

¹Tadeusz Wojciech Łapiński, ¹Anna Parfieniuk-Kowerda, ¹Anna Trzos, ¹Jerzy Jaroszewicz, ²Oksana Kowalczyk, ²Jacek Nikliński, ¹Robert Flisiak

MUTACJE HBV ZWIĄZANE Z LECZENIEM LAMIWUDYNĄ

¹Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

²Zakład Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

STRESZCZENIE

U około 350 milionów osób rozpoznawane jest przewlekłe zapalenie wątroby związane z zakażeniem HBV. Głównym celem leczenia tych chorych jest trwała eliminacja wirusa, a jeśli jest to niemożliwe - zahamowanie replikacji HBV. Lamiwudyna (LMV) jest najczęściej stosowanym analogiem nukleozydowym. Jej stosowanie szybko prowadzi do selekcji mutantów HBV zależnych od zmian punktowych w genie polimerazy.

Cel pracy. W badaniu oceniono częstość i rodzaj mutacji w genie polimerazy HBV w trakcie terapii LMV. Określono czas, w którym dochodzi do mutacji punktowych. Porównano rodzaj mutacji wśród chorych HBeAg (+) jak i HBeAg (-).

Material i metody. Badania przeprowadzono wśród 175 chorych przewlekłe zakażonych HBV, leczonych LMV. Obecność antygenów HBs, HBe i przeciwciał anti-HBe wykrywano metodą mikro - enzymoimmunologiczną (MEIA), (ABBOTT). Ilość HBV-DNA określano metodą RT-PCR za pomocą odczynników „GenElute Mammalian Genomic DNA Kit” (Sigma). Mutacje genu polimerazy HBV oznaczono stosując reakcję PCR z zastosowaniem specyficznym primerów, a następnie wykonywano bezpośrednie sekwencjonowanie (Applied Biosystems). U 138 chorych wykonano biopsję wątroby. Stan morfologiczny wątroby określano zgodnie z klasyfikacją Scheuer’a.

Wyniki Średnia wiremia wśród badanych chorych HBeAg (+) przed leczeniem była porównywalna do wirerii wśród chorych HBeAg (-) ($3,8 \times 10^8$ IU/ml vs. $1,4 \times 10^8$ IU/ml).

Mutację wykryto u 96 chorych. Po 5 latach leczenia częstość mutacji wśród chorych HBeAg (+) wynosiła 51,9%, a HBeAg (-) 56,1%. Do mutacji najczęściej dochodziło w miejscach 204, 202, 180 i 169. Leczenie LAM wpływa na selekcję mutantów HBV w pozycji 180, a następnie w pozycji 204 genu polimerazy HBV u 81% chorych HBeAg (+) po 25 miesiącach i po 35 miesiącach u 77% chorych HBeAg (-).

Wnioski. Po 2 latach leczenia LAM chorych HBeAg (+) i po 3 latach terapii chorych HBeAg (-) dochodzi do selekcji punktowej mutantów HBV w pozycji 180 i 204 genu polimerazy HBV. Mutacje te zmniejszają aktywność przeciwwirusową leku i wpływają na oporność krzyżową z entekawirem (ETV).

Słowa kluczowe: HBV, leczenie lamiwudyną, mutacje genu polimerazy HBV

WSTĘP

Okolo dwóch bilionów osób na świecie jest zakażonych HBV, z czego u blisko 350 milionów rozpoznawane jest przewlekłe zapalenie wątroby typu B (1). Podstawowym celem leczenia przeciwwirusowego tych chorych jest trwała eliminacja wirusa. Jednak nawet zahamowanie replikacji HBV bez trwałej eliminacji wirusa, powoduje zmniejszenie prawdopodobieństwa rozwoju marskości wątroby oraz raka pierwotnego wątroby (HCC). Uzasadnia to stosowanie każdej terapii przeciwwirusowej hamującej replikację HBV.

Aktualnie w leczeniu zakażonych HBV zastosowanie mają interferon pegylowany alfa (Peg-IFN) oraz analogi nukleoty(-zydowe) (AN). Wprawdzie Peg-IFN stwarza największe szanse na pełną eliminację HBV, jednak terapia tą cytokiną jest inwazyjna, a do eliminacji wirusa dochodzi tylko u około 15% pacjentów, przy czym u większości z nich dopiero w trakcie wieloletniej obserwacji po zakończeniu leczenia (2). AN skutecznie hamują replikację HBV, a lamiwudyna (LMV) jest najdłużej stosowanym z tej grupy lekiem. Jednak jej słaba aktywność przeciwwirusowa i niska bariera genetyczna stwarzają zagrożenie szybkiej selekcji HBV opornych mutantów (3).

Jedne z pierwszych opisanych naturalnych mutacji w genomie HBV dotyczyły zmian w obrębie regionu preC/C. Mutanty takie są niezdolne do syntezy HBeAg. Występowanie tego typu mutacji koreluje zwłaszcza z genotypem D i B HBV (4). Innym typem mutacji są zmiany w regionie preS/S genomu HBV. Tego typu mutanty wykazują odmienną budowę HBsAg co klinicznie może wyrażać się nieskutecznością profilaktyki czynnej i biernej zakażeń HBV (5). Ponadto mutacje takie powodują zmniejszenie ekspresji HBeAg na powierzchni komórek, osłabiając skuteczność immunologicznych mechanizmów eliminujących zakażenie. Mutacje w rejonie X genomu HBV powodują zazwyczaj utratę zdolności wirusa do syntezy HBeAg i/lub HBsAg (6). Mutacje te wpływają na zmianę budowy białka HBx, które po zmutowaniu wykazuje cechy pro-proliferacyjne i antyapoptyczne. Tego typu zmiany zwiększają prawdopodobieństwo powstania raka pierwotnego wątroby (HCC) (7).

Oporność na AN kodowana jest w różnych domkach genu polimerazy HBV. Mutacje będące skutkiem błędów w genie kodującym polimerazę HBV obserwowane są w wirusach ulegających selekcji najczęściej w trakcie terapii AN. Spośród AN używanych w leczeniu chorych przewlekle zakażonych HBV najwyższą aktywność przeciwwirusową wykazują entekawir (ETV) i tenofovir (TDF), w przeciwieństwie do LMV, telbivudyny (LdT) oraz adefowiru (ADV). To właśnie stosowanie leków o niskiej aktywności przeciwwirusowej przyczynia się do szybkiej selekcji mutantów HBV. Leki te hamują replikację postaci „dzikiej” HBV, ale suboptymalna supresja replikacji HBV pozwala na nabywanie substytucji pierwotnych i oraz namnażanie się wirusów opornych na dany lek. Terapia LMV, którą otrzymywało w Polsce najwięcej chorych zakażonych HBV, często przyczynia się do występowania tego typu sytuacji i dotyczy najczęściej zmian w pozycji 204 genu kodującego polimerazę HBV. Zmiana aminokwasów w tej pozycji jest wystarczająca do wytworzenia częściowej oporności na LMV. Nieco rzadziej obserwowana jest selekcja mutantów ze zmianami w pozycjach 180, 173 i 80 genu polimerazy. Zmiany w pozycji 204 i/lub 180 oraz dodatkowe pojawienie się mutacji w pozycji 202, 169, 184, 250 skutkują opornością nie tylko na LMV, ale również na entekawir (ETV) (8). Wprawdzie powstające mutanty charakteryzują się mniejszą dynamiką replikacji w porównaniu do typu „dzikiego”, jednak systematyczny wzrost ich liczby prowadzi do całkowitego wyparcia typu „dzikiego” wirusa. Mutant wykazujący odmienne cechy wpływa na zaostrzenie procesu chorobowego, jak i zwiększenie ryzyka rozwoju zmian nowotworowych (9, 10).

Cel pracy. Badania przeprowadzono celem oceny częstości i rodzaju występowania mutantów HBV w trakcie terapii LMV. Określono rodzaj występujących

mutacji oraz czas w którym dochodzi do mutacji punktowych wśród chorych HBeAg(+) i HBeAg(-).

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono wśród 175 chorych (48 kobiet i 127 mężczyzn w wieku średnio 44 lat, od 18 do 77 lat), (52 HBeAg (+) i 123 HBeAg (-) z rozpoznaniem przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B. Wszyscy pacjenci byli leczeni LMV do czasu pojawienia się mutantu HBV opornego na terapię. Przed aktualną terapią LMV, pacjenci nie byli leczeni AN. U 138 chorych (61 HBeAg (+) i 77 HBeAg (-)) w okresie kwalifikacji do leczenia przeciwwirusowego wykonano biopsję wątroby. Stan morfologiczny wątroby określano zgodnie z klasyfikacją Scheuer'a¹ (11).

Obecność w surowicy antygenów HBs, HBe, przeciwciał anti-HBe wykrywano metodą mikro - enzymoimmunologiczną (MEIA), używając testów firmy ABBOTT (Niemcy).

Obecność i ilość HBV-DNA określano izolując wirusowy DNA za pomocą zestawu odczynników „GenElute Mammalian Genomic DNA Kit” firmy „Sigma”. DNA poddawano wielokrotnej amplifikacji, a następnie oznaczano na drodze elektroforezy w 2,0% żelu agarozowym po zabarwieniu bromkiem etydyny. Elektroforegramy wizualizowano w systemie dokumentacji i komputerowej analizy obrazu UVI-KS400i/Image PC firmy „Syngen Biotech”.

DNA z próbek osocza izolowano przy użyciu automatycznej magnetycznej metody ekstrakcji. Początkowo, 500 ml osocza inkubowano z proteinazą K w temperaturze 56°C przez 2 godziny celem wytrawienia białek. Następnie ekstrahowano kwasy nukleinowe z lizatu pozbawionego białka automatyczną metodą magnetyczną EasyMag (bioMerieux, Francja) zgodnie z protokołem badania. Otrzymywano 25 ml roztworu zawierającego DNA.

Stosowano standardową reakcję łańcuchową polimerazy do amplifikacji genu polimerazy HBV. Wykorzystywano primery zgodne z opisanymi przez Allen i wsp. (12) 5'-aga ctc gtg gtc gac ttc tct-3', 5RC 5'- caa aag aaa att ggt aac agc ggt a-3'. W przypadku niskiej wydajności amplifikacji, reakcje PCR przeprowadzono ze starterami 377 5'-gga tgt gtc ggc gtt t-3', 840 5'-acc cca tct ttt tgt ttt gtt agg-3'. Bezpośrednie sekwencjonowanie produktu PCR przeprowadzono stosując BigDye Terminator Sequencing Kit (V.3.1) 3500 i ABI PRISM Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Uzyskane sekwencje zostały porównane z dany-

1 Stan morfologiczny biopiatów wątroby ocenił Prof. dr hab. A Panasiuk w Klinice Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

mi zgromadzonymi w bazie danych NCBI GenBank stosując aplikację NCBI BLAST.

Nie wykonywano u wszystkich pacjentów określenia genotypu, ponieważ w Polsce u 86.6% zakażonych HBV występuje genotyp A (13).

Wszyscy chorzy wyrazili zgodę na uczestnictwo w badaniu zgodnie z protokołem zaakceptowanym przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Analizę statystyczną przeprowadzono wykorzystując program Statistica software, wersja 10.0, testy U Mann – Whitney i Chi – square; znamienność statystyczną przyjęto w przypadkach $p < 0,05$.

WYNIKI

U wszystkich pacjentów aktywność ALT kontrolowano co 3 miesiące, a stężenie HBV-DNA co 6 – 12 miesięcy. U pacjenta w przypadku wzrostu aktywności ALT określano wiramię i mutację HBV. Najwyższa aktywność ALT wśród leczonych pacjentów nie przekraczała 3 krotnie normy. U żadnego pacjenta nie stwierdzono w czasie leczenia gwałtownego, znacznego wzrostu ALT. Średnia aktywność ALT (\pm SE) podczas rozpoczęcia terapii wynosiła 142 ± 62 IU/ml, a w okresie wystąpienia mutacji wirusa 52 ± 24 IU/ml.

Średnia wiramia wśród badanych chorych HBeAg (+) przed leczeniem wynosiła $4,24 \pm 2,32 \times 10^8$ IU/ml i była porównywalna do wiramii wśród chorych HBeAg (-) $1,26 \pm 0,66 \times 10^8$ IU/ml. Nie stwierdzono wpływu wysokości początkowej wiramii na częstość i czas powstawania mutacji (tab.I). Wiramia w okresie mutacji wśród chorych HBeAg (+) wynosiła $1,21 \pm 0,42 \times 10^8$ IU/ml (średnia), a wśród chorych HBeAg (-) $2,38 \pm 1,36 \times 10^7$ IU/ml (średnia).

Mutację wykryto u 96 chorych (29 kobiet i 67 mężczyzn), 27 pacjentów z antygenem HBe oraz 69 HBeAg(-). Nie stwierdzono znamiennych statycznie różnic częstości występowania mutacji w zależności od obecności HBeAg lub jego nieobecności (51,9% v. 56,1%). W grupie chorych z antygenem HBe najczęściej mutacje obserwowano w pierwszych dwóch latach leczenia. W kolejnych latach terapii obserwowano zmniejszenie częstości mutacji. Wśród chorych HBeAg(-) najczęściej do mutacji dochodziło w 2 roku leczenia, w pozostałych latach terapii występowanie mutacji było porównywalne (ryc.1).

Wśród chorych, u których stwierdzono mutację genu polimerazy, biopsję wątroby wykonano u 24 pacjentów z antygenem HBe oraz u 53 bez HBeAg. Nie stwierdzono istotnych różnic wiramii w zależności od nasilenia stanu zapalnego oraz włóknienia (tab.II). Do selekcji mutantów HBV dochodziło szybciej wśród chorych z mniejszym włóknieniem oraz mniej nasilo-

nym odczynem zapalnym, jakkolwiek różnice nie były znamienne statystycznie (ryc.2).

W zależności od miejsca zmiany analogu nukleozydowego rozpoznano 14 rodzajów mutacji, które wystąpiły w przebiegu leczenia LMV i doprowadziły do konieczności zmiany leczenia. Do mutacji najczęściej dochodziło w pozycjach 204, 202, 180 i 169. Czas terapii LMV, w którym dochodziło do mutacji był różny w zależności od obecności HBe lub przeciwciał anti-HBe (tab.III). Najszybciej występowała mutacja punktowa w pozycji 204, średnio w $25 \pm 4,1$ miesiącu terapii chorych z antygenem HBe (81% chorych) oraz w $35 \pm 3,6$ miesiącu wśród chorych z HBeAg(-) (71% chorych). Po następnych 3 miesiącach wśród chorych HBeAg(+) i po 1 miesiącu u chorych HBeAg(-) dochodziło do kolejnej mutacji w pozycji 180 (tab.IV).

DYSKUSJA

Podstawowym celem terapii przeciwwirusowej jest eliminacja HBV, a w przypadku niemożności - zahamowanie jego replikacji pozwalające na ograniczenie progresji choroby. W przebiegu terapii LMV szybko dochodzi do selekcji mutantów opornych na ten lek. W badaniach własnych, po 3 latach terapii LMV obecność mutantów HBV stwierdzano u 31% chorych HBeAg (+) i 26% HBeAg (-), a po 5 latach odpowiednio u 52 i 56% chorych. Wyjściowa wiramia wśród chorych HBeAg(+) i HBeAg(-) była porównywalna, co prawdopodobnie tłumaczy porównywalną częstość występowania mutacji w badanych grupach chorych. Wyniki badań własnych wskazują na rzadsze występowanie mutacji HBV w porównaniu do danych przedstawianych przez innych autorów, a dochodzących nawet do 80% w 5 roku leczenia LMV (14). Wynika to z zależności występowania mutacji od genotypu HBV, poziomu wiramii, czynników zewnętrznych, chorób współistniejących, dodatkowo przyjmowanych leków, jak również zachowań kulturowych. Trudno jest określić, który z tych czynników jest najważniejszy. Akuta i wsp. wykazali większy wpływ geograficznego miejsca zamieszkania pacjentów na zmienną częstość występowania mutacji niż genotypu HBV (A, B, C) (15). Ponadto, obserwowano znaczną zmienność częstości występowania mutacji w zależności od obecności HBeAg lub anti-HBe, w przypadku zakażenia tym samym genotypem (genotyp C) (15). Również w badaniach własnych stwierdzono szybszą selekcję mutantów HBV w grupie chorych z obecnym antygenem HBe.

Mutacje w przebiegu zakażenia HBV występują z częstością średnio 1 na 10^5 skopiowanych zasad w genie polimerazy przy średniej replikacji wirusów około 10^{11} kopii/dobę (14). Terapia AN wykazującymi słabe działanie przeciwwirusowe sprzyja selekcji mutantów

HBV, szczególnie w przypadku wysokiej wirerii (16). Jednak w badaniach własnych nie stwierdzono korelacji pomiędzy częstością występowania mutacji, a wirerią.

Preiss i wsp. nie wykazali różnic wirerii HBV w odniesieniu do nasilenia włóknienia. W badaniach własnych, również nie stwierdzano różnic wirerii w odniesieniu do stanu zapalnego i włóknienia, ale stwierdzano szybsze (ale bez statystycznej znamienności) występowanie mutacji HBV wśród chorych z mniejszym włóknieniem i mniej zaawansowanym stanem zapalnym (17).

W badaniach własnych najwcześniej, średnio w 25 miesiącu leczenia chorych z antygenem HBe i 35 miesiącu w odniesieniu do pacjentów bez antygeny HBe, obserwowano wystąpienie mutacji punktowej w pozycji 204 poprzez zamianę jednego ze znajdujących się tam aminokwasów, metioniny, waliny lub izoleucyny. Obserwacje innych autorów potwierdzają, że tego typu mutacje występują najwcześniej w trakcie terapii AN (18, 19). Pojawiająca się mutacja w pozycji 204 jest wystarczająca do zmniejszenia bariery genetycznej LAM (liczba mutacji prowadzących do utraty lub znaczącego obniżenia aktywności przeciwwirusowej leku). Mutacja w pozycji 204 powoduje zmniejszenie aktywności LMV, jakkolwiek lek ten nadal częściowo działa przeciwwirusowo (20). Jednak mutacja ta jest krzyżowa w odniesieniu do ETV. Jest to szczególnie niekorzystne, ponieważ wystąpienie kolejnej mutacji punktowej w przebiegu terapii LAM i całkowita utrata aktywności przeciwwirusowej przez ten lek znacznie utrudnia możliwości zmiany terapii uwzględniając już występującą, częściową oporność na ETV. Hige i wsp. (21) zwracają uwagę na konieczność ścisłego monitorowanie pacjentów leczonych LMV z mutacją w pozycji 204 celem nie przeoczenia pojawienia się mutacji w pozycji 180. Wystąpienie tej mutacji daje pełną oporność krzyżową z ETV (21). W przeciwieństwie do LMV leczenie ADV i TDF nie powoduje selekcji mutantów krzyżowo opornych do innych analogów. Przystawienie na ADV u pacjentów LMV odpornych nie jest najlepszym wyborem, ponieważ ADV nie wykazuje wysokiej aktywności przeciwwirusowej. Leczenie skojarzone LMV i ADV może zapewnić wyższą skuteczność i może zwiększyć barierę genetyczną w stosunku do LMV, ale niestety ADV może powodować niebezpieczne uszkodzenia nerek (22). Rozwój mutacji w pozycji

194 w trakcie leczenia TDF wykazano tylko u pacjentów zakażonych HIV. Nie opisano tego typu mutacji u chorych z monoinfekcją HBV (23). TDF wydaje się być najlepszym rozwiązaniem w leczeniu pacjentów z opornością na LMV.

Interesujące wydaje się to, że mutacje w pozycji 202, 184 i 173 prawdopodobnie nie powodują oporności na LMV. Jakkolwiek w badaniu własnym ujawniono takie mutacje jako jedyne. Możliwe, że u takich pacjentów dochodzi nie do mutacji typu substytucji aminokwasów, ale zdegenerowania genetycznego kodu (24).

Mutacje w genie polimerazy HBV mogą prowadzić nie tylko do powstania wirusa opornego na AN, ale również na używaną aktualnie szczepionkę (*antiviral drug-associated potential vaccine escape mutant*, ADAP-VEM). Najczęstszą przyczyną takich mutacji jest wieloletnie stosowanie LMV w monoterapii (5, 24). Powstanie mutantów VEM oraz ich rozprzestrzenienie może zniweczyć dotychczasowe osiągnięcia skutecznej profilaktyki skierowanej przeciwko HBV na świecie.

Mutacja w pozycji 204 genu polimerazy jest często występująca wśród chorych z rakiem pierwotnym wątroby (7). Jest to kolejny powód do zmniejszenia częstości stosowania monoterapii LAM.

WNIOSKI

Stosowanie lamiwudyny wpływa na selekcję mutantów HBV w pozycji 180 i 204 genu polimerazy HBV u około 80% chorych HBeAg(+) po 2 latach i po 3 latach u około 80% chorych HBeAg(-). Mutacje te zmniejszają aktywność przeciwwirusową leku i stwarzają ryzyko oporności krzyżowej na ETV. Aktualnie nie ma merytorycznych przesłanek do długoterminowej monoterapii LMV chorych przewlekle zakażonych HBV.

Otrzymano: 30.04.2013 r.

Zaakceptowano do druku: 5.08.2013 r.

Adres do korespondencji:

Tadeusz Wojciech Łapiński
Department of Infectious Diseases and Hepatology,
Medical University of Białystok,
15-225 Białystok, Zurawia str 14
Fax +48 857416921 phone - +48 604 651 709