین حد خود (Nadir Value) حداقل به میزان ۱۰ برابر ($\geq 1.0 - \log_{10}$) افزایش

تشکر و قدردانی

محترم مرکز تحقیقات مولکولی آزمایشگاه قلهک تهران، همچنین

شرکت کاوش فن آور کوثر به دلیل تعیین توالی تقدیر می گردد.

بدین وسیله از جناب آقای دکتر ابراهیم کلاتر مهرجردی و پرسنل

References:

1. Hanazaki K. Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis B: A Review. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004;3:63-70.
2. Gane MD, Prince AM. Hepatitis B Virus Infection-Natural History and Clinical Consequences. *N Engle J Med* 2004;350(11):1118-29.
3. Wong DK, Cheung AM, Rourke K, Naylor CD, Detsky AS, Heathcote J. Effects of Alpha-Interferon in Patients with Hepatitis B E Antigen Positive Chronic Hepatitis B: A Meta-Analysis. *Ann Intera Med* 1993;119:312-23.
4. Ghany MG, Doo EC. Antiviral Resistace and Hepatitis B Therapy. *Hepatology* 2003;49:174-84.
5. Cha-Ze L, Hsuan-Shu L, Guan-Tarn H, Pei-Ming Y, Jin-Chuan S. Detection of YMDD Mutation Using Mutant-Specific Primers in Chronic Hepatitis B Patients before and after Lamivudine Treatment. *World J Gastroenterol* 2006;12(33):5301-5.
6. Tuncbilek S, Kose S, Elaldi A, Akman S. Lamivudine Resistance in Untreated Chronic Hepatitis B Patients in Turkey. *Turk J Gastroenterol* 2008;19(2):99-103.
7. Li MW, Hou W, WO JE, Liu KZ. Character of HBV (Hepatitis B Viruse) Polymerase Gene rtM204V/I and rtM180L Mutation in Patients with Lamivudine Resistance. *J Zhejiang Univ Sci* 2005;6:664-7.
8. Heathcote J. Treatment of HBe Antigen-Positive Chronic Hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003;23:69-80.
9. Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV, Vassilopoulos D. Treatment of HBe Antigen-Negative Chronic Hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003;23:81-8.
10. Wright TL. Clinical Trial Results and Treatment Resistance with Lamivudine in Hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2004;24 Suppl 1:31-6.
11. Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Kobayashi M, Tsubota A, Miyano Y, et al. Emergence and Takeover of YMDD Motif Mutant Hepatitis B Virus during Long-Term Lamivudine Therapy and Re-Takeover by Wild-Type after Cessation of Therapy. *Hepatology* 1998;27(6):1711-6.
12. Marcellin P, Lau GK, Bonino F, et al. Peginterferon Alfa-2a Alone, Lamivudine Alone, and the Two in Combination in Patients with HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B. *N Engle J Med* 2004;351:1206-17.
13. Bottecchia M, Souto FJ, KM O, et al. Hepatitis B Virus Genotypes and Resistance Mutation in Patients Under Long Term Lamivudine Therapy: Characterization of Genotype C in Brazil. *BMC Microbial* 2008;8:11-20.
14. Hubert GM, Robert AM, Suzan D, Edwin F, Albert DME. Identification of a New Variant in the YMDD Motif of the Hepatitis B Virus Polymerase Gene Selected during Lamivudine Therapy. *J Med Microbial* 2002;51:695-9.
15. Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Yatsuji H, Hosaka T, Sezaki H, et al. Correlation of YMDD Mutation and Breakthrough Hepatitis with Hepatitis B DNA and Serum ALT during Lamivudine Treatment. *Hepatology Research* 2010;40:125-34.
16. Baldick CJ, Tenny DJ, Mazzucco CE, et al. Comprehensive Evaluation of Hepatitis B Virus Reverse Transcriptase Substitutions Associated with Entecavire Resistance. *Hepatology* 2008;47:1473-82.
17. Liaw YF, Gane E, Leung N, et al. 2-Year GLOBE Trial Results: Telbivudine Is Superior to Lamivudine in Patients with Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology* 2009;136:486-95.
18. Nakanishi N, Kurosaki M, Asahina Y, Onuki Y, Ueda K, Nishimura Y, et al. Polymerase Domain B Mutation Associated With Hepatitis Relaps during Long-Term Lamivudine Therapy for Chronic Hepatitis B. *Intervirology* 2005;48:381-8.
19. Mohebbi SR, Amini-Bavil-Oyae S, Zali N, Noorinayer B, Derakhshan F, Chiani M, et al. Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus in Iran. *Clin Microbial Infect* 2008;14:858-66.
20. Masaadeh HA, Hayajneh MA, Alqudah EA. Hepatitis B Virus Genotypes and Lamivudine Resistance Mutations in Jordan. *World J Gastroenterol* 2008;14(47):7231-4.
21. Zoulim F, Locarinini S. Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues. *Gastroenterology* 2009;137:1593-1608.
22. Clark B, Bloor S. Molecular Genotyping of Hepatitis B Virus. *J Clin Virol* 2002;25:41-5.