

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEPATİT B VİRUS X GENİNDEKİ
HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA İLE MUHTEMEL
İLİŞKİSİ OLAN MUTASYONLARIN RETROSPEKTİF
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Engin KAPLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN

MERSİN – 2010

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEPATİT B VİRUS X GENİNDEKİ
HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA İLE MUHTEMEL
İLİŞKİSİ OLAN MUTASYONLARIN RETROSPEKTİF
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Engin KAPLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE FMA (EK) 2010-1 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 177

MERSİN – 2010

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “*Hepatit B Virus X Genindeki Hepatosellüler Karsinoma İle Muhtemel İlişkisi Olan Mutasyonların Retrospektif Olarak Araştırılması*” başlıklı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

18/10/2010



Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Jüri Başkanı/Danışman

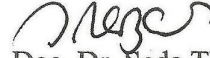


Yrd. Doç. Dr. Aylin DÖĞEN

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 2010/2010 tarih ve 2010/2010 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını ve desteğini gördüğüm Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Aylin DÖĞEN ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŐ başta olmak üzere, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN, Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU, Sayın Doç. Dr. Feza OTAĞ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca labovatuvar ortamında sonsuz yardım ve desteğini gördüğüm hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Aylin DÖĞEN'e en içten duygularıyla tekrar teşekkür ederim.

Bu zorlu süreçte desteğini hiç eksik etmeyen Deniz KAPLAN, eŐi Zekiye KAPLAN ve aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hepatit B Virusunun Tarihçesi, Sınıflandırılması, Genom Yapısı, Replikasyonu, Mutasyonları ve Tedavisi	4
2.1.1. Tarihçe	4
2.1.2. Sınıflandırma	5
2.1.3. Hepatit B Virusu	6
2.1.3.1. Virusun Yapısı	6
2.1.3.2. Genom Yapısı	8
2.1.3.3. Virus Proteinleri	10
2.1.3.4. Yaşam Döngüsü ve Replikasyonu	15
2.1.3.5. Subtip ve Genotipler	20
2.1.4. Hepatit B Virus Mutantları	22
2.1.4.1. X Mutantları	23
2.1.4.2. Kor, Prekor ve Bazal Kor Promotör Mutantları	24
2.1.4.3. S (Yüzey) Mutantları	26
2.1.4.4. Polimeraz Mutantları	27
2.1.5. Patogenez	28
2.1.6. Klinik Belirti ve Bulgular	31
2.1.6.1. Akut İnfeksiyon	31
2.1.6.2. Kronik İnfeksiyon	33

2.1.6.3. Hepatosellüler Karsinoma	35
2.1.7. Epidemiyoloji	36
2.1.7.1. Bulaşma Yolları	36
2.1.7.2. Dünyada HBV İnfeksiyonu	37
2.1.7.3. Türkiye’de HBV İnfeksiyonu	39
2.1.7.4. HBV İlişkili Hepatosellüler Karsinoma Epidemiyolojisi	40
2.1.8. Tedavi	42
2.1.8.1. İmmunomodülatör İlaçlar	44
2.1.8.1.1. İnterferon ve Pegile interferon tedavisi	44
2.1.8.2. Nükleozid Analogları	45
2.1.8.2.1. Lamivudin	45
2.1.8.2.2. Adefovir	46
2.1.8.2.3. Entecavir	47
2.1.8.2.4. Telbivudine	48
2.1.8.2.5. Tenofovir	48
2.1.9. Korunma ve Kontrol	49
2.1.10. Tanı	52
2.1.10.1. Serolojik Tanı Yöntemleri	53
2.1.10.2. Moleküler Tanı Yöntemleri	57
2.1.10.3. HBV İlaç Direncinin Saptanması	58
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	61
3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler	61
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	61
3.2.1. Kullanılan Cihazlar	61
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	62
3.2.3. Kullanılan Çözeltiler	64
3.3. Yöntemler	66
3.3.1. Moleküler Analiz	66
3.3.1.1. HBV DNA Örneklerinin Hazırlanması	66
3.3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	67
3.3.1.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi	69
3.3.1.4. Hedeflenen PZR Ürününün Tespiti ve Analizi	70

3.3.1.5. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması	71
3.3.2. Sekans Reaksiyonu	71
3.3.2.1.Dizi Analizinde Kullanılacak Olan Sekans Camlarının Hazırlanması	73
3.3.2.2.Jel Solüsyonunun Hazırlanması ve Cam Kasete Dökülmesi	74
3.3.2.3.Elektroforez	75
3.3.2.4.Sekans Jelinin Gümüş Boyanması	76
3.3.2.5.Görüntüleme	78
3.3.2.6.Değerlendirme	78
4. BULGULAR	79
4.1.Moleküler Analiz Sonuçları	79
4.1.1.PZR Aşaması	79
4.1.2.Gümüş Boyama DNA Dizi Analizi Sonuçları	80
5.TARTIŞMA	85
6.SONUÇLAR ve ÖNERİLER	90
7. KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ	100

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. HBV virionunun yapısı. Ultrastrüktürel yapıdaki üç farklı partiküle ait elektron mikroskop görüntüsü	7
Şekil 2.2. HBV virionunun yapısı. Virion ve komponentleri	7
Şekil 2.3. S ve C ORF'lerinin farklı okuma bölgeleri	9
Şekil 2.4. HBV'nin genom organizasyonu	10
Şekil 2.5. HBV protein transkripsiyon bölgeleri	13
Şekil 2.6. HBV'nin yaşam döngüsü	18
Şekil 2.7. HBV transkripsiyonunu kontrol eden cis-elementler ve genom lokalizasyonları	19
Şekil 2.8. Kor proteinlerinin immünolojik epitopları	25
Şekil 2.9. HBV'nin S ve P gen bölgelerinin üst üste gelen kısımları	27
Şekil 2.10. Akut hepatit B dönemi doğal seyri	33
Şekil 2.11. HBV yüzey antijen prevalansı	38
Şekil 2.12. T.C Sağlık Bakanlığı 1990-2004 yılları arası hepatit B vaka ve ölüm sayıları bildirim raporu	39
Şekil 2.13. T.C Sağlık Bakanlığı 1990-2004 yılları arası hepatit B vakalarının yaş gruplarına göre dağılımı	40
Şekil 2.14. Hepatosellüler karsinoma ile HBV insidansı arasındaki paralel coğrafik ilişki	41
Şekil 2.15. HBV serolojik belirteçlerinin zamansal sıralaması	55
Şekil 4.1. Semineded PZR yöntemi elde edilen PCR ürünlerinin % 1,5'lik agaroz jel elektroforezi ile gösterilmeleri	79
Şekil 4.2. Dizi analizi yapılan HBx geni bölgesi primer bağlanma pozisyonları ve amplifikasyonu yapılan bölge	80
Şekil 4.3. HBV X gen kor promoter / prekor bölgesinde tespit edilen Nt.1893 G-A, Nt.1762 A-T ve Nt.1764 G-A mutasyonları ve 1653 C-T mutasyonu	84
Şekil 5.1. HBV X geninin Enhansır II, BCP ve PreC geninin üst üste çakışan bölge dizileri	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. HBV açık okuma bölgeleri ve proteinleri	15
Çizelge 2.2. HBV genotip ve subgenotiplerinin karakteristik özellikleri	21
Çizelge 2.3. Kronik Hepatit B dönemi ve klinik seyirleri	35
Çizelge 2.4. Kronik HBV enfeksiyonunda kullanılan tedavilerin etkinliği	43
Çizelge 2.5. Hepatit B aşısı şeması	51
Çizelge 2.6. HBV enfeksiyonunun serolojik göstergeleri ve önemleri	52
Çizelge 2.7. HBV enfeksiyon tanısında ve izlenmesinde enfeksiyon periyotları ve serolojik göstergeleri	53
Çizelge 2.8. HBV ilaç direncinin saptanmasında kullanılan test yöntemlerinin karşılaştırılması	58
Çizelge 3.1. Kullanılan çözeltiler, içerik ve miktar bilgisi	64
Çizelge 3.2. Hedef bölge ile ilgili primer dizileri	67
Çizelge 3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu 1. ve 2. tur reaksiyon karışımları	68
Çizelge 3.4. Isı döngü cihazında kullanılan PZR koşulları	69
Çizelge 3.5. Sekans reaksiyon karışımı	72
Çizelge 3.6. Sekans analizinde kullanılan reaksiyon şartları	72
Çizelge 4.1. AY721609 nolu referans dizi	81
Çizelge 4.2. Çalışılan hasta grubu ve belirlenen mutasyonlar	82
Çizelge 4.3. Belirlenen mutasyon tipleri ve oranları	83

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADV	Adefovir Dipivoksil
ALT	Alanin Aminotransferaz
AHB	Akut Hepatit B
APC	Antijen sunucu hücre
BCP	Bazal kor promotör
cccDNA	Kovalent olarak kapalı sirküler DNA
CTL	Sitotoksit T lenfosit
DHBV	Ördek hepatit B virusu
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR	Direk tekrar
dGTP	Deoksiguanozin trifosfat
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
Et-Br	Etidyum bromid
ETV	Entekavir
HBcAg	Hepatit B kor antijeni
HBsAg	Hepatit B zarf antijeni
HBIG	Hepatit B hiperimmünglobülin
HBsAg	Hepatit B yüzey antijeni
HBx	Hepatit B X gen gölgesi
HBV	Hepatit B virusu
HIV	İnsan immünyetmezlik virusu
HLA	İnsan lenfosit antijen
HSK	Hepatosellüller karsinoma
GSHV	Sincap hepatit virusu
IFN	İnterferon
IgG	İmmünglobülin G
IgM	İmmünglobülin M
KHB	Kronik Hepatit B
LHBs	Büyük boyutlu yüzey antijeni

LMV	Lamivudin
MHC	Doku uygunluk kompleksi
MHBs	Orta boyutlu yüzey antijeni
mRNA	Mesajcı RNA
NK	Doğal öldürücü hücre
ORF	Açık okuma bölgesi
pgRNA	Pregenomik Ribonükleik asit
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
SHBs	Küçük boyutlu yüzey antijeni
Tc	Sitotoksit T lenfosit
Th	Yardımcı T lenfosit
TNF	Tümör nekroz faktör
YMDD	Tirozin (Y) metiyonin (M), aspartat (D), aspartat (D)
Nt	Nükleotid

ÖZET

Hepatit B virus X Genindeki Hepatosellüler Karsinoma İle Muhtemel İlişkisi Olan Mutasyonların Retrospektif Olarak Araştırılması

Günümüzde Hepatit B virus (HBV) enfeksiyonu halen global bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Tüm dünyada 2 milyar'dan fazla kişi bu virus ile enfektedir. HBV enfeksiyonları, akutdan fatal fulminant hepatit'e kadar değişen klinik tablolarda ortaya çıkmakta ve karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinoma (HSK) gibi ciddi komplikasyonlara sebep olmaktadır. Bu virusun kuvvetli bir onkojenik potansiyeli vardır.

Son zamanlarda yapılan birçok çalışma HBV X (HBx) geni kapsamındaki Enh II/bazal kor promotör bölgesindeki mutasyonların HSK ile ilişkili olduğu bildirmiştir. X geni, HBV promotörünü ve çeşitli hücresel fonksiyonları transaktive eden HBV X proteinini kodlamaktadır. HBx proteini modifiye olduğunda, hücresel sinyal yollarında HSK'ya kadar ulaşan hücresel transformasyonlar indüklenmektedir.

Bu çalışmada, HSK ile olası ilişkisi olan HBx gen mutasyonları, 61 kronik hepatit B'li hasta serumundan retrospektif olarak analiz edilmiştir.

Çalışmamızda, 61 örneğin 1'inde (%1.63) 1653T mutasyonu, 10 örnekte (%16.39) 1896A mutasyonu, 3 örnekte (%4.91) 1762T mutasyonu ve 1 örnekte (%1.63) 1762T-1764A dual mutasyonu tespit edilmiştir.

1653T ve 1762T-1764A dual mutasyonları, daha önceleri bildirilen çalışmalarda HSK ile önemli ölçüde ilişkili olan mutasyonlar olarak ileri sürülmüştür.

HBx gen mutasyonlarını retrospektif olarak araştırmış olmakla beraber, bulgularımız bölgemizde HSK ile ilişkili olan mutasyonların varlığını ortaya koymakta, ayrıca gelecekte prospektif klinik kord çalışmalarının planlanmasının HSK takibine yönelik olarak daha iyi hasta tedavisine katkı sağlayacağını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B virusu, Kronik Hepatit B, X gen mutasyonları, Hepatosellüler Karsinoma, Direk Sekans Metodu

ABSTRACT

Retrospective Analysis of Hepatitis B Virus X Gene Mutations Potentially Related with Hepatocellular Carcinoma

Hepatitis B virus (HBV) infection is a global health problem with more than 2 billion infected individuals. HBV infection leads to diverse outcomes ranging from acute to fatal fulminant hepatitis, and chronic hepatitis, which may result in severe complications as liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). HBV virus is one of the important human DNA viruses having strong oncogenic potential.

Recently, many studies have reported on HBV X gene mutations and/or Enh II/BCP associated with HCC. The X gene encodes the HBV X protein (HBx) that transactivates the HBV promoter and a variety of cellular functions. The HBx-modified cellular signal pathway induces cell transformations that can lead to HCC.

In this study, we have analyzed HBx gene mutations possibly related to HCC from sera samples collected from 61 patient chronically infected with HBV, retrospectively.

We have detected T1653 mutation in 1 of 61 (1.63%), 1896A mutation in 10 of 61 (16.39%), 1762T mutation in 3 of 61 (4.91%) and 1762T-1764A dual mutation in 1 of 61 (1.63%). 1653T and 1762T-1764A dual mutations were suggested significantly related to HCC in earlier reported studies.

Although, we have studied HBx gene mutations retrospectively, our findings demonstrated that HBx gene mutations related to HCC are present in our region and prospective clinical cohort studies would be useful for better patient management to follow HCC related with HBV should be planned in future.

Key Words: Hepatitis B virus, Chronic Hepatitis B, X gene mutations, Hepatocellular Carcinoma, Direct Sequencing Method

1. GİRİŞ

Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirus genusunda yer alan hepatit B virusu (HBV) özellikle karaciğer hücrelerine tropizm gösterir. HBV, *Hepadnaviridae* ailesinin üyeleri içinde insanlarda infeksiyon oluşturan tek türdür (1, 2).

İlk defa M.Ö. beşinci yüzyılda tanımlanmış olan viral hepatitlerin kan ve kan ürünleri yoluyla salgın oluşturduları 1883 yılında Bremen’de çiçek aşılması sırasında dökümanite edilmiştir. HBV’nin kan yoluyla bulaşan sarılık etkeni olduğu ilk defa Blumberg ve Alter’in 1965’de “Avustralya antijeni”ni bulmasıyla tanımlanmıştır (1).

HBV 42 nm çapında sferik biçimde ve zarflı bir virustur. HBV kısmen çift sarmallı olan yaklaşık 3200 nükleotid uzunluğunda sirküler DNA genomu içerir (3, 4).

HBV genomu temel olarak dört açık okuma bölgesi içermekte olup S (yüzey), C (kor), P (polimeraz) ve X gen bölgelerinden oluşan bir organizasyona sahiptir. Bu gen bölgeleri belirli dizilerde üst üste çakışan bir yapıya sahiptir ve farklı başlangıç ve bitiş kodonlarının okunmasıyla farklı gen bölgeleri ifade edilir (2, 5).

Filogenetik analizler temelinde HBV’nin birbirlerinden yaklaşık % 8 oranında farklılık gösteren 8 genotipi var olup, bu genotipler kendine özgü bir coğrafik dağılım gösterirler (6).

HBV infeksiyonu tüm dünyayı tehdit eden bir sağlık problemidir. Dünyada 2 milyar insan HBV ile infekte olup bunun 360 milyonu kronik olarak infektedir. HBV infeksiyonu her yıl 0,5 ile 1,2 milyon ölüme sebep olmaktadır (3).

Tüm dünyada HBV infeksiyonunun en yaygın bölgeleri Güney Asya ve Sahra altı Afrika olup bu bölgeler dünya nüfusunun % 45’nin barındığı ve HBV taşıyıcılarının yaklaşık % 75’nin yaşadığı bölgelerdir (3, 7).

HBV temel olarak parenteral yolla, infekte kan ve sıvılarla, perkutan ve mukozal temas, infekte kişiyle cinsel ilişki ve perinatal yollarla bulaşabilmektedir (1).

HBV infeksiyonu akut hepatit B (AHB), kronik hepatit B (KHB), siroz ve hepatosellüler karsinoma (HSK) ile sonuçlanabilen geniş spektrumda karaciğer hastalığı oluşturabilmektedir (8).

Akut infeksiyon sırasında olguların bir kısmında HBV'nin karaciğerden temizlenmesinde başarılı olunamaz ve altı ayı aşan HBsAg pozitif serolojik göstergesi, kronik infeksiyon başlangıcı olabilmektedir (9).

HBV esas olarak karaciğer hücreleri için sitopatik değildir. Kronik infeksiyonun klinik seyirlerinde serolojik göstergeler farklılık göstermekle birlikte, kronik infeksiyon sırasındaki karaciğer hasar şiddeti konak immün cevabın şiddeti ile doğru orantılıdır (10, 11).

HBV kuvvetli bir onkojenik potansiyele sahiptir. KHB hastalarında HSK gelişimindeki hücreyel yolaklar ve oluşma zamanları net olarak bilinmemektedir (12). HSK gelişiminin, HBV'nin yüksek replikasyon oranı ve sonucunda oluşan viral yükün şiddetli immun yanıt ile karşılaşmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Özellikle HBV genomunun çeşitli gen bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu immun cevap kaçış mekanizmalarının gelişmesi ve HBV DNA entegrasyon süreçlerinin de HSK gelişimi ile ilişkisi vurgulanmaktadır (13, 14).

Uzun süreli virus infeksiyonları ile ilişkili oluşabilen kanser çeşitlerinin tanısında birçok serolojik belirteçler bulunmaktadır, ancak kanserin erken tanısında yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu temelde, birçok kanser türünün erken tanısı için potansiyele sahip olabilecek yeni marker arayışları yapılan moleküler temelli çalışmalarla devam etmektedir (15).

HSK gelişiminde yüksek potansiyele sahip olduğu düşünülen HBV'nin mutant formlarına ait çeşitli mutasyon profillerinin etkileşim mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. HSK kapsamında HBV mutant formlarına ait belirli mutasyonların infekte konakta oluşturduğu spesifik etkiler, moleküler epidemiyolojik çalışmalar temelinde istatistiksel olarak ilişkilendirilmeye çalışılmaktadır (16).

HBV ve oluşturduğu hastalığın en ileri formu olan HSK arasındaki ilişkinin çalışıldığı birçok çalışmada, regülatör gen bölgelerini barındıran, HBx gen bölgesi ön plana çıkmaktadır (5).

HBx genindeki genetik varyasyonların hastalığın klinik prognozunu etkilediği ve farklı onkojenik potansiyeller ortaya koyduğunu belirten çalışmalar yayımlanmaktadır, ancak HBx geninin genetik değişkenliği ile klinik önemi hakkındaki bilgi ve bulgular halen kısıtlı ve tartışmalıdır (2).

Çalışmamızdaki amaç, özellikle bölgemizdeki populasyonda KHB tanısı konmuş hastalardan izole edilen HBx DNA'sındaki genetik heterojenite ve literatürde onkojenik potansiyele sahip olduğu bildirilen çeşitli mutasyonların araştırılmasıdır. Bu çalışma ile özellikle kendi coğrafyamıza ait ve moleküler epidemiyoloji bakımından oldukça önemli olan ilk verilerin bilim dünyasına kazandırılması sağlanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatit B Virusunun Tarihçesi, Sınıflandırması, Genom Yapısı, Replikasyonu, Mutasyonları ve Tedavisi

2.1.1. Tarihçe

Viral hepatitler insanlık tarihi kadar eskidir. İlk kez Hipokrat tarafından kaydedilen bu hastalık, büyük salgınlara ve kayıplara yol açmıştır (17). Antik çağlardan beri bilinen sarılıkta, salgın hastalığa virusun neden olabileceğini 1908'de Mc Donald ifade etmiş, 1912'de Cockayne epidemik formu tanımlamış ve 'infeksiyöz hepatit' olarak adlandırmıştır (18).

Bu salgınlara çoğu muhtemelen hepatit A virusu (HAV)'na bağlı olduğu halde HBV'nin epidemik bulaşı kan ve kan ürünleri kullanımının yaygın olduğu yerlerde gözlenmeye başlamıştır (1).

Doğrudan kan ve kan ürünleri ile bulaşan hepatit formu ilk kez 1883 yılında Lurman tarafından tanımlanmıştır. Bremen'de çiçek aşısı yapılan 1.289 tersane işçinin 191'inde aşı uygulamasından sonra, bir kaç hafta ile 8 ay arasındaki süre içinde sarılık ortaya çıktığı saptanmış, aşılanmamış kişiler ise sağlıklı kalmışlardır. Yirminci yüzyılın ilk yarısında kızamık ve kabakulak immun profleksisi amacıyla plazma verilen kişiler ile insan serumu içeren sarı humma aşısı yapılan askeri personelde ve kontamine iğnelerin kullanıldığı cinsel yolla bulaşan hastalıklar kliniklerinde tedavi gören hastalarda sarılık salgınlar görülmeye başlamış; II. Dünya Savaşı sırasında kan transfüzyonu yapılan askerlerde ciddi sorunlara neden olmuştur (1).

1943 yılında ABD'de bulaşıcı hepatit 'infeksiyöz hepatit' olarak isimlendirilmiş, İngiltere Sağlık Bakanlığı aynı yıl kan, plazma, serum naklinden sonra gelişen sarılıkları 'homolog serum sarılığı' adı altında toplamıştır (2). Blumberg ve arkadaşlarının 1963 yılında Avusturyalı bir yerlinin serumunda günümüzde "HBsAg" olarak bilinen "Avustralya antijeni-Au antijeni"ni saptamasıyla virus hepatitleri tarihinde yeni bir dönem başlamıştır. Blumberg'in Avusturyalı yerli bir hastanın kanında Avusturya

antijenini bulmasıyla hepatit serolojisinde yeni bir çığır açılmıştır. 1965'teki bu buluşlarıyla araştırmacılar Nobel dl kazanmışlardır (18).

Dane ve arkadaşları 1970'de HBV'nin kısmen saflaştırılmış preparatlarının elektron mikroskopik incelemelerinde üç değişik partiküle rastlamışlardır. Bunlardan infektif özelliğe sahip, 42 nm çapında olanlara "Dane partikülü" adı verilmiş ve sonraki yıllarda, kor antijeni, DNA polimeraz ile viral DNA tanımlanmıştır 1974'te virüsün zgl DNA'sı tanımlanmıştır (1). Bu buluşlarla son 35 yıl içinde HBV'nin moleküler biyolojisi, epidemiyolojisi, patogenezi, tanı ve tedavisi ile korunma yönünden çok önemli gelişmeler yaşanmıştır (19).

2.1.2. Sınıflandırma

HBV, *Hepadnaviridae* ailesinin bir üyesidir. *Hepadnaviridae* ailesi memeli ve kuşlara tropizm gösteren ve DNA polimerazı bulunan, ters transkriptaz aktivitesi sonucu meydana getirilen genomik RNA' nın transkripsiyonu yoluyla replike olan bir gruptur (2).

Hepadnaviridae ailesinde bulunan virusların, konak farklılığı, virion ince yapısı, polipeptit büyüklüğü, gen sayısı, genom nükleotid dizi homolojisi ve antijenik çapraz reaksiyonları dikkate alındığında, memeli hayvan viruslarının bulunduğu orthohepadnavirus (HBV, WHV, GSHV) ve kanatlı hayvan viruslarının bulunduğu avihepadnavirus (DHBV) olmak üzere iki cins altında sınıflandırılması önerilmektedir (20).

HBV'nin keşfinden sonra bazı memeli hayvanlar ile kuşlarda hepatite neden olan farklı yeni viruslar bulunmuştur. HBV araştırmalarında önemli bir gelişme HBV'nin *Hepadnaviridae* adı verilen virus ailesinin prototipi olmasının keşfidir. HBV'nin bu grup ile olan yakın ilişkisi *Marmata monax* (bir cins dağ sıçanı) cinsinde bulunan "woodchucks hepatitis virus" (WHV) ve sincaplarda bulunan "ground squirrel hepatitis virus" (GSHV)'de de görülmüştür (1). Yapılan nükleotid dizi analiz çalışmaları sonucunda HBV ile GSHV ve WHV arasında yaklaşık % 70 homoloji bulunduğu gösterilmiştir. Ancak her iki virus (WHV ve GSHV) da kendilerine özgü türler dışındaki diğer türlerde (insan ve primatlarda) infeksiyon oluşturmazlar. DNA

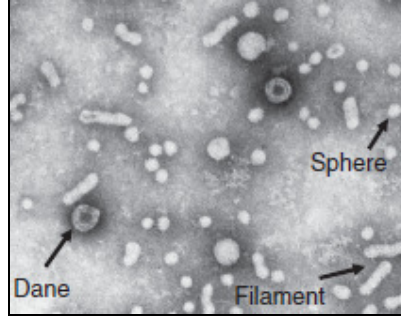
sekansları ve genom organizasyonları arasındaki benzerlikleri temelinde memelileri infekte eden viruslar Orthohepadnavirus genusu içinde değerlendirilmiştir. Genom organizasyonu olarak benzerlik göstermesine rağmen sekans homolojisi göstermeyen ilişkili viruslar ise ördekler ve kazlarda keşfedilmiş ve bu viruslar ise avihepadnavirus genusunda değerlendirilmiştir. Bu virus grupları arasındaki yapısal homoloji temelinde “Duck hepatitis B virus” (DHBV) hepadnavirus ailesinin nasıl replike olduğuna dair araştırmalarda ilk olarak kullanılan model sistemler için kullanılmıştır. WHV infeksiyonları ise kronik karaciğer hastalığı ve ilişkili karaciğer kanseri araştırmalarında model olarak kullanılmıştır (2).

2.1.3. Hepatit B Virusu

2.1.3.1. Virusun Yapısı

HBV, *Hepadnaviridae* ailesinin orthohepadnavirus cinsinde yer alan hepatotropik bir virustur. HBV zarflı yapıda ve kısmen çift sarmallı bir sirküler DNA virusudur (2, 21).

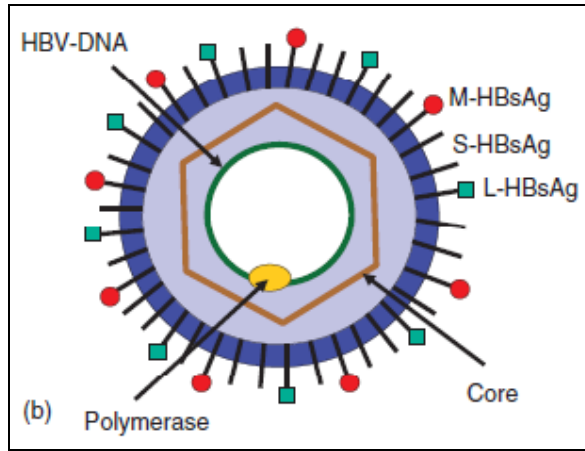
Hepadnaviridae ailesinin üyeleri içinde insanlarda infeksiyon oluşturan tek tür HBV'dir. Diğer *Hepadnaviridae* üyeleri kemirgen ve kuşlarda endemiktir. İnfekte hücrelerde birden fazla sayıda partikül tipi oluşumuna yol açması nedeniyle diğer hayvan viruslarından farklı bir yere sahip olan HBV'nin, kısmen saflaştırılmış preparasyonları elektron mikroskopunda incelenecek olur ise; büyüklük, yapı ve miktar gibi değişik özellikleri bakımından birbirine benzemeyen üç tip partiküle rastlanır. Bunlar, 42-47 nm çapında, infeksiif özellikte, tam bir virion yapısında, küresel şekilli, Dane partikülleri, 16-25 nm çapında, içinde nükleik asit bulunmayan, non-infektif, küresel partikülleri ve özellikle replikasyonun söz konusu olduğu kişilerin serumunda bulunan 22 nm çapında ve 50-500 nm uzunluğunda nükleik asit ihtiva etmeyen, noninfektif, tübüler partiküllerdir (Şekil 2.1) (1, 2, 20).



Şekil 2.1. HBV virionunun yapısı. Ultrastrüktürel yapıdaki üç farklı partiküle ait elektron mikroskobu görüntüsü (22).

Dane partikülü olarak da isimlendirilen virionların yapısı kompleksdir; yaklaşık 7 nm kalınlıkta, lipid içeren zarfı vardır ve bu zarf 27 nm çaptaki iç çekirdeği çevreler (23).

Virusun gelişimini ya da endoplazmik retikulum ve golgi arayolları temelli salgısal yollarla taşınmasını sağlayan viral membran, üç viral protein içeren yüzeysel yapıyı oluşturur. Bu proteinler, virusun endoplazmik retikulum içindeki gelişimi sırasında gerekli olup büyüklüklerine göre, küçük (SHBs/S-HBsAg), orta (MHBs/M-HBsAg) ve büyük (LHBs/L-HBsAg) yüzey antijenleri olarak isimlendirilmektedir (Şekil 2.2) (21).



Şekil 2.2. HBV virionunun yapısı. Virion ve komponentleri (22).

2.1.3.2. Genom Yapısı

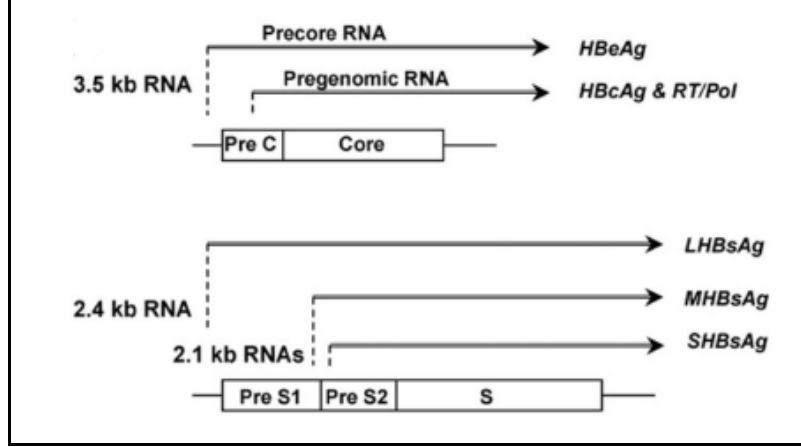
HBV genomu, çembersel, kısmen çift zincirli olan 3200 nükleotid uzunluğunda bir DNA molekülü içerir. Virus proteinlerini kodlayan uzun zincir (L veya negatif polariteli zincir) 3200 nükleotid taşır ve kısa olan zincir (S veya pozitif polariteli zincir) 1800-2700 arası nükleotid içermesi temelinde uzunluğu değişkendir. HBV DNA'nın çember şeklindeki yapısal bütünlüğü, her iki zincirin 5' uçlarından birbirine tutunması ile gerçekleşir (24). DNA'nın molekül ağırlığı $2,3 \times 10^6$ dalton, G+C oranı ise yaklaşık % 49'dur. Bilinen hayvan DNA virusları içinde en küçük olanıdır. HBV DNA birbirleri ile içe içe olan S, C, X ve P kısaltmaları ile gösterilen 4 açık okuma bölgesi (Open Reading Frame-ORF) içerir. HBV genomu bazı bölgelerinde üst üste çakışan bir kodlama organizasyonuna sahiptir (Şekil 2.4) (21, 22, 24).

HBV, proteinleri sentezlerken, aynı genomik dizileri kayan çerçeveler esasına göre farklı ORF'ler olarak kullanır. Genomdaki nükleotid dizilerinin yarısı, birden fazla mRNA sentezi için kullanılır. Ayrıca aynı ORF içerisinde birden fazla başlangıç kodonu bulunur. Bu şekilde birbiri ile ilişkili, birden fazla proteinin sentezi sağlanır. Enhansörler, promotörler ve replikasyon sinyalleri gibi bütün regülatör elementler ORF'ler tarafından kodlanır (26).

S (surface-yüzey) geni 2848-833 nükleotid aralığını kapsayıp PreS1, PreS2 ve S bölgelerini içerir ve viriondaki zarf proteinlerini (HBsAg) ve diğer partiküllerdeki tamamlanmamış HBsAg'yi kodlar. S dizisi, preS2+S dizisi ve preS1+preS2+S dizisi tarafından kodlanan 24 (SHBs), 33 (MHBs) ve 39 (LHBs) kDa'lık proteinlerdir. 20 nm'lik partiküller saf S geninin kodladığı polipeptidleri, tübüler partiküller ise küçük ve orta proteinleri içerir. Büyük proteinler ise HBsAg olarak virionun yüzeyinde yer alır (Şekil 2.3-2.4) (23, 24, 27).

S genine benzer şekilde, C (core-nükleokapsid geni) ORF, prekor ve kor bölgeleri temelinde translasyonun kor ya da prekor bölgesinden başlamasına göre sırasıyla viral nükleokapsid antijeni (HBcAg) ve e antijeni (HBeAg) kodlanır (28). C geni, 1814-2450 nükleotid aralığını kapsayıp 21 kD'lık "kor" (çekirdek) nükleokapsid polipeptidini (HBcAg) kodlar. Bu proteinin 17,5 kDa'lık bölümü HBeAg'dir. Translasyon C başlangıç kodonundan başladığında tam uzunluktaki C polipeptidi (HBcAg) sentezlenir; preC başlangıç kodonundan başladığında ise HBeAg sentezlenir.

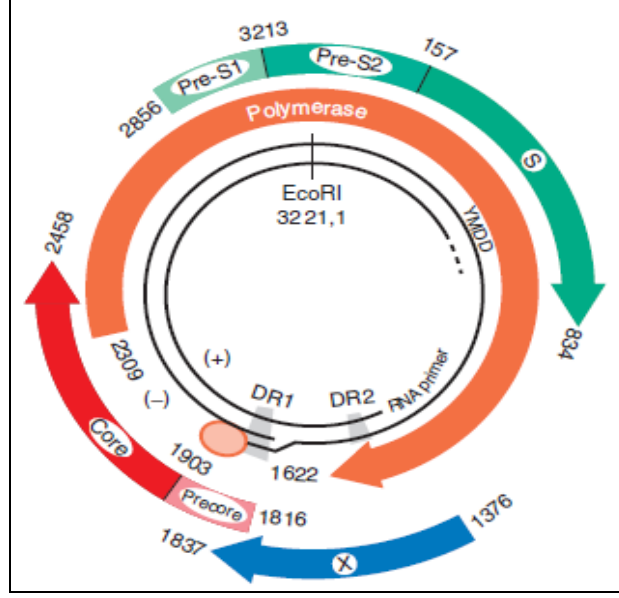
Bu olay preC dizisinin sinyal dizi gibi davrandığını düşündürür. PreC dizisinde, stop kodon mutasyonu taşıyan HBV mutantlarında HBeAg sentezlenememekte ancak HBcAg sentezlenmektedir (Şekil 2.3-2.4) (23, 24, 27).



Şekil 2.3. S ve C ORF'lerinin farklı okuma bölgeleri (28).

P (pol veya polimeraz) geni, 2357-1621 nükleotid aralığını kapsayıp, viral genomun $\frac{3}{4}$ 'ünü oluşturur. C geninin karboksi uç kısmını, tüm S genini ve X geninin aminoterminal bölümünü kapsar. DNA polimeraz, ters transkriptaz ve Ribonükleaz H (RNase-H) aktivitesine sahip 90 kDa'lık temel polipeptidi kodlar. Ayrıca DNA (-) zincir sentezi için bir protein başlatıcı gibi davranmaktadır (Şekil 2.4) (23, 24, 27).

X geni, 1374-1836 nükleotid aralığını kapsayıp 154 aminoasitlik X proteinini kodlar. Nükleotid uzunluğu temelinde en küçük gendir. X geni N-terminal ucunda P geni, C-terminal ucunda ise PreC gen bölgeleriyle çakışır (Şekil 2.4) (28).



Şekil 2.4. HBV'nin genom organizasyonu (29)

2.1.3.3. Virus proteinleri

Yüzey Proteinleri

PreS/S geni ürünleridir ve HBV'nin yüzey (HBs) proteinlerini oluştururlar. HBV S geni üzerinde başlangıç kodonları farklı ancak ortak 3' ucuna sahip üç ayrı gen bölgesi bulunmaktadır. PreS1 gen bölgesi 2850-3174. nükleotidler arasında, PreS2 3174-157. nükleotidler arasında yer alır. S gen bölgesi ise 157-833. nükleotidler arasında yer alır (Çizelge 2.1) (30, 31).

Yüzey proteinleri, 2,1 ve 2,4 kb'lik subgenomik mRNA'dan sentezlenirler. Yüzey proteinleri, nükleokapsidin zarfını kazanması için gereklidir. Her üç yüzey proteini (SHBs, MHBs, LHBs) deglikozillenmiştir ve Dane partikülünde yer alır. LHBs ve MHBs, Dane partikülünde eşit miktarda bulunurlar ve tüm yüzey proteinlerinin % 30'unu oluştururlar. SHBs ise Dane partikülünden 100 kat daha fazla sentezlenir ve infekte hücreden salınır. Dane partiküllerinde LHBs: MHBs: SHBs oranı yaklaşık 1:1:4 şeklindedir (32). Kanda dolaşan S geni ürünlerinin yaklaşık % 5-15'i MHBs, % 1-2'si LHBs ve geri kalan kısmı SHBs proteininden oluşmaktadır (4).

SHBs sentezi için okuma işlemi üçüncü başlangıç kodonundan başlarsa S bölgesi okunarak kılıfın SHBs proteini sentezlenir. Bu protein 24 kDa molekül ağırlığında, 226 aminoasitten oluşmuş bir proteindir. HBsAg'nin büyük kısmını oluşturan SHBs kılıfın major proteini olarak bilinir ve B lenfositleri için epitop özelliğine sahiptir (31, 33). SHBs'yi oluşturan aminoasitlerin belli bölgelerinde diziliş farklılıkları vardır. Bu farklılıklar temelinde HBsAg üzerinde en az 5 antijenik determinant (a,d/y ve w/r) gözlemlenir (33).

MHBs protein sentezi, S geninin ikinci başlama kodonunun başlaması temelinde PreS2 ve S bölgelerinin ifade edilmesiyle gerçekleşir. MHBs proteini 33 kDa molekül ağırlığında ve 281 aminoasitten oluşur (33). Her üç partikül tipinde bulunan MHBs proteini, virion ve tübüler partiküllerde en az, küresel partiküllerde ise LHBs'de daha fazladır. Replikasyonun olmadığı durumlarda HBsAg içinde yer almaması dikkate alındığında, asemptomatik HBsAg taşıyıcılarında az miktarda bulunur. MHBs proteinin HBV'nin karaciğer hücrelerine tutunmasında rolü olduğu düşünülmektedir (34). MHBs yüzey proteini ile birlikte filamentöz partikülleri, yalnız başına ise sferik partikülleri oluşturur. Enfekte kişilerde kana salınan ve fazla miktarda bulunan sferik ve filamentöz partiküller antikorlarla kompleks oluşturur ve hastalık sırasında görülen immun kompleks sendromlarına neden olurlar (4).

LHBs protein sentez süreci ise S geninin ilk kodonundan başlayıp PreS1, PreS2 ve S bölgelerinin tümünün okunmasıyla başlar. LHBs proteininin en büyük S geni proteini olması üç gen bölgesinin tümünün okunmasına dayanır. LHBs protein 389-400 aminoasitlik ve 39 kDa moleküler ağırlığında olan bir moleküldür (Çizelge 2.1) (33). LHBs ise hücreden dışarı salınmaz ve fazla sentezlendiğinde hücre içinde birikir. HBV replikasyonu sırasında endoplazmik retikulum zarına transmembranöz olarak yerleşen LHBs'lerin iç kısımda kalan dizileri, nükleokapsidin zarfını kazanmasını sağlarken: membranın dışına yerleşen dizileri, virusun infekte edeceği hücre için reseptör görevini üstlenir (4).

Kor proteinleri

HBV genomunun C geni üzerinde, okuma işleminin başladığı iki farklı başlama kodonu (1816.ve 1903.nt) yer alır. Buna bağlı olarak prekor ve kor olmak üzere iki bölgeye ayrılır. C geni temelinde antijenik özellikleri farklı, HBeAg ve HBcAg proteinleri sentezlenir. 1816 ve 1903.nt arasında yer alan prekor bölgesi 29 aminoasitlik bir peptidin üretiminden sorumludur (Şekil 2.5) (31). C geninin esas ürünü HBcAg olup virus genotipine bağlı olarak 183 ya da 185 aminoasitlik bir yapıya sahiptir. HBeAg, HBcAg'nin sentezinin post-translasyonel süreci sonrasında son halini alan ikincil ürün olarak düşünülebilir. Post-translasyonel süreçte, endoplazmik retikulumda konak proteazları, proteinin karboksi terminalini ayırır ve HBeAg oluşur (Çizelge 2.1) (35).

Prekor dizisi, aynı gen tarafından sentezlenen polipeptidlerin sitoplazmaya mı yoksa endoplazmik retikuluma mı gideceğinin belirlenmesinde, karboksi-terminal uçtaki DNA bağlayan kısmın konak hücre tarafından uzaklaştırılmasında, hücre membranlarında protein birikmesinde rol oynayan bir dizidir (31). HBeAg'nin replikasyon için de gerekli olmamasıyla birlikte tam fonksiyonu bilinmemektedir. HBcAg'nin sadece karaciğer dokusu içinde saptanmasına rağmen HBeAg hücreden dışarı salınır. HBcAg ile çapraz immüno-aktivitesi nedeniyle, konak immün yanıtını virusla infekte hücrelerden uzak tutma görevini üstlendiği düşünülmektedir. Bu görevinin dayandığı nokta ise, HBeAg sentezlemeyen mutant viruslarla oluşan infeksiyonlarda daha ağır hepatik hasar görülmesidir (4).

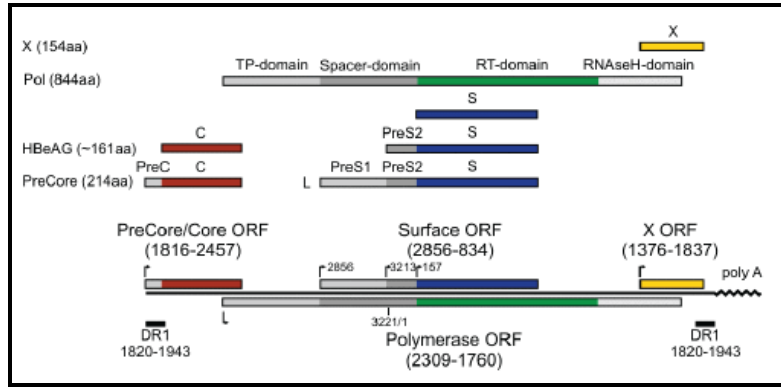
HBeAg ve HBcAg proteinleri sırasıyla pregenomik RNA (pgRNA) ve prekor mRNA olarak bilinen iki ayrı mesaj ile sentezlenir. İlk aşamada, prekor/kor proteini amino-ucundaki 19 aminoasit sinyal peptidi ile endoplazmik retikuluma gider. Bu peptidin ayrılması ile proteinin endoplazmik retikulum lümenindeki geri kalan proteinin karboksil-ucundaki 34 aminoasitlik bölge kesilir ve kalan protein HBeAg'yi oluşturur. HBeAg 10 aminoasiti dışındaki 149 aminoasit yönünden HBcAg ile aynıdır, ancak konformasyonel değişiklikten dolayı iki protein arasındaki epitoplarda değişiklik gösterir (36).

HBeAg, viral DNA sentezi için kalıp olarak kullanılan pgRNA'dan sentezlendiği için HBeAg'nin yüksek miktarda olması fazla miktarda pgRNA sentezlendiğini, yani aktif viral replikasyon varlığını gösterir (4).

HBeAg ve HBcAg immunojenidir. HBcAg'nin immunojenitesi HBsAg'den fazladır. HBV ile infekte hastaların neredeyse tamamında HBeAg ve HBcAg'ye karşı hücrel ve hümoral yanıt gelişir (37).

P proteini

Yapısal ve salgısal proteinlerden farklı olarak, HBV bazı yapısal olmayan proteinler de sentezler. Bu kapsamda, P proteini, viral DNA polimeraz/ters transkriptaz ve endonükleaz (RNase H) aktivitesine sahip ve yapısal olmayan bir molekül olup HBV genomunun en uzun geni olan P gen bölgesi tarafından kodlanır (35). 90 kDa molekül ağırlığındaki bu proteinin en az dört farklı işleve sahip bölgesi vardır (Şekil 2.5). Aminoterminal parçası, negatif DNA sarmalının sentezlenmesinde pgRNA'nın ters transkripsiyonu için öncül görevi görür. Orta parça, negatif sarmal sentezi için ters transkriptaz ve pozitif sarmal sentezi için DNA polimeraz olarak işlev yapar. Karboksi uçtaki parça ise negatif sarmal sentezi sırasında pgRNA'nın degradasyonu için gerekli olan RNase H'ı kodlar. DNA polimeraz bölgesi, ters transkriptaz aktivitesi için gerekli olan YMDD aminoasit motifini taşır (31).



Şekil 2.5. HBV protein transkripsiyon bölgeleri (21).

X proteini

HBV X (HBx) proteini, X geni tarafından ifade edilen 154 aminoasitlik bir protein olup 17,5 kDa moleküler ağırlığındadır (Çizelge 2.1). Çeşitli memeli hepadnavirus türlerine ait HBx gen sekanslarının karşılaştırmalı analizleri sonucu amino ve karboksil uçlarında yüksek derecede muhafaza edilmiş bölgeler görülmüştür (38). X-ışınımı kristolografisi ve nükleer manyetik rezonans çalışmalarına rağmen HBx'in 3 boyutlu yapısı hakkında yeterli bilgi edinilememiştir (39).

HBV X proteinin 52-148 aminoasit bölgesi rapor edilmiş çeşitli aktiviteleri için temel bölge olduğu düşünülmektedir. Proteinin amino-terminal ucunun 1-50 aminoasitlik fragman delesyonu HBx proteininin aktivitesini arttırmakta olup bu temelde bu proteinin negatif regülatör bölge olabileceği düşünülmektedir (38).

HBV X proteini, AHB ve KHB infeksiyonlarında çok zor saptanabilecek kadar az üretilen bir proteindir. Buna rağmen humoral ve hücrel cevap oluşumunu indüklemektedir. HBx proteininin DNA'ya bağlanma yeteneği olmamasına rağmen viral transkripsiyonu ve hücrel genleri aktive edebildiği düşünülmektedir (5).

HBV X proteini zayıf bir transaktivatördür, ancak birçok hücrel ve viral promotörleri aktive etme yeteneğine sahiptir. HBx proteininin NF-kB, AP-1, C/EBP, CREB/ATF, SP1, HIF-a, E2F ve NF-AT gibi birçok DNA bağlayıcı elementlerle etkileşime girdiği düşünülmektedir (5, 38). HBx proteinin aktiviteleri temel olarak iki farklı mekanizmaya dayanmaktadır; hem hücrel transkripsiyonel regülatörlerle hem de sinyal transdüksiyon yolları ile etkileşime girebilmektedir. Bu iki aktivasyon mekanizması temelinde, HBx proteini, hücre döngü regülasyonu, sinyal yollarının aktivasyonu, apoptozis arayollarının yönlendirilmesi (p53 protein etkileşimi), DNA tamir mekanizmalarının inhibisyonu gibi birçok moleküler süreçleri etkilemesi temelinde HSK ile ilişkisi düşünülmektedir (38, 39).

Çizelge 2.1. HBV açık okuma bölgeleri ve proteinleri (27).

Gen bölgeleri	Nükleotid konumları	Protein	Aminoasit sayısı	Moleküler ağırlıkları (kDa)
PreS1	2848-3172	PreS1 (yüzey protein komponentleri)	128	39
PreS2	3172-155	PreS1 (yüzey protein komponentleri)	55	33
S	155-833	HBsAg	226	24
PreC/C	1814-2450	HBeAg	214	15
C	1901-2450	HBcAg	183	19
P	2357-1621	DNA polimeraz	832-845	92
X	1374-1836	HBxAg	145-154	17,5

2.1.3.4. Yaşam döngüsü ve Replikasyon

Diğer bütün viruslarda olduğu gibi, HBV'nin yaşam döngüsü birkaç aşama şeklinde değerlendirilebilir (Şekil 2.6) (32):

- 1-Virusun spesifik konak hücre sine bağlanması
- 2-Virusun konak hücre sine girmesi (penetrasyonu)
- 3-Replikasyonun gerçekleşeceği bölge ye taşınım
- 4-Viral genomun salınması
- 5-Viral gen ürünlerinin transkripsiyonu ve translasyonu
- 6-Oluşan ürünler ile viral replikasyonunun başlaması
- 7-Virionların oluşması
- 8-Oluşan virüslerin hücre den ayrılması

Birçok virusdan farklı olarak, HBV, yeni sentezlenen viral DNA'nın sitozolden çekirdeğe girmesine izin veren daha ileri bir arayol içermektedir (32).

HBV'nin hücreye bağlanması kritik bir aşama olup, birçok virus ve konak hücre reseptörleri arasında etkileşim olmaktadır, ancak etkileşime giren reseptörler ve etkileşimleri henüz tam olarak aydınlatılamamış bir süreçtir (40, 41). Temel olarak HBV'nin yaşam döngüsü, virusun hepatosite tutunması ve reseptöre bağlı endositoz temelli hücreye girmesi ile başlar. HBV'nin tutunduğu hepatosit reseptör veya reseptörler fibronektin, apolipoprotein (apo-H), poli-insan serum albumini (pHSA), interlökin-6 olabileceği düşünülmektedir (42). HBV'nin hepatositlere tutunmasında S gen ürünü proteinlerinin önemli olduğu, bu temelde L ve M proteinlerinin bağlanmada önemli rolü olabileceği saptanmıştır. In vitro çalışmalarda preS1 (21-47 aminoasitleri arası) nötralize olduklarında infeksiyon oluşmadığı gözlenmiştir. In vitro çalışmalar temelinde, preS1 ve preS2'nin karaciğer plazma membranına ve mononükleer hücrelere bağlanabildiği saptanmıştır (33, 42).

Virus, bağlanma sonrasında membran füzyonu yoluyla ve nükleokapsid hücre membranında kazandığı endozom ile stoplazmaya girerek pasif difüzyon ve tübüler taşınım şeklinde çekirdeğe taşınır (33).

Viral replikasyonun başında polimeraz enzimi, kısmen çift sarmallı ve her iki ucu serbest halde bulunan DNA (relaxed circular DNA-rcDNA)'nın tamamlanmasında rol oynar. Negatif zincirin 5' ucuna tutunmuş olan viral polimeraz, pozitif zincirin 5' ucuna tutunmuş olan kısa RNA dizisinden başlayarak pozitif zinciri tamamlar. Oluşan kovalent bağlarla kapanmış çembersel DNA (cccDNA), pgRNA için kalıp görevi gördüğünden infeksiyonun başladığını gösterir. Virus infeksiyonundan yaklaşık 24 saat sonra cccDNA oluşumu görülmektedir (4, 43)

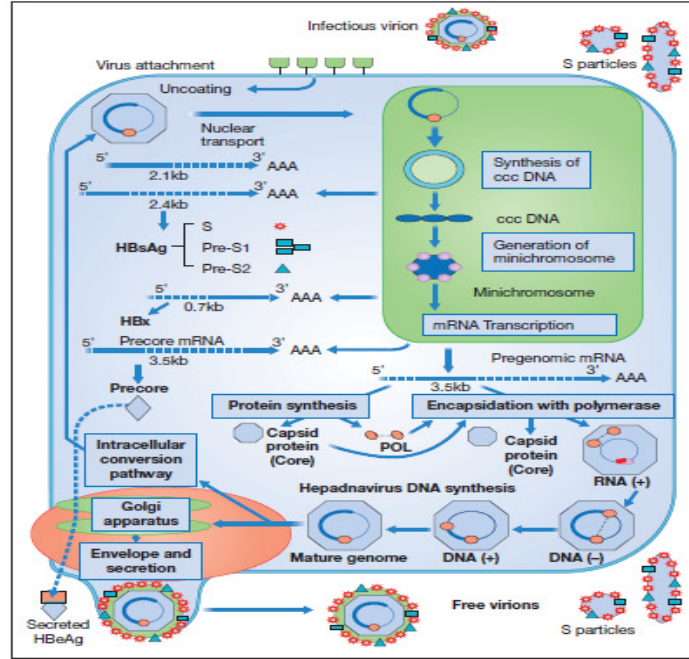
Çekirdekte hücresel RNA polimeraz II enzimi kullanılarak cccDNA'dan mRNA'lar sentezlenir. "Kor promotör" bölgesi viral replikasyonun merkezidir ve negatif zincirli viral genomundan daha uzun olan 3,5 kb'lık pgRNA sentezlenir. pgRNA'dan 4 tip mRNA sentezlenir. Bunlar (24, 40);

1. 3,5 kb'lık mRNA: En uzun parçadır. Genom replikasyonunda, prekor/kor ve pol proteinlerinin sentezinde kullanılır.
2. 2,4 kb'lık mRNA: PreS1, PreS2 ve S proteinlerinin sentezinde kullanılır
3. 2,1 kb'lık mRNA: PreS2 ve S proteinin sentezini sağlar.
4. 0,7 kb'lık mRNA: X proteini sentezletir.

pgRNA önce 200-300 moleküllük çekirdek proteinini sentezletir, sonra polimeraz sentezine izin verir. Polimeraz sentezi pgRNA'nın kor bölgesi içinde kalan bir başlangıç kodonundan başlar. Sentezlenen polimeraz kendi mRNA'sının 5' ucuna bağlanarak ters transkripsiyonu başlatır ve aynı anda çekirdek içine yerleşir. Polimerazın sentezlenmesi pgRNA sentezini durdurur. pgRNA'nın 5' ucunda bulunan enkapsidasyon dizisi (e-dizisi) adı verilen dizileri viral polimeraz enzimini bağlar ve viral korun yapımı başlar (44).

Çekirdek proteinleri ikişer ikişer bir araya gelir, disülfid bağları ile stabilize olur. Bu birimlerden 120 tanesi bir araya gelerek ikozahedral kapsidi oluşturur. Enkapsidasyon dizisi taşıyan pgRNA'lar kapsid içine yerleşir ve pgDNA'dan ters transkripsiyon ile negatif zincirin sentezi viral çekirdek içinde, stoplazmada gerçekleşir. Bu olayda enkapsidasyon dizisi çekirdek içine bir kopya nükleik asit yerleşmesini sağladığı gibi viral DNA sentezini başlatmada da rol oynar. Negatif DNA sentezlendikten sonra viral polimerazın RNase H aktivitesi ile pgRNA yıkılır ve DNA polimeraz aktivitesi ile 5' ucundaki RNA primeri kullanılarak pozitif zincir sentezlenir. Pozitif zincir sentezi için negatif zincirin 5' ucundaki direk tekrar (DR) 1 bölgesindeki primer DR2 bölgesine taşınır ve pozitif zincir sentezi buradan başlar. Her iki zincirin 5' uçları bu nedenle farklıdır. Pozitif zincirin sentezi tamamlanamaz ve eksik kalır. Her iki zincir 5' uçlarından bağlanmasıyla rcDNA sentezi tamamlanmış olur (2, 4).

Viral genom oluştuktan sonra partiküller endoplazmik retikulum içinde tomurcuklanarak glikoprotein zarfını kazanır ve veziküler taşınım ile hücre dışına salınır. HBV replikasyonu sırasında stoplazmada sentezlenen viral DNA'ların bir kısmı çekirdeğe taşınarak orada sürekli cccDNA havuzu oluşturulmasını sağlar (Şekil 2.6) (23).

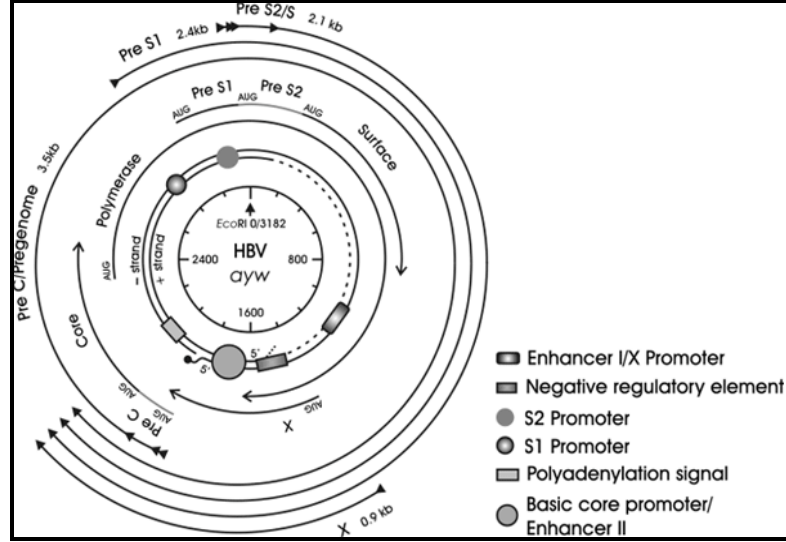


Şekil 2.6. HBV'nin yaşam döngüsü: Virusun hücreye bağlanmasından, hücre içine girmesinden ve infekte virionundan kurtulmasından sonra, viral nükleokapsid sitozol içerisine girer ve nükleer pora taşınır. Viral genom çekirdek içine girdikten sonra cccDNA'ya dönüştürülür ve minikromozomal yapı oluşturulur. Minikromozomal yapı transkribe edilen tüm RNA için kalıp görevi görür. Kor ve polimeraz proteinlerinin oluşturulması için pregenomik RNA sitozole taşınır. Polimeraz ve pregenomik RNA kapsid çevrilir. HBV DNA sentezi oluşan bu nükleokapsid içinde meydana gelir. Nükleokapsidler daha sonra çekirdek içine de taşınır. Zarf proteinleri granüllü endoplazmik retikulum içinde virionlar şeklini alır ve virionlar küçük partiküller halinde salgır (14).

Viral replikasyonu kontrol eden regülatör elementler

HBV geninin ayrı gen bölgelerinin ifade edilmesinde ve regülasyonunda görev alan çoklu regülatör elementler bulunmaktadır. HBV'nin her bir genom bölgesi protein ifade edici diziler içerdiği için gen dizileri içinde aynı molekül kaynaklı (cis-element) regülatör elementler görev yapmaktadır. (32). HBV'nin genomik ifadesi iki enhansır (Enh I ve Enh II), dört promotör, glukokortikoid yanıt elementi (GRE), negatif ragülatör elementi (NRE) ve CCAAT dizi elementi içermektedir. Dört promotör bölge olan bazal kor promotör (BCP), PreS1, PreS2/S ve X promotör; 3,5 kb (PreC/C ve pregenomik RNA), 2,4 kb (PreS1 mRNA), 2,1 kb (PreS2/S) ve 0,7 kb (X mRNA) mRNA'ları oluşturur (Şekil 2.7). Bütün bu mRNA'lar uçları kapalı, kesilmemiş ve önemli bir poliadelinasyon sinyali paylaşmaktadırlar. HBV replikasyonunu kontrol eden

poliadenilasyon sinyal dizisi, post transkripsiyonel regülatör element (PRE) ve enkapsilasyon sinyal dizisi (epsilon) de viral RNA'ların üzerinde lokalize olmaktadır (45).



Şekil 2.7. Hepatit B virus transkripsiyonunu kontrol eden cis-elementler ve genom bölgesi lokalizasyonları (46).

2.1.3.5 Subtip ve Genotipler

Filogenetik analizlere göre HBV'nin, A, B, C, D, E, F, G ve H olmak üzere 8 genotipinin olduğu belirlenmiştir. HBV genotipleri birbirlerinden yaklaşık % 8 oranında farklılık göstermektedir (6).

HBV genotip A, B, C, F ve H genom uzunluğu 3215 nükleotid iken delesyon ve insersiyonlardan dolayı, genotip G genomu 3248 nükleotid ve genotip D genomu ise 3182 nükleotid uzunluğundadır (Çizelge 2.2) (6).

Kapsamlı filogenetik analizler, HBV genotiplerinin kendi içlerinde en az % 4 farklılık gösteren subgenotiplere sahip olduğunu göstermiştir. HBV genotip A, B, C, D ve F subgenotipleri sırasıyla A1/A2, B1/B2/B3/B4, C1/C2/C3, D1/D2/D3/D4 ve FIa/FIb/FII/FIII/FIVşeklindedir. HBV genotip E ve G'nin ise subgenotipleri yoktur (Çizelge 2.2) (6, 47).

HBV genotip ve subgenotipleri kendine özgü bir coğrafik dağılım gösterir. Genotip A, Kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika, Hindistan ve Sahra altı Afrika ile birlikte az olmakla birlikte Güney Amerika'da yaygınlık gösterir. Genotip B ve C ise Asya'da endemik iken genotip D daha çok Akdeniz çevrelerinde ve Doğu Avrupa'da yaygınlık göstermekle birlikte tüm dünyada görülebilmektedir. Genotip E, Batı Afrika; genotip F, Güney Amerika ve genotip H ise Orta Amerika'da yaygındır. Son olarak genotip G ise Fransa, Almanya, Orta Amerika, Meksika ve ABD kapsamında yaygındır. Aynı ülkeler ve bunların yerel bölgelerinde, risk grubuna dahil popülasyon grupları farklı prevalans oranlarına sahip spesifik genotipler barındırabilmektedir (Çizelge 2.2) (6).

Çizelge 2.2. HBV genotip ve subgenotiplerinin karakteristik özellikleri (47 nolu kaynaktan değiştirilmiştir).

Genotip	Subgenotip	Coğrafik Dağılım	Genome ^b	PreS1 ^c	Pol ^c	HBcAg ^c
A	A1	Afrika, Asya	3221	400	845	185
	A2	Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika				
B	B1	Japonya	3215	400	843	183
	B2	Asya				
	B3	Endonezya, Çin				
	B4	Vietnam, Kamboçya				
C	C1	Uzak Doğu	3215	400	843	183
	C2	Uzak Doğu				
	C3	Pasifik Adaları				
D	D1	Avrupa, Orta Doğu, Mısır, Hindistan, Asya	3182	389	832	183
	D2	Avrupa, Japonya				
	D3	Avrupa, Asya, Güney Afrika, ABD				
	D4	Avustralya, Japonya				
E		Sahra altı Afrika, İngiltere, Fransa	3212	400	842	183
F	F Ia	Orta Amerika	3215	400	843	183
	F Ib	Arjantin, Japonya, Venezuela, ABD				
	F II	Brazilya, Venezuela				
	F III	Venezuela, Panama, Kolombiya				
	F IV	Arjantin, Bolivya, Fransa				
G		ABD, Almanya, Japonya, Fransa	3248	399	842	195
H		ABD, Japonya, Nikaragua	3215	400	842	183

^b -Nükleotid c –Aminoasit

Belirli genotipler ile şiddetli karaciğer hastalığı arasında bağlantı kurmaya çalışan birçok çalışma yapılmıştır. Ancak tartışmalı sonuçlar edinilmiştir. Genotip A ve D'nin birlikte bulunduğu ülkelerde, genotip A enfeksiyonunun, genotip D enfeksiyonuna göre KHB oluşturma açısından daha fazla potansiyele sahip olduğu, genotip B ve C'nin birlikte bulunduğu bazı ülkelerde ise, genotip C enfeksiyonlarının çok hızlı bir şekilde siroz ve HSK sürecine girdiği öne sürülmüştür (48).

2.1.4. Hepatit B Virus Mutantları

Viral mutasyonların oluşma hızı virusun replikasyon hızına bağlı olarak değişebilmektedir. HBV yüksek replikasyon etkinliğine (10^{11} partikül/gün) rağmen 2×10^4 baz değişikliği/yıl oranından daha düşük mutasyon hızı gösterir. Bu oran polimeraz aracılı geri okuma fonksiyonu olmayan viruslara göre daha düşük bir orandır. Buna ek olarak HBV genomunun üst üste çakışan genom yapısı yaşamsal mutasyonların sayısını ve ifade edilmesini azaltmaktadır. Tüm bu yapının ötesinde, HBV semptomlarının şiddetli olması temelinde yüksek hücrel immun sistem etkinliği ve antiviral tedavi uygulanma gerekliliği ve bunun sonucunda oluşan seleksiyon ve mutant suşların popülasyonda baskınlık kazanması, HBV'nin mutasyon profilini önemli kılmaktadır (16).

HBV genomunda mutasyon gelişimi tesadüfî olarak oluşmakta ve oluşan mutasyonlar, virusa sağladığı uyum gücüne bağlı olarak replikasyon döngüsü ile çoğalmakta ve mutant viruslar prevalans kazanmaktadır (16, 49).

HBV mutant formlarında, replikasyon hızları da değerlendirildiğinde, haftalar ya da aylar ile ifade edilen bir zaman aralığında wild-tip HBV'ye göre birçok değişiklik gözlenmektedir. Bu mutasyon profillerinin bir kısmının fenotipik anlamları bilinmemekte ancak etkileşim mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle, mutasyonların infekte konakta oluşturduğu hastalık kalıbı ve patolojik etkileri, moleküler epidemiyolojik çalışmalar temelinde istatistiksel olarak ilişkilendirilmeye çalışılmaktadır (16).

Tüm mutasyon profilleri ele alındığında, oluşan mutasyon çeşitlerini temel olarak 3 ana kategoriye ayırmak mümkündür. Bunlar; tek baz değişikliğine neden olan

nokta mutasyonları, geniş genom alanlarını etkileyebilen insersiyon ve delesyon ile yeniden düzenlenme, insersiyon-delesyon ve/veya nokta mutasyonları oluşumu ile meydana gelen okuma çerçevesinin değişmesidir (16, 49)

Genom üzerindeki bazı gen bölgeleri birbiri ile üst üste olduğu için bu bölgelerde oluşan mutasyonlar diğer genlerde de değişiklik oluşturabilmektedir. HBV'de oluşan mutasyonlar hastalığın klinik seyrinde önemli etkilere sahiptir. HBV'de oluşabilecek mutasyonlar (50, 51);

- 1- Antiviral ilaçlara karşı direnç gelişimine neden olabilir.
- 2- Virusun hücreye girişini ve entegrasyonunu kolaylaştırabilir
- 3- Virusun antijenik yapısını değişmesine immün yanıtta kaçış mekanizmalarının oluşmasına neden olabilir
- 4- Virusun replikasyonunun artması sonucu şiddetli klinik sonuçlara sebep olabilir.

2.1.4.1. X mutantları

X geninde birçok nokta mutasyon oluşabilmesi temelinde okuma çerçevesindeki çeşitli değişiklikler ile birçok delesyon oluşabilmektedir. X gen bölgesi Enhansır II, Kor promotör, DR1 ve DR2 gibi virus replikasyon ve ekspresyonunda önemi olan diziler içermektedir. X gen bölgesinin P geninin RNase H ve PreC gen bölgeleriyle ortak diziler içermesi nedeniyle bu bölgedeki mutasyonlar, virusun replikasyon ve ekspresyon davranışlarında, bunun sonucunda da klinik açıdan değişimler oluşturabilmektedir (52). X geninde meydana gelen mutasyonların fonksiyonel önemi tam olarak açıklığa kavuşmamış olmakla beraber bu tip varyantların infektiviteleri zayıf, replikasyon yetenekleri düşüktür (53).

Kor promotör, enhansır II bölgesi ve DR2 kapsamındaki X gen mutasyonları temelli okuma çerçevesi değişimi ve delesyonlar ile HBV enfeksiyonuna ait konvensiyonel serolojik belirteçlerin görünmemeye başlaması arasında ilişki olabileceği düşünülmektedir (35).

X geni mutasyonları kapsamında, HBsAg ve HBeAg negatif hastalarda genin 3' ucunda kor promotör/enhansır II bölgesinde 8 nükleotidlik (1770-1778 nt) ve 20

nükleotidlik delesyon (1752-1772 nt) dikkat çekicidir. Bu delesyonların PreC promotör bölgesinin ifade edilmesini azalttığı ve bunun da HBV protein salgısındaki baskılanmanın sebebi olabileceği düşünülmektedir (35).

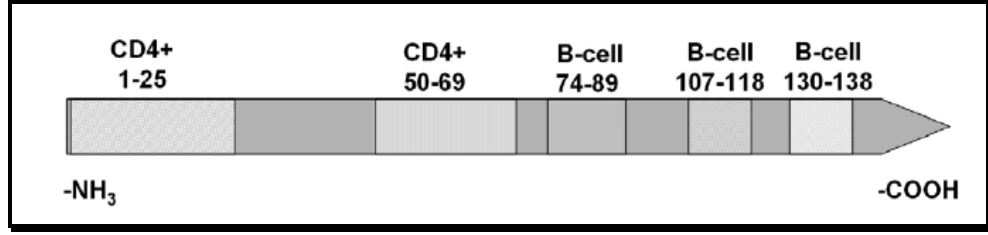
Serum, tümörlü ve tümörlü olmayan dokulardan izole edilen X geninin hücre dizilerine olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, tümörlü dokulara entegre olmuş HBV DNA'daki X gen bölgelerinin tamamında C terminal ucunda delesyon saptanırken, serum ve tümörlü olmayan doku kaynaklı HBx gen bölgelerinin ise yarısında C terminal ucu delesyonu saptanmıştır (54).

X proteini temelinde yapılan çalışmalarda, X geninin C terminal ucunda meydana gelen mutasyonlar ile X proteini eksik ifade edilmekte ve tam ifade edilmemiş bu proteinin ise HSK ile yakından ilişkisinin olduğu bildirilmiştir. Bununla ilgili olarak, mutasyonlu X sekansı vektör aracılığı ile fare ve insan hücre dizilerine transfekte edildiğinde hücrelerde güçlü bir arttırılmış koloni formasyonu ve hücre döngüsü sürecinde hızlanma gözlenmiştir (55).

2.1.4.2. Kor, Prekor ve Bazal Kor Promotör Mutantları

Prekor (1816-1903 nt) ve kor (1903-2458 nt) gen bölge mutasyonları birçok çalışmaya konu olmuş ve bu çalışmalar sonucu birçok mutasyon tanımlanmıştır. Prekor mRNA HBcAg proteinini, kor mRNA ise nükleokapsidin temel proteini olan HBcAg proteinini ifade eder (35).

HBcAg viral polimeraz ile pgRNA'nın kapsid yapısı içine alınması için gereklidir. Kapsid proteini de B hücre aktivasyonuna ve T hücre bağımlı veya bağımsız antikor üretimine neden olduğu için virusun immun cevap oluşturmada önemlidir. Kor mutasyonları bu temelde konak immun sistemden kaçış mekanizmalarını oluşturan viral stratejiler içinde değerlendirilir. Bu bölgede meydana gelen mutasyonlar genel olarak bölgenin CD4+ ve B hücre cevabı oluşturan dizilerinde meydana gelmektedir (Kodon 1-25, 50-69, 74-89, 107-118 ve 130-138) (Şekil 2.8) (35).



Şekil 2.8. Kor proteininin immünolojik epitopları (35).

Prekor gen bölgesinin virusun yaşam döngüsü için büyük önemi olması temelinde bu bölgede meydana gelen mutasyonların belirli klinik belirtileri çok açıktır. Bu açıdan en iyi bilinen prekor mutasyonu, HBeAg üretiminin durmasını veya azalmasını sağlayan bir stop mutasyonu olan 1896 nt (ya da kodon 28) mutasyonudur. HBeAg sentezini engelleyen başka bir mutasyon 1862 nt mutasyonudur. Bu mutasyon iki farklı noktada HBeAg sentezini engellemektedir. Bu bölge hem sinyal peptid ayrılma bölgesine yakın olduğu için hem de pgRNA'nın ters transkripsiyonun engellenmesi ve HBeAg sentezinin durması sonucunu doğurur. Prekor mutantları kronik ve fulminan hepatit ve akut-non fulminan hepatitli hastalarda görülebilmektedir (30, 35, 36).

Kor gen mutasyonları epidemiyolojik olarak hastalık aktivitesi ile ilişkili iken prekor stop mutasyonu kliniğe daha az yansiyabilir. Buna karşın, bazal kor promotör (BCP) mutasyonları ise viral replikasyonun artması ve buna bağlı hastalık aktivitesindeki şiddetlenme arasında güçlü bir ilişki mevcuttur (35).

BCP (1744-1804 nt) bölgesi, ters transkripsiyon için önemli olan DR1 bölgesini içerir. BCP bölgesi X gen bölgesinin C terminal ucu ile üst üste çakışıp hem prekor hem de kor gen bölgelerinin transkripsiyonunu kontrol eder ve ters transkripsiyon için kalıp teşkil eden pgRNA'yı hazırlar (30, 35). HBeAg üretiminin durmasını veya azalmasını sağlayan BCP bölgesi mutasyonları, 1762 nt ve 1764 nt mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar HBeAg üretimini % 70 oranında düşürmekte ve viral replikasyonu arttırmaktadır. Bu mutasyonlar promotör gen bölgesi mutasyonları olduğundan, meydana gelen mutasyonların, pgRNA transkripsiyonunu veya kor proteinini etkilemesi, kor RNA başlangıç kodonlarındaki ifadenin azaltılması temelinde dolaylı olarak gerçekleştirilir. Bunun yanında BCP mutasyonları ileri aşamalarda X gen

mutasyonları ve transkripsiyon faktörü (hepatosit nükleer faktör 1-HNF 1) bağlanma bölgesini kombine olarak etkileyerek viral replikasyonu arttırabilmektedir (35).

2.1.4.3. S (Yüzey) Mutantları

S gen mutasyonları preS gen ve S gen bölgeleri kapsamında değerlendirilir. S gen bölgesinde oluşan nokta mutasyonlar, özellikle nötralizan antikorların hedefi olan “a” determinantı (121-149. aminoasitler) etkileyerek HBsAg’ye karşı immün sistem cevabını etkilemektedir. HBsAg, poliklonal antikor cevabının oluştuğu temel bir hedefdir. HBV ile infekte hastalarda yüzey mutasyonları nedeniyle HBsAg saptanamayabilmektedir. Bu nedenle, bu yüzey mutasyonları ciddi bir halk sağlığı probleminin kaynağıdır (30, 51).

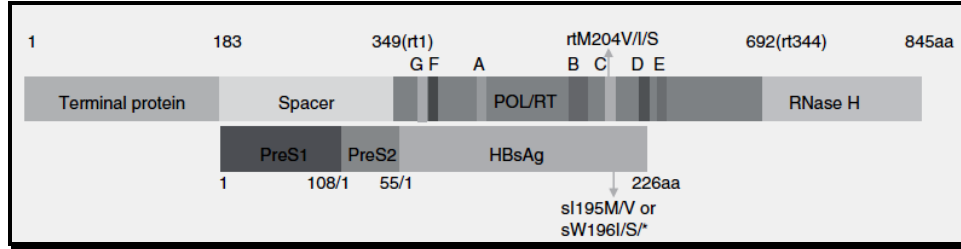
HBV’ye karşı oluşan nötralizan antikor yanıtına neden olan “a” determinantı tüm subtiplerde oldukça korunmuş bir bölgedir. Özellikle 145. aminoasit pozisyonunda oluşan mutasyonlar virusta büyük antijenik değişikliklere neden olmaktadır. Bu bölgede meydana gelen aminoasit değişiklikleri HBsAg’nin üç boyutlu yapısında önemli değişikliğe yol açmaktadır; anti-HBs’nin nötralizan etkisinden kurtulmasına ve replikasyona devam etmesine neden olmaktadır. HBV S mutantları ile infekte olgularda, tek başına HBV DNA pozitifliği, tek başına HBsAg pozitifliği, anti-HBs ile HBsAg’nin birlikteliği gibi alışılmadık serolojik profiller görülebilmektedir (4, 30).

Yüzey geni ile ilgili mutasyonlar, daha az sıklıkta, preS1 ve preS2 bölgelerinde de (bir sekansın silinmesi, yer değiştirmesi veya yeniden düzenlenmesi şeklinde) ortaya çıkabilmektedir (30).

PreS gen bölgesinin tamamına yakını P gen bölgesinin virus için zorunlu olmayan spacer bölgesiyle üst üste geldiğinden bu bölgede meydana gelen birçok mutasyon virus için primer olarak öneme sahip olmadığı düşünülmektedir (Şekil 2.9) (57). Buna karşın bazı mutasyonlar PreS1 proteininin (MHBs) sentezinin durmasına neden olarak virion sekresyonunu inhibe edebilmektedir ve bu durum ise sitotoksititeye neden olmaktadır (48).

PreS2 proteini farklı viral yaşam döngülerinde değişik miktarlarda bulunmakla birlikte viral replikasyon, viral partikül morfolojisinin oluşması, sekresyonu ve

infektivite açısından temel teşkil etmemektedir. PreS2 ATG yanlış eşleşme ya da delesyon mutasyonları, PreS2 proteinin sentezinin durmasına ve B ve T hücre epitoplarında değişimlere neden olabilmektedir (47).



Şekil 2.9. HBV'nin üç zarf proteinlerini kodlayan S ORF gen bölgesi PreS bölgesinde P gen bölgesinin spacer ve S (HBsAg) bölgesinde ise ters transkriptaz ve polimeraz domainleri ile üst üste gelmektedir (57).

PreS mutasyonları kronik infeksiyonlarda, özellikle interferon tedavisi alan hastalarda görülmekte ve muhtemelen virusun konak immün yanıtından kaçışını sağlamaktadır. HBV'nin doğal yaşam döngüsünde oluşan kor protein mutasyonları, PreS mutasyonlarıyla bir immün yanıtтан kaçış mekanizması oluşturmaktadır (47).

2.1.4.4. Polimeraz mutantları

Polimeraz gen ürünleri viral RNA'nın kor partikülü içinde kapsidasyonu ve HBV viral RNA'nın genomik viral DNA'ya dönüştürülmesi için gereklidir. HBV ters transkriptaz oldukça korunmuş olmasına rağmen, bazı mutasyonlar tanımlanmıştır. Polimeraz geninde tanımlanan bazı yanlış eşleşme mutasyonları HBV RNA'nın kor partikülü içine paketlenememesine neden olmaktadır (30).

Polimeraz mutasyonlarının en önemli klinik sonucu ise antiviral direnci oluşturmasıdır. Lamivudin gibi viral ters transkriptaz inhibitörü olan ilaçlarla tedavi sonrasında polimeraz mutasyonları olan viruslar popülasyona hakim olmaya başlamaktadır. Lamivudin tedavisi sırasında P geninde pek çok mutasyon tanımlanmıştır. Bunlardan üç tanesinin lamivudin direncine sebep olduğu saptanmıştır.

Bu mutasyonlardan en sık görülen YMDD mutasyonlarıdır. Polimeraz enziminin C katlantısındaki tirozin (Y), metiyonin (M), aspartat (D), aspartat (D) aminoasitlerinden (YMDD) metiyoninin izolösin veya valine değişmesi (M552I veya M552V), B katlantısındaki lösinin metiyonine değişmesi (L528M) ve tekrar B katlantısındaki valinin löesine değişmesi (V521L) lavimudin direncinden sorumlu tutulmaktadır (4, 16, 30).

RNA'ya bağlı DNA polimerazın tüm ters transkriptaz enzimlerinde benzer ve korunmuş olan YMDD motifinde değişikliğe neden olan mutasyonlar, enzimin nükleotid bağlayan katalitik bölgesini etkilemekte ve lamuvidinin yanında adefovir, famsiklovir ve lobukavir gibi diğer ters transkriptaz enzim inhibitörlerine de direnç gelişmesine neden olmaktadır. Tedavi süreci uzadıkça (1 yıl ve sonrası) mutant viruslar seçilmekte ve popülasyonda baskın durumuna geçmektedir (4, 58).

Polimeraz gen bölgesinin, YMDD mutasyonlarının görüldüğü Pol/RT bölgesi ile HBsAg proteinin sentezlendiği S gen bölgesindeki çakışma nedeniyle (Şekil 2.9), YMDD bölgesindeki mutasyonlar (A529T, V521L) S geninde stop kodon oluşumu (164.kodon) ve HBsAg sekresyonunun durmasına neden olmaktadır (58).

2.1.5. Patogenez

HBV sitopatik olmayan bir virustur. HBV enfeksiyonunda karaciğer hasarının oluşmasında viral faktörlerden çok konak immün yanıtının rolü vardır (4, 10, 11).

HBV nötralizasyonunu sağlamak, replikasyonunu önlemek, virusun temizliğini sağlamak ve persistan enfeksiyonunun kontrolünü sağlamak amacıyla humoral ve hücre-aracılı immün sistemin her iki kolu da aktive olmaktadır (45).

Serbest HBV partiküllerinin nötralizasyonu ve virusun konak hücreye girişinin önlenmesi için antikor üretimi kritik bir aşamadır. Virus zarf komponentlerine karşı antikor üretimi enfeksiyondan çok önce başlar, ancak ilk aşamada yeterince virus replikasyonu olmaması ve bu temelde zarf antijen azlığı nedeniyle oluşan antikorların tanımlanması zor olmaktadır (11).

Antikor üretimi konak hücre sine invazyon öncesinde yeterli derecede aktive olması gerekmektedir. Antikorlar virus partiküllerinin hücreden hücreye yayılmasını

engellerken, hücre içi virus eliminasyonu ise Sınıf I insan lenfosit antijen (HLA-I) sunuculuğu temelinde CD8+ sitotoksik T lenfositleri (CTL) ve infeksiyon bölgesindeki diğer spesifik olmayan efektör hücreler ile yapılmaktadır (11).

Akut infeksiyon sırasında viral temizlik için, viral zarf, polimeraz ve kor protein epitoplarına karşı CD4+ T hücre ve CTL yanıtı oluşur. Akut infeksiyon sırasında HBcAg, HBeAg ve HBsAg proteinlerine karşı güçlü CD4+ T hücre yanıtı gelişmektedir (4, 45).

CD8+ sitotoksik T lenfosit yanıtı virusun temizlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Fakat karaciğer gibi solid organlarda, sıkı hücre yapısından dolayı CTL'lerin direk infekte hücrelere ulaşmasının zorluğu nedeniyle sitokin üretim adaptasyonu gelişmiştir. Sitotoksik T hücrelerinden salınan sitokinler direk olarak HBV replikasyonunu inhibe edebilmektedir (4). Bu temelde, hücre içinde HBV DNA'sının temizlenmesi yaygın bir şekilde (yaklaşık % 90) tümör nekroz faktör (TNF α), interferon alfa ya da beta (IFN α - β) gibi doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi içindeki hücreler tarafından üretilen antiviral sitokinler aracılığı ile gerçekleştirilir (11). TNF α , HBV mRNA'sının yıkımını hızlandırmaktadır. Ayrıca kor promotör, TNF α , β , γ 'ya duyarlıdır ve bu sitokinler varlığında inhibe olmaktadır (45).

HBV peptitlerinin hücresel temelde, CTL'ler tarafından tanımlanması ve sitokinler aracılı viral DNA düşüşünden sonra, immun cevap, infekte hepatositlerde apoptozis ve ardından nekroz ile sitolitik bir biçimde devam eder ve serumdaki alanin aminotransferaz (ALT) düzeyi yükselir. Bu mekanizma bir taraftan karaciğer hasarı oluşturmakta, diğer taraftan ise virus kontrolü sağlamaktadır. Sitotoksik T hücreleri çeşitli antijen-non-spesifik inflamatuvar sitokinler salgılayarak karaciğerde toplar, böylece nekroinflamasyona yönelen bir aşamayı başlatmış olur (10).

Yüksek derecede karaciğer hücre hasarı olmaması ve virus replikasyonunun önlenemeyerek kontrolünün sağlanamadığı KHB'li hastalarda, HBV-spesifik CD4+ T hücre ve CTL yanıtı genel olarak saptanamamaktadır. CTL'lerin HBV-spesifik tetramerlere bağlanamaması ve sitokin üretememesi ve sonuç olarak sitokin dengesizliği immun yanıtın düşmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, infekte hücrelerde, yüksek viral antijen yoğunluğu ve hücrenin buna tepki vermemesi sonucunda persistan infeksiyon başlar (11).

HBV infeksiyonunda immun yanıtta kaçış mekanizmaları

HBV infeksiyonlarında immun sistemin etkilerinden virusun kaçmasını sağlayacak pek çok mekanizma bulunmaktadır. Akut infeksiyonda virusun temizlenmesinde etkin olan antikolar, yüzey antijenlerindeki “a” determinant değişikliğine neden olan mutasyonlardan dolayı nötralize etki göstermeyebilmektedir (4, 32).

Virusun prekor/kor genlerinde oluşan mutasyonlarda HBeAg sentezi durmakta, bu antijen yokluğunda virusa karşı immun cevap zayıflamaktadır. HBeAg sentezlenmeyen mutant viruslar ile replikasyon sürmekte ve infeksiyon devam etmektedir (4, 32).

Viral antijenlerde değişikliğe neden olan mutasyonlar bu antijenlerin doku uygunluk kompleksi (MHC) antijenlerine bağlanmasını ve T hücre reseptör (TCR) ile bağlanma özgülüğünü etkiler. Virus yükünün çok fazla olduğu immunodominant epitopların uzun süreli ya da çok yüksek T hücre uyarısı T hücre yanıtızlığına neden olabilmektedir (4, 32).

2.1.6. Klinik Belirti ve Bulgular

Hepatit B infeksiyonu AHB'den başlayarak KHB, siroz ve HSK'ya kadar geniş spektrumda karaciğer hastalığı oluşturabilmektedir (27).

2.1.6.1. Akut infeksiyon

AHB, HBV ile karşılaşılmasını takiben, genelde 6 hafta ile 6 ay arasında değişen bir inkübasyon periyodundan sonra gelişmekte ve asemptomatik infeksiyondan, fulminan hepatite kadar değişebilen bir klinik içerisinde seyretmektedir. AHB'de başlangıç sendromu iştahsızlık, bulantı ve kusma, halsizlik, karın ağrısı gibi spesifik olmayan belirtiler şeklindedir. Bu dönem 3-7 gün kadar sürer. Bu evrede bazı hastalarda serum hastalığına benzeyen ateş, artrajji/artrit ve deri döküntüleri gelişebilir. Bu son belirtiler ikterik belirtisi ile gerileyip kaybolurken halsizlik, iştahsızlık gibi yakınmalarda ağırlaşma gözlenir (9).

AHB dönemi semptomları, biyokimyasal laboratuvar bulguları ve serolojik belirteçler değişebilmektedir. AHB dönemi inkübasyon periyodu, preikterik faz, ikterik faz ve konvelasan dönem şeklinde ayrılmaktadır (27).

İnkübasyon periyodu (semptom başlangıcı) ortalama 75 gün olmak üzere 40-150 gün arasında değişebilmektedir. Bu dönemde, açık olarak semptom kaydedilmemiştir ve biyokimyasal laboratuvar test sonuçları normal değerlerdedir. Ancak, virus replikasyonu başlamakla birlikte HBsAg serumda görülür ve bu süreci 1-3 hafta içinde HBeAg ve HBV DNA'nın saptanabildiği aşama izler. Bu belirteçlerin titreleri yükselir, genellikle semptom başlangıcı sonrası en yüksek seviyelerine ulaşır (27).

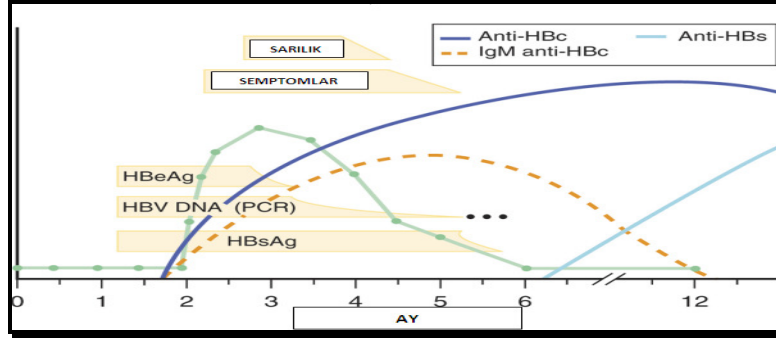
Preikterik fazda, halsizlik, iştahsızlık, mide bulantısı gibi semptomlar spesifiktir. Bu faz genellikle 3-7 gün içinde sona ermektedir. Serum biyokimyasal test sonuçları aminotransferaz aktivitesindeki yükseklik temelinde anormaldir. HBsAg, HBeAg ve HBV DNA hala saptanabilmektedir. HBeAg'ye karşı antikor oluşumu semptomların başlamasından kısa süre önce görülür ve titresi hızlı bir şekilde artar. İlk immun yanıt immunoglobulin M (IgM) ile başlar. AHBsemptomlarına sahip bütün hastalarda anti-HBc

(IgM ve IgG) titresi saptabilir düzeydedir. Anti-HBs ve anti-HBe bu fazda görülmektedir (27).

İkterik faz başlangıcında, idrar renginin koyulaşması ve sarılık semptomları görülür. Yorgunluk ve iştahsızlık bu fazın en önemli belirtileridir ve bu belirtileri mide bulantısı, kusma, kaşınma, döküntü, ishal ve karın ağrısı belirtileri izler. İkterik faz ve klinik sarılık birkaç günden birkaç aya kadar devam etmekle birlikte, ortalama 2-3 hafta içinde belirtiler son bulur. Kaşınma ve soluk renkte görünümündeki dışkı oluşumu genellikle sarılık başlangıcından sonra görülür. Bu fazda 2-10 kilo kaybı tipiktir. AHB tanısı genel olarak bu fazdaki belirtiler ile konular. Bu fazda serum aminotransferaz aktivitesi sürekli olarak artış gösterir ve tipik olarak ALT ve aspartat aminotransferaz (AST) aktiviteleri normal limit değerlerinin 10 ila 50 katı kadar artabilmektedir (9, 27).

Hastaların büyük kısmında (% 90) klinik semptomlar başlangıcında HBsAg hala pozitifdir ve genellikle bu belirteç pozitifliği semptomların görüldüğü dönem boyunca sürekli ve konvelasan dönemde daha hafif devam eder. Buna karşın, HBV DNA ve HBeAg, semptomların görülmeye başladığı dönemde henüz görülemeyebilmektedir. Bu belirteçlerin temizlenmesi, infeksiyonun konak tarafından tanımlandığı, olumlu bir serolojik göstergedir. İkterik fazdaki hasta serumlarında ayrıca anti-HBc ve anti-HBc IgM görülmektedir. Serumdaki anti-HBc IgM varlığı AHB tanısı için güvenilir ve spesifik bir belirteçtir. Birçok hasta hem HBsAg hem de anti-HBc IgM yönünden duyarlıdır. İkterik fazda anti-HBe oluşumu görülebilir, ancak genellikle titresi düşüktür. Anti-preS, DNA polimeraz ve HBxAg oluşumuna karşı antikor cevabı da görülebilir ancak bu moleküllere karşı oluşmuş antikor cevabı ilk aşamada tanı ve tedavi başlangıcı için yardımcı serolojik belirteçler değildir (Şekil 2.10) (27).

Akut viral hepatit seyrinde daha geniş karaciğer nekrozu gelişmesinin sonucu olarak karaciğer sentez, salgı ve detoksifikasyon fonksiyonlarında ileri derecede bozukluk gelişebilir. Sıklıkla AHB'de ilk 8 haftasında gelişebilen bu klinik tablo "fulminan hepatit" olarak tanımlanır. Birden ateş yükselmesi, belirgin karın ağrısı ve sarılığı takiben derin koma ve şuur bulanıklığı ile hepatik ensefalopati gelişir. Bu klinik tabloda ölüm oranı % 70-90'dır. Fulminan hepatit B gelişmesine etki eden faktörler, HBV'nin genetik heterojenitesi, diğer viral etkenlerle koinfeksiyon veya süper infeksiyon ve/veya konak immunolojik faktörle olabilmektedir (23).



Şekil 2.10. AHB dönemi doğal seyri (59 nolu kaynaktan değiştirilmiştir).

Tüm dönemler değerlendirildiğinde, AHB enfeksiyonunda görülen ilk serolojik markır HBsAg antijeni olup, genellikle klinik semptomların görülmesinden 1-6 hafta içinde tanımlanabilir. Anti-HBc IgM varlığı, HBsAg antijeninden 1-2 hafta sonra görülmeye başlar ve HBsAg'nin vücuttan temizlenmesinden sonraki 6 aya kadar devam eder (60). AHB'yi takiben birçok olguda yeterli immun yanıt ile virus karaciğerden temizlenir. Kanda oluşan koruyucu anti-HBc antikorları kişiyi yeni enfeksiyonlardan korur (4).

2.1.6.2. Kronik enfeksiyon

Akut enfeksiyonu izleyerek olguların bir kısmında HBV'nin karaciğerden temizlenmesi başarılmaz. Bu kişilerde kanda HBsAg pozitifliğinin altı ayı aşması durumunda kronik enfeksiyondan kuşkanılması gerekir (9).

KHB enfeksiyonunun klinik seyri, virus ile etkileşim ve ardından gelişen konak immun sistem cevabı temelli farklı süreçler içerir (10). KHB enfeksiyonu birbirini izleyen 4 dönem içerisinde gelişir. Bunlar; immun tolerans dönemi, immun temizlik (yanıt) dönemi, immun kontrol dönemi ve reaktivasyon (HBeAg negatif KHB) dönemidir (9). Hastaların tamamı bu fazlardan geçmez ve fazların ne kadar süreceği hastadan hastaya farklılıklar gösterir (9, 61).

İmmun tolerans fazındaki hastalar genellikle genç, asemptomatik ve yüksek viral yüke (2×10^6 - 2×10^7 IU/ml) sahip olmakla beraber HBeAg, HBsAg ve HBV DNA

pozitifdir ve bu bulgular viral replikasyon hızının yüksekliğini yansıtır; ancak normal serum ALT düzeylerine ve normale yakın karaciğer histolojisine sahiptirler (9, 62). Bu faz özellikle yeni doğan veya erken çocukluk döneminde HBV ile karşılaşmış olanlarda belirgin bir şekilde gözlenmektedir. Bu hastalardaki immun tolerans dönemi 10-30 yıl kadar sürebilir. Buna karşılık erişkin hayatta HBV ile infekte olanlarda immun tolerans dönemi genelde çok daha kısa ve diğer dönemlerden ayırt edilemeyecek kadar belirsiz olabilir (9, 63).

İmmun temizlik fazında, immun tolerans fazından yıllar sonrasında, virusa gösterilen tolerans kırılmaya başlar. Bu faz, replikatif immun tolerans fazından non-replikatif faza geçildiği dönem olup HBeAg'den anti-HBe pozitifliğe geçildiği dönemdir. Anti-HBe cevabının oluşması ile viral replikasyon genellikle kesilir ve karaciğer hastalığı inaktif hale geçer (64). Oluşan immun yanıtın neticesinde karaciğer hücre hasarı, bununla ilişkili biyokimyasal bulgular (ALT, AST yüksekliği) ve karaciğer biyopsisinde aktif inflamasyon bulguları ortaya çıkar. Bu dönemin klinikteki ifadesi HBsAg (+) kronik B hepatitidir. Bu devrenin devamı durumunda karaciğerdeki inflamasyon ve fibrotik süreç devam ederek hastalık karaciğer sirozuna kadar ilerleyebilir (9).

İnaktif dönem ile immun yanıt dönemi sona erer ve hastalar inaktif döneme geçer. Bu dönemde HBV DNA (-) veya düşük düzeylerde bulunur. Bazı olgularda bu dönemden sonra bir daha aktif infeksiyon formları gelişmez ve eğer immun yanıt döneminde çok ağır bir karaciğer hasarı meydana gelmişse virolojik aktivitenin sonlanmasını takiben histopatolojik düzelme ve ALT seviyesinin de normale dönmesi ile tipik bir inaktif taşıyıcılık örneği oluşur. İnaktif taşıyıcılarda zamanla HBsAg'nin negatifleşmesi ve anti HBs pozitifliği gözlenebileceği gibi hastalığın yeniden aktif formlara geçmesi de mümkündür (65).

HBeAg serokonversiyonunu genellikle klinik hafifleme ve ömür boyu süren inaktif dönem ile devam eder. Bazı olgularda belirgin bir inaktif dönem ayırt edilmeksizin doğrudan HBeAg (+) KHB'den HBeAg (-) KHB'ye geçiş olabilmektedir. Bu dönemin özelliği ALT düzeylerinde dalgalanmalar gözlenebilmesidir. Reaktivasyon döneminde hastaların bir kısmı inaktif taşıyıcı olarak kalırken, bir kısım hastada (% 12-14) ise HBV'nin prekor ve kor promotör gen bölgelerinde mutasyon geçirmesi ile HBeAg (-) KHB gelişir (4, 9). Reaktivasyon dönemi sıklıkla HBsAg'nin

negatifleşmesinin hemen ardından oluşur. Hepatit B infeksiyonunun reaktivasyonuna genellikle semptomların yeniden görülmesi ve ALT ve AST aktivitelerindeki yükselme eşlik eder (27).

Çizelge 2.3. Kronik Hepatit B dönemi ve klinik seyirleri (66).

İnfeksiyon Dönemi	Serum			
	HBsAg	HBeAg	HBV DNA	ALT
İmmun tolerans fazı	+	+	↑↑↑	Negatif
İmmun yanıt fazı	+	+ (-)	↑↑	↑↑↑
İnaktif dönem	+	-	-	Negatif
Reaktivasyon Dönemi	+	-	↑	Negatif/ ↑↑↑

Reaktivasyon dönemi aktif replikasyon ile pasif KHB döneminin aktif hale geçtiği fazdır. Bu fazda HBV DNA sıklıkla konak kromozomal genomuna entegre olur. HBsAg HBV DNA entegre olmuş konak hücreleri tarafından üretilmeye devam edilir. Entegrasyon temelinde aktif HBV replikasyonu olmaması veya çok düşük olması nedeniyle hepatositler immün hücreleri tarafından yapılan saldırıdan genellikle etkilenmemektedir. KHB infeksiyon seyri karaciğer hasarının şiddetine bağlıdır. Reaktivasyon döneminde, hastalık, siroz ve/veya HSK gelişmesi temelinde sert olabilir ve ölüm tehlikesi taşıyabilir (66).

2.1.6.3. Hepatosellüler Karsinoma

Siroz ve HSK oluşumu KHB infeksiyonunun doğal seyrinde görülebilir. Geniş bir HBeAg-negatif popülasyona dayanarak (% 85) edinilen bilgiye bilgiye göre 30 yaşından daha küçük olan ve iyileşme göstermiş kişilerde, 1×10^4 değeri ile başlayıp, yükselen viral DNA konsantrasyonuyla birlikte siroz, HSK ve ölüm riskinin fazla

olduğu görülmüştür (10). Tüm dünyadaki HSK vakalarının % 53'ünün HBV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle HSK gelişme aşamasında HBV enfeksiyonunun belirlenmesi önem kazanmaktadır. KHB hastalarında HSK gelişim aşamaları tam olarak bilinmemektedir, ancak yapılan birçok çalışmada HSK gelişiminin HBV'ye karşı immun sistem yanıt şiddeti ve HSK'ya genetik yatkınlık gibi konak faktörleri, yüksek HBV replikasyon oranı, HBV genomunda meydana gelen mutasyonlar ile ilişkili olabileceği vurgulanmaktadır (13, 66). Etkili olmayan immun cevap, kronik enfeksiyonunda temel onkojenik faktör olabilmektedir. Diğer bir kelimeyle, aynı T-hücre cevabı farklı etkilere sahip olabilmektedir, eğer T-hücre cevabı yeterince güçlü ise HBV karaciğerden eradike edilebilir. Eğer edilemezse, HBV eradikasyonu amaçlamayacak biçimde, pro-karsinojenik etki nekrotik inflamatuvar hastalık ile indüklenebilmektedir. Böylece, immun sistem aracılı kronik karaciğer iflamasyonu, hücre ölümü ve daha sonra hücre proliferasyonu ile genetik değişiklikler ve kanser oluşma riski ortaya çıkmaktadır (13).

2.1.7. Epidemiyoloji

2.1.7.1. Bulaşma Yolları

Tek önemli rezervuarı insan olan HBV'nin yayılmasında taşıyıcılık kavramı oldukça önemlidir. Taşıyıcılar dışında kronik hastalar ve akut enfeksiyon geçirmekte olan bireylerin kan ve vücut sıvıları bulaşmada önemli rol oynar (67). HBV temel olarak parenteral yolla, infekte kan ve sıvılarla perkutan ve mukazal temas, infekte kişiyle cinsel ilişki ve perinatal yolla bulaşmaktadır (4).

İnfekte kan ve kan ürünleri nakli, damar içi uyuşturucu kullananlarda ortak enjektör kullanımı ve diğer ortak kullanılan kesici-delici aletler aracılığı ile bulaşma HBV'nin en önemli bulaşma yoludur. Taşıyıcılarda, cinsel salgılarda HBV bulunmakta ve cinsel eşlerine mukozal yolla girerek enfeksiyona yol açmaktadır. Transplantasyon, perinatal ya da postnatal anne sütü aracılığı ile de bulaşma olabilir. En sık, doğum sırasında infekte kan ve salgılar aracılığı ile bulaşma olmaktadır. Bunlara ek olarak aynı ev içinde, yakın yaşama koşullarında HBV bulaşması olmaktadır. Kan ve kan ürünleri

dışında virusun tükürük, idrar, feçes, ter, gözyaşı, vajinal salgılar, sinoviyal sıvılarda bulunması özellikle bu yollarla da bulaşma olduğunu düşündürmektedir (4, 68).

2.1.7.2. Dünyada HBV enfeksiyonu

HBV enfeksiyonu insanlarda en çok yaygın olan viral enfeksiyonlar arasında olup birçok ülkede ciddi bir sağlık problemi oluşturmaktadır. Dünyada 2 milyar insan (dünya nüfusunun 1/3'ü) HBV ile enfektedir. Bu enfekte kişilerin yaklaşık 360 milyonu kronik olarak enfektedir ve siroz ve HSK gibi yaşamı tehdit edici komplikasyonların oluşma riski vardır (3).

HBV enfeksiyonu her yıl 0,5 ile 1,2 milyon ölüm ile ölüm oranı temelinde hastalıklar arasında 10. sıradadır. Buna ek olarak karaciğer nakil operasyonlarının sonucunda oluşan hastalıkların % 5-10'undan HBV sorumludur (68).

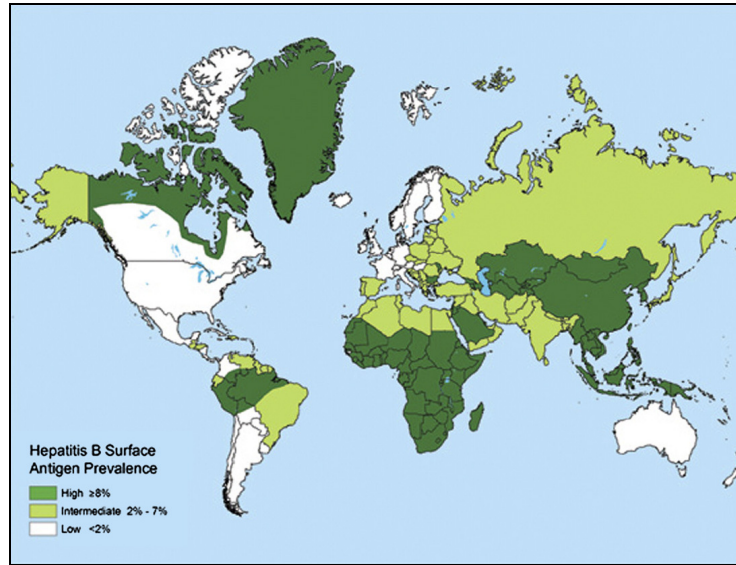
KHB enfeksiyonu prevalansı tüm dünyada % 5 dolaylarında olup, bu oran bölgeler arasında farklılık göstermektedir. Enfeksiyon oranları ABD'de ve Batı Avrupa'da düşük (% 0,1-2,0), Akdeniz ülkeleri ve Japonya'da orta (% 2,0-8,0) ve Güney Asya ve Sahra altı bölgelerde yüksek (%8,0-20,0) oranlara sahiptir (10). Asya-pasifik, dünyadaki tüm HBV taşıyıcılarının yaklaşık % 75'inin yaşadığı yüksek endemisiteli bir bölgedir. Dünya nüfusunun % 45'i yüksek HBV oranına sahip olan bu bölgede yaşamaktadır (3).

Yüksek HBV taşıyıcılığı olan bölgelerde, enfeksiyon neredeyse her zaman doğum sırasında veya erken yaşlarda bulaş göstermektedir. HBV HBeAg pozitif olan ve bu nedenle oldukça enfekte olan annelerden doğan infantlar çok yüksek risk altındadır. Bu bebeklerin % 70-90'ı HBV ile enfekte olmakta ve bunların % 90'ı ise kronik enfeksiyon geçirmektedir (69).

Enfeksiyon bulaşı yetişkin zamanda olduğunda, HBV enfeksiyonunun kronikleşme riski göreceli olarak daha düşük olmaktadır. Düşük prevalans HBV taşıyıcılığı gösteren bölgelerde, HBV bulaşı genellikle yetişkin zamanda olmaktadır (70).

Kronik infeksiyon oranı erkeklerde kadınlara göre daha fazladır. Sahra-altı Afrika'da HBV bulaşı erkek ve kadınlarda yaklaşık olarak aynı iken (sırayla 1,1: 1,0) kronik infeksiyon oluşma oranı erkeklerde daha yüksektir (3,2: 1,0) (69).

Yüksek endemisiteli ülkelerde (Hindistan ve Japonya dışındaki kalan birçok Asya ülkesi) HBsAg pozitifliği % 8'in üzerindedir. Bu bölgelerde hayat boyunca HBV ile karşılaşma riski % 60'tan fazladır. Orta endemisiteli ülkelerde (Kuzey Afrika ülkeleri, Ortadoğu ülkeleri, Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz havzası, doğu Avrupa ve Rusya) dünya nüfusunun % 43'ü yaşamakta ve HBsAg pozitifliği % 2 -7, HBV ile karşılaşma riski ise % 20-60 oranındadır. İnfeksiyonun çoğu erişkinlerde görülmesi temelinde akut infeksiyon daha fazla görülür. Düşük endemisiteli ülkelerde dünya nüfusunun % 12'si yaşamakta ve HBsAg pozitifliği % 2'nin altındadır. ABD, Batı Avrupa ülkeleri ve Avustralya bu bölgeye girmektedir. Bu bölgelerde, yaşam boyu HBV ile karşılaşma riski % 20'den azdır (Şekil 2.11) (3, 7).



Yeşil: Yüksek prevalans (> %8 üstü), Sarı: Orta prevalans (% 2-7), Beyaz: Düşük prevalans (< %2)

Şekil 2.11. Hepatit B yüzey antijen prevalansı (7).

2.1.7.3. Türkiye’de HBV enfeksiyonu

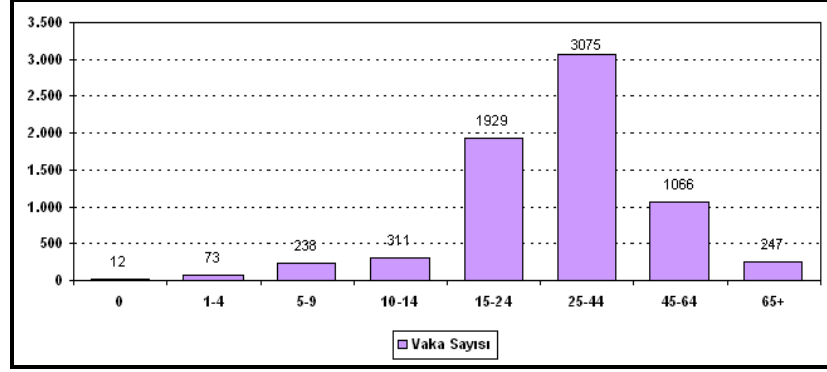
Türkiye hepatit B kapsamında orta düzeyli endemik (% 2-8) bir bölgedir. Ülkemizde hepatit B yüzey antijeni taşıyıcılığı % 4-10 civarında olduğu bildirilmektedir (71). İstanbul ve İzmir gibi Batı illerinde % 3-4,5 gibi daha düşük oranda HBsAg pozitifliği bildirilirken; Diyarbakır, Elazığ, Van gibi Güneydoğu ve Doğu Anadolu illerinde % 8-14,3 gibi yüksek oranlar bildirilmiştir (4).

Ülkemizde 1990 yılından itibaren hepatit A ve B verileri ayrı olarak toplanmaya başlanmış ve 2005 yılına gelene kadar hepatit B’li vaka ve ölüm hızları tespit edilerek Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanmıştır. Bu rapora göre (72); yıllar içerisinde hepatit B’ye bağlı vaka sayısının arttığı, morbitide hızının arttığı ve mortalite hızının azaldığı görülmektedir (Şekil 2.12).

Yıllar	Yıl Ortası Nüfus	Vaka Sayısı	Morbidite Hızı (100.000)	Ölüm Sayısı	Mortalite Hızı (1.000.000)
1990	57.582.446	2.620	4,55	18	0,31
1991	57.736.288	2.455	4,25	11	0,19
1992	59.088.101	2.551	4,32	12	0,20
1993	60.384.474	2.276	3,77	8	0,13
1994	61.779.288	3.099	5,02	24	0,39
1995	63.206.510	2.423	3,83	10	0,16
1996	62.727.000	2.435	3,88	19	0,30
1997	63.745.000	4.343	6,81	11	0,17
1998	64.786.000	5.003	7,72	10	0,15
1999	65.819.000	4.362	6,63	18	0,27
2000	67.844.903	4.115	6,07	17	0,25
2001	69.081.716	5.578	8,07	9	0,13
2002	70.415.064	5.813	8,26	3	0,04
2003	71.772.711	5.206	7,25	6	0,08
2004	71.152.000	6.951	9,77	7	0,10

Şekil 2.12. T.C Sağlık Bakanlığı 1990-2004 yılı arası Hepatit B vaka ve ölüm sayıları rutin bildirim raporu (72).

Aynı rapor verilerine göre, hepatit B vakalarının yaş gruplarına göre dağılımı kapsamında 25-44 yaş grubunun en yüksek vaka oranına sahip olduğu görülmektedir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. T.C Sağlık Bakanlığı 1990-2004 yılı arası hepatit B vakalarının yaş gruplarına göre dağılımı (72).

2.1.7.4. Hepatit B Virüsü İlişkili Hepatosellüler Karsinoma Epidemiyolojisi

HSK günümüzde önemli bir hastalık olup yüksek nüfusu olan bölgelerdeki yüksek insidansı önemini arttırmaktadır. HSK günümüzde önemli kanser türleri arasında altıncı sıradadır (toplam 696.000 ölüm, % 9,2) (73). Her yıl dünya çapında 630.000 yeni tümör vakası oluşurken, bu yeni kanser vakalarının % 5,7 (erkeklerde % 7,5, bayanlarda % 3,5)'si HSK kapsamına girmektedir. HSK yıllık kanser ilişkili ölümlerde üçüncü sıradadır (74).

HSK standart bir coğrafik dağılım göstermemektedir. Vakaların % 80'i gelişmekte olan ülkelerde görülürken, tüm vakaların % 55'i sadece Çin'de görülmektedir. Yüksek insidansı olan bölgeler doğu ve güneydoğu Asya, Malezya ve Sahra-altı Afrika'dır. Yüksek insidanslı bölgeler ile düşük insidanslı bölgeler arasındaki yaklaşık 100 kat gibi büyük bir farklılık görülmektedir (73, 74).

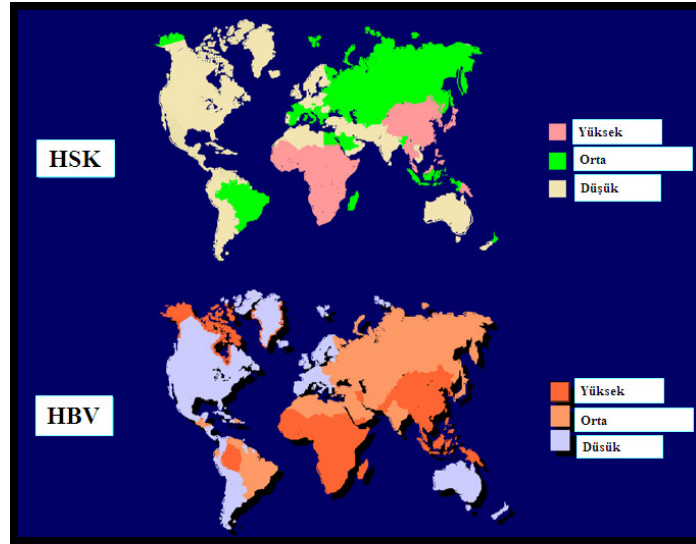
Erkeklerde HSK oluşumu bayanlara göre daha fazladır. Düşük insidanslı bölgelerde cinsiyet temelinde erkek ve kadınlarda sırasıyla 2:1 oranı varken; bu oran yüksek insidanslı bölgelerde ise 3 ya da 4:1 şeklindedir. Yüksek insidanslı bölgelerdeki erkek cinsiyetli vakaların çoğunluğu genç yaşlarda görülmeye başlanırken, düşük veya orta insidanslı bölgelerde ise yaş oranı yükselmektedir. Buna bağlı olarak, endüstrileşmiş ülkelerde, HSK 40 yaş altında nadir görülürken 40-70 yaş arasında yaş artışına bağlı olarak oran artmaktadır (74).

HSK Afrikalılar ve Çinlilerde daha çok çocuklarda genellikle erken yaşlarda edinilmiş kronik infeksiyondan kaynaklanır. Buna karşın, gelişmiş ülkelerde, çocuklarda nadir görülen HSK ise genetik metabolizma hastalığı kaynaklı gelişmektedir (69, 75).

İlk kez 1975’de rapor edilen HBV ile HSK arasında ilişkiden sonra günümüzde HBV, HSK’nın en önemli sebebi olarak kabul edilmeye başlamıştır. Dünya genelinde, HBV’nin, tüm HSK vakalarının % 55’inden sorumlu olduğu düşünülmekte ve HBV ilişkili HSK vakalarının % 89’u virusun endemik veya hiperendemik olduğu bölgelerde rapor edilmiştir (76).

Dünya genelindeki 360 milyon HBV taşıyıcısından yaklaşık ¼’ünde HSK oluşumu gözlenmektedir. Kronik olarak infekte olan erkeklerde her yıl 340-804/100.000 ve kadınlarda 120-178/100.000 oranında tümör oluşum insidansı rapor edilmiştir (76).

HSK’nın coğrafik dağılımı kapsamında, tümör oluşumu yüksek olan bölgeler HBV’nin endemik veya hiperendemik olduğu bölgelerle uyumluluk göstermektedir. Buna karşın, HSK insidansının düşük olduğu bölgelerde HBV taşııcılığının da düşük olması dikkat çekicidir (Şekil 2.14) (76).



Şekil 2.14. Hepatosellüler karsinoma (HSK) ile Hepatit B virus (HBV) insidansı arasındaki paralel coğrafik ilişki (69 nolu kaynaktan değiştirilmiştir).

Türkiye'deki HSK insidansı, 2003 yılı Sağlık Bakanlığı verileri temelinde, 0,83/100.000 oranındadır. Yıllara göre insidans dağılımında; 2000-2003 yılları arasındaki dağılım benzerdir (2000 yılında 0.80/100.000, 2001 yılında 0.87/100.000, 2002 yılında 1.1/100.000 ve 2003 yılında 0.87/100.000) (77, 78).

2.1.8. Tedavi

Hepatit B infeksiyonunun kontrolünde başlıca 2 önemli stratejik hedef düşünülebilir. Bunlar; aşılama ve hastalığa bağlı komplikasyonların önlenmesidir. Hastalığa bağlı komplikasyonların önlenmesi için, antiviral tedavilerin kullanılması, HSK yönünden tarama yapılması, yaşam tarzının düzenlenmesi (Alkol alımı ve aşırı kilo alımı vs.) gibi önlemlerin alınması gerekmektedir. Tedavi başlangıcında hastanın özgeçmiş, risk faktörleri ve bulaş yolları ile infeksiyon süresi önemli ölçüde klinik seyir ve olası komplikasyonların belirlenmesinde yararlı olmaktadır (79).

Tedavi kararı alınmadan önce hastalığın evresinin yanı sıra serolojik ve viral göstergeler, histolojik aktivite gibi faktörler göz önünde bulundurulur (79).

Hepatit B infeksiyon tedavisinde antiviral tedavinin amacı HBV DNA düzeyini çok düşük ya da saptanamayan düzeye indirerek hastalığın siroza ve HSK'ya ilerlemesini önlemektir (79). Ancak tedaviyle HBsAg ve HBV DNA'nın sürekli kaybı sağlanamamaktadır (80).

Kronik HBV infeksiyonunda destek tedavisi uygulanır; antiviral tedavi endikasyonu yoktur. Hastanın karaciğer yetmezliği yönünden yakından izlenmesi önerilir. Fulminan hepatit gelişme durumunda ise karaciğer transplantasyonu endikasyonu vardır (4).

Kronik infeksiyon tedavisinde, karaciğer komplikasyonlarının engellenmesi ve bulaştırıcılığının azaltılması amaçlanır (4). Kronik HBV tedavisinde kullanılan hedef noktaları klasik olarak ALT'nin normalleşmesi, HBV DNA'nın negatifleştirilmesi, tek başına ya da anti-HBe antikorunun oluşması ile birlikte HBeAg'nin kaybolması ve histolojik iyileşmedir (79).

KHB infeksiyonu için HBsAg ve HBV-DNA pozitif, karaciğer biyopsisinde KHB bulguları saptanan ve serum ALT düzeyi normalin en az 1,5 katını aşan (>100 IU/L) olgular tedavi adaydırlar (79).

KHB tedavisinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ilaçlar; Standart İnterferon (IFN) α , 2a ve 2b, Pegile İnterferon (Peginterferon) α , 2a, Lamivudine, Adefovir, Entecavir, Telbuvudin ve Tenofovir'dir (80, 81). İnterferon grubu ilaçlar immunomodülatör, diğerleri nükleotid/nükleozid analoglarıdır (82). Hepatit B tedavisinde kullanılan bu ilaçların çeşitli bulgular açısından etkileri farklı olabilmektedir (Çizelge 2.4). Nükleotid/nükleozid analogları HBV DNA'yı etkin baskılama, HBeAg serokonversiyonu ve ALT normalleşmesini sağlama konusunda oldukça etkin ilaçlardır. Oral alınmaları en büyük kolaylıktır. Ancak değişik boyularda gelişen direnç ve sonrasında tedaviye primer yanıtızsızlık sorunu ve uzun süre kullanılma zorunluluğu vardır (78).

Çizelge 2.4. Kronik HBV infeksiyonunda kullanılan tedavilerin etkinliği (83 nolu kaynaktan değiştirilmiştir).

	HBeAg Kaybı (%)	HBeAg Serokonversiyonu (%)	HBsAg kaybı (%)	Virolojik Yanıt (%)	ALT normalleşmesi (%)	Histolojik Yanıt (%)
HBeAg (+)						
İnterferon ^a	33		12			
Peginterferon ^a	34	32	3	32	41	38
Lamivudine ^b	32	17-22	0	44	41	52-56
Adefovir ^b	24	12		21	48	53
Entecavir ^b						
Antiviral naif		21		72	69	72
LAM dirençli		8		22	65	
HBeAg (-)						
İnterferon ^a			15			
Peginterferon			4	43	59	48
Lamivudine ^b			0	65-90	60-96	60
Adefovir ^b				51	72	64-70
Entecavir ^b				95	78	

HBeAg Serokonversiyonu=HBeAg kaybı anti-HBe oluşması

a. Tedavi bitiminden 6 ay sonra

b. Tedaviden 48 hafta sonra

2.1.8.1. İmmunomodulator ilaçlar

2.1.8.1.1. İnterferon ve Pegile İnterferon tedavisi

İnterferon alfa öncelikle immunomodulator etkilidir ve virusun temizlenmesinde bu etkisini konağın hücrel immun yanıtını güçlendirerek yapmaktadır. IFN viral DNA sentezini inhibe eder ve antiviral enzimleri aktive eder. Diğer taraftan da HBV ile infekte hepatositlere karşı hücrel immun yanıtı, Sınıf I doku uygunluk antijenlerinin ekspresyonunu artırarak ve Th lenfositler ile NK lenfositleri uyararak aktive eder (78).

İnterferon tedavisinde HBeAg serokonversiyonu % 25-40 oranında olmaktadır. Bu temelde IFN, yüksek viral yüke ($> 2 \times 10^7$ IU/ml) sahip hastalarda, HBeAg serokonversiyonun indüklenmesinde çok efektif değildir. Yüksek viral yoğunluk ve düşük ALT düzeyli hastalarda interferon tedavisi önerilmemektedir (84). İnterferon dekompanse hastalığı olanlarda kullanılamaz. Primer olarak kompanse hastalığı olan, zeminde depresyon ve otoimmün hastalığı olmayan hastalarda seçilebilecek uygun bir tedavidir (78).

İnterferon tedavisinin diğer tedavilere göre avantajı tedavi süresinin belirli olması, tedaviye dirençli mutantların gelişmemesi ve kalıcı yanıtın daha uzun süreli olmasıdır. En önemli dezavantajları ise çeşitli yan etkilere sahip olabilmesidir (85).

Standart interferon tedavisinin önerilen dozları 4 ay süreyle, haftada 3 kez 9-10 MU ya da günde 5 MU şeklindedir (79, 86).

İnterferon molekülüne polietilen glikol eklenmesiyle pegile IFN'ler oluşmakta ve bu şekilde molekülün plazma ömrü uzatılmakta ve daha uzun süreli etki sağlamaktadır. Pegile IFN (Peg IFN)'lerin, peg IFN 2a ve 2b olmak üzere iki tipi vardır (78).

İnterferon alfa'nın günlük tek veya birkaç defa uygulanmasının aksine peg IFN alfa-2a tedavisi, daha uzun serum yarıömrü temelinde, haftalık uygulanabilmektedir. Bu nedenle, KHB tedavisinde standart IFN tedavisi, peg IFN ile daha fazla uygulanabilir bir tedavi haline getirilmiştir (80).

2.1.8.2. Nükleozid Analogları

Nükleozid analogları HBV'nin replikasyonunu durdurarak etki ederler. Bu bileşikler hücre içindeki DNA polimeraza bağlanmak için doğal substratlarla yarışır. Yeni sentezlenen DNA'ya bağlandıkları zaman DNA sentezini durdurarak viral replikasyonu baskırlar. Ancak nükleozid analogları HBV infeksiyonunun süregelen olmasını sağlayan cccDNA'nın yok edilmesinde başarılı olamamıştır. Nükleozid analogları ya da diğer antiviral tedavilerde hedef cccDNA'nın sentezini önlemektir (78).

2.1.8.2.1. Lamivudin

Lamivudin (LAM), KHB tedavisi için kullanılmış ilk lisanslı (1998) ajandır. Lamivudin ters transkriptaz inhibitörü olup ilk kez HIV infeksiyonunun tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiş bir pirimidin nükleozid analogudur (78, 80). LAM, iki fosforilasyon aşamasından geçer; bu fosforilasyon aşamaları sonrasında LAM trifosfat (L-TP) oluşur ve bu yapı deoksi-sistidin trifosfat (dCTP) gibi aktivite gösterir. Bu yapının oluşmasıyla beraber HBV polimeraz HBV DNA'yı sentezlerken, L-TP yapısını dCTP'nin yerine kullanır ve L-TP yalancınükleotid (pseudonucleotid) olarak davranarak HBV-DNA'nın tam olarak oluşumunu ihhabe eder (86).

Lamivudinin tasarlanmasının erken zamanlarında, bu ajanın farklı dozajlarda HIV ve HBV'yi suprese ettiği görülmüştür. Buna göre, HBV supresyonu için sadece 100mg/gün gerekirken, HIV tedavisi için ise 300 mg/gün gerektiği görülmüştür. LAM oral yolla alınır ve 2 saat içinde en yüksek aktivasyonunu gösterir ve vücuttan eliminasyon yarı-ömrü yaklaşık 6 saat kadardır (87).

Lamivudin tedavisinin uzunluğuna bağlı olarak, hastalarda, tedaviye cevap etkinliğinin düşmesi ile sonuçlanan direnç gelişimi görülmektedir. LAM direnci genotipik olarak tedavi başlangıcından 49 gün sonra oluşabilmekte ve bu direncin fenotipe yansımaları ise, mutasyon başlangıcından 3-4 ay sonra görülebilmektedir (88).

Lamivudin direnci ile ilişkili mutasyonlar yaygın olarak tedavinin ilk 1-3 yılı arasında oluşmaktadır. Mutasyon oluşumu HBV DNA ve ALT düzeyleri limit değerlerin üzerinde olmakla birlikte tedavi öncesi klinik değerlere göre yarı değerler

görülmektedir, ancak rtV173L mutasyonu gibi yüksek oranlarda görülebilen mutasyonlar ile mutant-tip virus popülasyonunun replikatif baskınlığı artmakla beraber direnç gelişim profili değişebilmektedir (88).

Lamuvidin direnci tedavi öncesi HBV DNA'sı yüksek olan, uzun süre tedavi gören ve HBV DNA'sı yüksek kalan hastalarda daha fazla gelişebilmektedir (89).

Lamuvidin kompanse ve dekompanse sirozlu hastalarda, gebeliğin son trimestrinde, karaciğer nakli olmuş hastalarda ve kemoterapi alan hastalarda tedavi için yararlı bir ilaçtır. Diğer nükleotid analoglarına göre avantajı ucuz olması, HBV DNA oranını hızlı düşürmesi, histolojik düzelme sağlaması, yan etkilerinin oldukça düşük olması iken dezavantajı ise ilaca karşı gelişen hızlı direnç ve bunun sonucu kısa zamanda tedaviye yanıtın azalmasıdır (78).

Lamuvidin batı ülkelerinde yerini daha etkili antivirallere bırakmaya başlamıştır. LAM dirençli mutasyonların saptanmasıyla birlikte entekavir veya adefovir ile kombine tedaviye gidilebilir (83).

2.1.8.2.2. Adefovir

Adefovir dipivoksil (ADV), 2002 yılından beri KHB tedavisinde kullanılan ikinci lisanslı ilaçtır. ADV bir deoksi-adenin trifosfat (dATP) analogu şeklinde aktivite gösterir. ADV hücreye girdiğinde, AMP kinaz ile iki kez fosforilasyonu sonucunda aktif forma dönüşür. Diğer nükleotid analogları gibi ADV de yarışmacı bir inhibitördür. DNA zincir sentezini durdurarak ters transkriptaz ve DNA polimeraz aktivitesini inhibe eder (89, 90).

Kırksekiz haftalık ADV tedavisi ile cccDNA ve toplam intrahepatik DNA oranında düşüş olmakta, ancak cccDNA'nın hücreden tamamen temizlenmesi yaklaşık 14 yıl almaktadır. HBeAg pozitif veya negatif KHB'li hastalarda, 10 mg ADV ile 48 haftalık tedavi iyi bir anti-HBV etkisi göstermesine rağmen, HBeAg negatif hastalarda 144 haftaya kadar uzatılarak etkiyi arttırmak mümkün olmaktadır (90). ADV'nin yüksek dozları HBV'ye karşı yüksek potansiyele sahiptir, ancak yüksek oranda böbrek toksitesi yaratabilmektedir.

Adefovir ile tedavi sırasındaki HBeAg ve HBV-DNA düşüş oranı LAM'a göre daha fazladır, ancak biyokimyasal ve histolojik bulgular açısından LAM ile benzerdir (91).

Adefovirin dATP'ye olan yapısal benzerlik oranı, inhibitör etkisi temelinde başarısını arttırmakta ve lamuvidin ile karşılaştırıldığında daha düşük direnç gelişimi göstermekte, bu oran ortalama 2 yılda % 2 ve 5 yılda % 29 oranı ile sınırlı kalmaktadır (89, 91).

Adefovir, LAM dirençli HBV'ye karşı aktivite göstermekte ve LAM dirençli hastaların yarısında 1 yıllık tedavi sonrası biyokimyasal, virolojik ve histolojik özellikler açısından iyileşme etkisine sahiptir (90).

Adefovirin en önemli avantajları daha uzun sürede daha az oranda direnç geliştirmesi ve LAM dirençlilerde etkin olmasıdır. Bu açıdan tedavide birinci seçenek veya LAM dirençlilerde ikinci seçenek olarak kullanılabilir. En önemli dezavantajları ise yüksek dozlarda ve böbrek hastalarında nefrotoksitite göstermesi, hastaların % 25'inde suboptimal yanıt olması ve ilaç kesildiğinde alevlenmelerin görülmesidir (78).

2.1.8.2.3. Entecavir

Entecavir (ETV), 2005 yılında lisans almış ve KHB tedavisinde kullanılan bir deoksi-guanin trifosfat (dGTP) analogudur. ETV hücresel kinazlar tarafından üç kez fosforilasyona uğradıktan sonra aktif olmaktadır. Hücresel alımı çok hızlı olup yarı ömrü yaklaşık 15 saattir. ETV, HBV DNA polimeraz'ın güçlü bir inhibitörüdür (90). ETV farklı aşamalarda çoklu fonksiyon göstermektedir; polimerazın işlenmesini inhibe eder, HBV polimeraz'a yüksek affinitesi vardır, dGTP'nin yarışmacı inhibitörüdür ve zincir son verici etki gösterir (89).

Entecavir, in vitro deneylerde, günümüzde KHB tedavisinde kullanılan anti-HBV ilaçlardan en etkilisidir. İki yıl ETV tedavisi uygulanan hem HBeAg (+) hem de HBeAg (-) hastaların % 85'inde kalıcı HBV DNA supresyonu sağlanmıştır (91). ETV direnç insidansı çok düşük olup, 2 yıllık tedavi sonrası < % 1 direnç gelişimi

gözlenmektedir (89, 91). Ancak, LAM dirençli hastalarda ETV direnci 3 yılda % 15 oranındadır (89).

Entecavir tedavisinde, nükleozid naif hastalarda günde 0,5 mg, LAM dirençli hastalarda günde 1 mg dozları etkili bulunmuştur. Entecavir de nefrotoksite yapabildiği bilinmektedir ancak bu etkisi ADV'den düşüktür (78).

2.1.8.2.4. Telbivudine

Telbivudine (LdT) bir deoksi-timin trifosfat (dGTP) analogu olup HBV DNA polimerazın güçlü bir inhibitörüdür. LdT, HBeAg pozitif hastalarda yapılan faz III çalışmalarında LAM'a göre üstün etkide olduğu belirtilmektedir (90, 92). Bir yıllık tedavi sonunda % 22 HBeAg serokonversiyonu ve % 60 HBV DNA oluşumunu engellemiştir. LdT'ye karşı gelişen genotipik direnç oranı 1 yıllık tedavi sonrasında % 4,4 ve 2 yıllık tedavi sonrasında ise % 21,6 bulunmuş; HBeAg pozitif hastalarda 1 ve 2 yıllık tedaviler sonrasında sırasıyla % 2,7 ve % 8,6 oranında direnç gelişimi gözlenmiştir (80).

2.1.8.2.5. Tenofovir

Tenofovir (Tenofovir disoproksil fumarate-TDF), moleküler yapısı temelinde ADV ile ilişkisi olan nükleozid analogu olan bir HBV DNA polimeraz-ters transkriptaz inhibitörüdür. TDF 300 mg'lık oral doz miktarı kapsamında HIV tedavisi için 2008 yılında lisans almış ve sonraki çalışmalarda kuvvetli bir anti-HBV aktivitesi gösterdiği görülmüştür (92). TDF'nin, LAM ve ADV tedavisine göre daha hızlı HBV DNA oranında düşüş gösterdiği, yan etkisinin görülmediği ve henüz tedaviye direnç oluşumu görülmemiştir (81, 93).

Tenofovir, LAM dirençli hastalarda aktif olarak HBV monoinfeksiyonlu veya HIV/HBV koinfeksiyonlu hastalarda etki gösterebilmektedir (81). KHB'li hastalarda yapılan TDF klinik denemelerinde, HBeAg pozitif hastalarda % 80 ve HBeAg negatif

hastalarda ise % 95 oranında viral supresyonun olduğu ve hastaların yaklaşık ¾ 'ünde 48 hafta sonunda histolojik düzelmelerin olduğu saptanmıştır (81, 94).

2.1.9. Korunma ve Kontrol

HBV infeksiyonundan korunmak için üç ana strateji geliştirilmiştir. Bunlar; hastalık yayılımını önlemek için davranış önlemleri, pasif immunoprofilaksi, aktif immunoprofilaksi stratejileridir (95, 96).

Seksüel hayatta alınan önlemler ve kan ürünleri tarama yöntemlerinin rutin olarak uygulanması transfüzyon ilişkili hepatit bulaş riskini azaltma potansiyeline sahiptir (96).

Gelişmekte olan ülkelerde yenidoğan ve çocuklar erken yaşlarında infeksiyonu edinme riskine daha çok sahiptir. Bu toplumlarda hem aktif hem de pasif bağışıklama daha etkindir (96).

Pasif immunoproflakside kullanılan hepatit B immunglobulini (HBIG), 3-6 ay gibi kısa süre için geçici koruma sağlamaktadır. Pasif immunoproflaksi hepatit B infekte anneden doğan yenidoğanlarda, batıcı/delici yaralanma sonrası, cinsel temas sonrası ve karaciğer nakli gibi durumlarda kullanılmaktadır (96, 97).

Temas sonrası HBV infeksiyonundan korunmada aşı ile birlikte endikedir. Aşıya yanıt vermeyen kişilerin temas sonrası HBV infeksiyonundan korunmasında ise HBIG tek başına verilir. HBIG uygulamasında standart doz HBsAg (+) anneden doğan infantlarda 0,5 ml/kg, diğer endikasyonlarda ise 0,06 ml/kg'dır (98).

Karaciğer nakline giden HBV infeksiyonlu hastalarda HBIG, profilakside önemli bir konuma sahiptir. Yüksek doz ve uzun süreli HBIG profilaksisinin maliyetinin fazla olması ve nükleozid analogu ile HBIG kombinasyon tedavisinin daha etkin olması nedeniyle, günümüzde karaciğer nakli sonrası protokolde HBIG ve nükleozid analogu kombinasyonu uygulanmaktadır (96).

Aktif immunoprofilaksi kullanılan aşı uygulamaları 1970'li yıllarda infeksiyöz serumların 1/10 oranında dilüe edilip, 98 °C'de 1 dakika süre ile kaynatılıp duyarlı kişilere uygulanması ile başlamıştır. Bu şekilde bağışıklanan kişilerin, canlı HBV ile karşılaştıklarında % 70 oranında korunabildiği saptanmıştır (97).

Aşı güvenli olup tavsiye edilen üç doz (0, 1, ve 6.ay) intramüsküler hepatit B ile infant, çocuk ve genç erişkinlerin % 90-95'inde, HBV enfeksiyonu ve sekellerinden koruyacak uygun antikor cevabı alınır (antiHBs > 10 mIU/ml) (97).

HBV enfeksiyonundan korunma iki aşamalıdır; bunlar temas öncesi profilaksi ve temas sonrası profilaksidir.

HBV enfeksiyonu açısından risk taşıyan ve HBV ile enfekte olmamış kişilere aktif immunoprofilaksi önerilir. Bu kişiler; sağlık personeli, intravöz ilaç alışkanlığı olanlar, fazla sayıda cinsel partneri olanlar, kronik taşıyıcıların aile bireyleri ve cinsel partnerleri, kronik karaciğer hastalığı olanlar, hemodiyaliz ve sürekli kan ürünü transfüzyonu yapılması gereken hastalardır. Dünya Sağlık Örgütü, HBV taşıyıcı prevalansına göre yüksek endemisiteye sahip ülkelere 1995 yılında, diğer ülkelere ise 1997 yılında hepatit B aşısını ulusal aşı programına almalarını tavsiye etmiştir (95, 98).

Ülkemizde ulusal hepatit B aşılması sıfır yaş grubunda rutin aşı programına ilk kez 1998 tarihinde alınmış ve çocuk, genç erişkin ve erişkinlerde hepatit B aşı şemaları uygulanmaya başlamıştır (Çizelge 2.5) (95). Değişik aşı dozları ve şemalarına ihtiyaç duyanlar ise preterm infantlar, hematopoietik kök hücre nakli yapılanlar, hemodiyaliz hastaları, HIV ile enfekte bireyler ve kemoterapi alanlardır. Bu gruplarda hepatit B aşısına karşı azalmış humoral yanıt nedeni ile standart antijen dozunun iki katına çıkartılması veya ek aşı dozlarının uygulandığı farklı şemalar söz konusudur (99).

Riskli temas sonrası korunmada aşı ile birlikte HBIG önerilmektedir. Temas sonrası profilaksinin etkinliğinde en ana belirleyici ise ilk doz aşının uygulanma zamanıdır. Maksimum etkinlik aralığı perinatal ve delici/batıcı yaralanma sonrası 7 gün, cinsel ilişki sonrası ise 14 gündür (99).

Amerika Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezi (CDC)'nin 2003 verilerinde HBV'ye bağlı ölümlerin yaklaşık % 21'inde perinatal bulaşla, % 48'inde de < 5 yaş altında etkenin alınması söz konusudur (99).

HBsAg (+) annelerden doğan bebeklere doğar doğmaz veya ilk 12 saat içinde rekombinant aşı şemasının tamamlanması tavsiye edilir. Bu kombinasyon ile perinatal HBV bulaşından > % 90 korunma sağlanır. Yine de immunoprofilaksiye karşın infantların % 3,7-9,9'u HBV enfeksiyonunu perinatal dönemde alırlar (96).

Çizelge 2.5. Hepatit B aşı şeması (96).

YAŞ	AŞI ŞEMASI
Çocuk (1-10 yaş)	0, 1 ve 6. aylar 0, 2 ve 4. aylar 0, 1, 2 ve 12. aylar
Genç Erişkin (11-19 yaş)	0, 1 ve 6. aylar 0, 1 ve 4. aylar 0, 2 ve 4. aylar 0, 12 ve 24. aylar 0 ve 4-6. aylar 0, 1, 2 ve 12. aylar
Erişkin (>19)	0, 1 ve 6. aylar 0, 1 ve 4. aylar 0, 2 ve 4. aylar 0, 1, 2 ve 12. aylar

2.1.10. Tam

HBV infeksiyonu tanısı ve doğal seyri belirlenmesi primer olarak serolojik, biyokimyasal parametreler ve viral nükleik asitin gösterildiği moleküler yöntemlerle yapılmaktadır. Serolojik parametreler virusun genetik materyalinin kodlamış olduğu viral antijenler; HBsAg, HBeAg, HBcAg ve konağın immun yanıt olarak geliştirdiği spesifik antikolar; anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc IgG ve IgM'dir (Çizelge 2.6) (78, 100).

Çizelge 2.6. HBV infeksiyonunun serolojik göstergeleri ve önemleri (101).

Gösterge	Pozitif testin anlamı
HBsAg	HBV infeksiyonu (akut veya kronik hastalık olup olmadığını saptamak için ilave testlere ihtiyaç vardır)
Anti-HBs	HBV'ye karşı bağışıklık (doğal infeksiyona veya HBV aşılmasına bağlı olarak)
Anti-HBc	Doğal infeksiyon (akut, düzelmiş veya kronik); aşılardan sonra görülmez
Anti-HBc IgM	Mevcut veya yenilerdeki infeksiyon (6 ay içinde); HBsAg olmaksızın anti-HBc IgM varlığı, HBsAg'nin saptanabilir seviyelerin altına düştüğü bazı akut HBV infeksiyonlarında pencere dönemini gösterir; bazı kronik HBV infeksiyonlarında sürebilir

HBV'nin kesin tanısı serumda HBsAg'nin saptanmasıyla konmaktadır. Biyokimyasal tanı kriterleri olarak özellikle serum transaminazları olmak üzere karaciğer enzim değerleri incelenir. HBV DNA'sının tespiti ve kantifikasyonunun yapıldığı moleküler yöntemler ise tedavi ve hastalık seyri değerlendirilmesinde kilit rol oynamaktadır. Ayrıca diğer belirleyici bulguların yetersiz kaldığı (gizli HBV infeksiyonu) özel durumlarda asıl tanı koyucu görevi üstlenmektedir (Çizelge 2.7) (78, 100).

Çizelge 2.7. İnfeksiyon tanısında ve izlenmesinde infeksiyon periyotları ve serolojik göstergeler (101).

Gösterge	İnkübasyon Periyodu	Akut infeksiyon	Eski infeksiyon	Kronik infeksiyon	Aşılama
HBsAg	+/-	+	-	+	-
Anti-HBs	-	-	+	-	+
Anti-HBc total	-	+/-	+	+	-
Anti-HBc IgM	-	+	-	+/-	-
HBeAg	+	+	-	+/-	-
Anti-Hbe	-	-	+/-	+/-	-
HBV DNA	+/-	+	+/-	+	-

2.1.10.1. Serolojik Tanı Yöntemleri

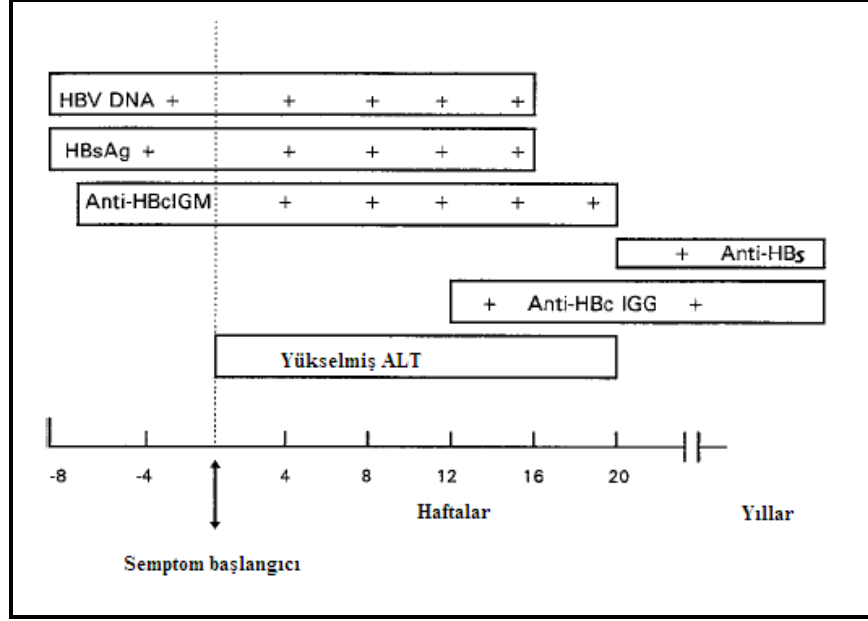
HBV ile infeksiyon oluşumu sırasında konakta virusa ait çeşitli antijenlere (HBsAg, HBcAg ve HBeAg) karşı antikorlar meydana gelmektedir. HBV infeksiyonlarının özgül tanısını yapmak amacıyla hasta serumunda bu antijenlerin ve antikorların varlığı araştırılmaktadır. Bunların saptanması için günümüzde duyarlılığı, özgüllüğü ve verimliliği yüksek serolojik yöntemlerden faydalanılmaktadır. Bu amaçla RIA yöntemleri kullanılırken, bu yöntemler yerini ELISA testlerine bırakmışlardır. Bu testlerden; akut ve kronik infeksiyon ayırımında, infektivitenin değerlendirilmesinde, bağışıklık durumunun tayininde, kan ve organ vericilerinin taranmasında yararlanılmaktadır (36).

AHB infeksiyonu sırasında HBsAg virusa ait ilk saptanan antijendir. HBsAg hastalık semptomları ortaya çıkmadan 3-5 hafta önce serumda saptanabilir düzeye ulaşmakta, seviyesi giderek yükselerek akut infeksiyon sırasında en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. HBsAg seviyesi, iyileşme ile sonlanan olgularda 2-6 ay içinde azalarak ortadan kaybolmaktadır (Şekil 2.15). HBsAg'nin kaybolmasından bir süre sonra serumda buna karşı oluşan anti-HBs antikorları ortaya çıkmakta ve genellikle hayat boyu saptanabilir bir düzeyde kalmaktadır. HBsAg'nin ortadan kaybolduğu ve henüz anti-HBs antikorlarının ortaya çıkmadığı döneme pencere dönemi ismi verilmektedir. Bu dönemde hem HBsAg hem de anti-HBs antikorları negatif olarak bulunmaktadır. Akut HBV infeksiyonundan sonra anti-HBV antikorlarının oluşması hastalığın iyileşme ile sonlandığını ve bağışıklığı göstermektedir. Kronik HBV infeksiyonunda ise genellikle

anti-HBs antikorları saptanmamaktadır. Serumda anti-HBs seviyesinin 10 mIU/ml'nin üzerinde olması koruyucu bir bağışıklık seviyesini göstermektedir (36, 101).

AHB infeksiyonundan sonra HBsAg serumda 6 aydan daha uzun süre pozitif olarak kalıyorsa, bu durum hastalığın kronikleştiğini düşündürmektedir. Bu antijenle ilgili diğer bir önemli nokta da şudur; hasta serumunda HBsAg'nin saptanması HBV infeksiyonu olduğunu göstermekte ancak infeksiyonun akut mu yoksa kronik mi olduğunu ayırt etmemektedir. Bunun yanısıra HBV aşılması sonrasında kısa bir süre için serumda HBsAg pozitifliği saptanabilmektedir, ancak olgunun izlenmesi durumunda HBV ile ilgili diğer göstergelerin ortaya çıkmaması ve kısa sürede HBsAg pozitifliğinin ortadan kaybolması ile akut infeksiyondan ayırt edilebilmektedir (101).

Akut infeksiyon sırasında genellikle HBsAg'nin ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra HBeAg ortaya çıkmakta ve HBsAg'den önce de ortadan kaybolmaktadır. Serumda HBeAg'nin varlığı bulaşıcılık, infektivite ve aktif viral replikasyon ile ilişkilidir. HBeAg'nin ortadan kalkmasından (genellikle 12-14 haftada ortadan kaybolur) kısa bir süre sonra anti-HBe antikorları ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.15). Bazı olgularda çok kısa bir süre HBeAg ve anti-HBe serumda birlikte pozitif bulunabilmektedir. Anti-HBe antikorlarının ortaya çıkması viral replikasyonun azaldığını ve hastalığın iyileşmeye doğru gittiğini göstermektedir. Ancak bazen beklenen bu durumların dışında tablolara rastlanabilmektedir. Bunlardan birisi, HBV DNA'sının prekor bölgesinde meydana gelen mutasyon sonucu oluşan mutant suşların meydana getirdiği infeksiyon sırasında hastada anti-HBe pozitifliğine rağmen aktif viral replikasyonun mevcut olduğu bir infeksiyon tablosunun görülebilmesidir. Bir diğer sürpriz tablo da, hastada HBeAg'nin sentezlenmesine rağmen serumda aktif viral replikasyonun göstergesi olan HBV DNA'nın saptanmamasıdır. Yani, hastalarda bazen serumda anti-HBe'nin varlığı aktif viral replikasyonun bittiğini göstermemekte veya bunun aksine HBeAg varlığına rağmen aktif viral replikasyon olmayabilmektedir (24, 36, 102).



Şekil 2.15. Hepatit B serolojik belirteçlerinin zaman sıralaması (102).

HBeAg'nin serumdaki varlığının 3-4 aydan uzun sürmesi kronik HBV enfeksiyonuna gidişi ifade etmektedir. KHB enfeksiyonunda HBeAg'nin pozitifliğini sürdürmesi ağır karaciğer hastalığı gelişmesi riskini arttırmaktadır (102).

Serolojik tanıda kor bölgesi ile ilgili kullanılabilecek gösterge anti-HBc antikorlarıdır. Anti-HBc, HBsAg saptandıktan kısa süre sonra ve anti-HBs ortaya çıkmadan önce görülmektedir. İlk başta anti-HBc'nin hakim immünoglobülin sınıfı IgM'dir. Anti-HBc IgM enfeksiyon başladıktan birkaç hafta sonra en yüksek seviyelere ulaşır, bundan sonra titresi azalmaya başlar ve ortaya çıktıktan 4-8 ay (bazen 12 ay) sonra ortadan kaybolur (HBsAg'den oldukça uzun bir süre kalmaktadır). Bu bilgiler ışığında akut HBV enfeksiyonunun tanısı ile ilgili olarak şu söylenebilir ki HBsAg pozitif olan bir olguda anti-HBc IgM antikorunu negatif buluyorsa o hastada akut enfeksiyon olasılığı söz konusu değildir. Anti-HBc IgM sınıfı antikorlarının görülmesinden bir süre sonra IgG sınıfı antikorlar da ortaya çıkmakta ve bunlar genellikle hayat boyu saptanabilir düzeylerde kalmaktadırlar (23, 101).

Anti-HBc IgM ile ilgili önemli özelliklerden bir tanesi, akut HBV enfeksiyonunun pencere dönemi esnasında (HBsAg ve anti-HBs antikorunun saptanamadığı dönem) enfeksiyonun tek göstergesi olduğudur (pencere döneminin

uzadığı olgularda anti-HBc IgM ortadan kaybolur ve sadece anti-HBc IgG antikorları pozitif olarak saptanabilir) ve bu dönemde serum infeksiyöz olarak kabul edilmektedir. Diğer önemli özellik, anti-HBc IgM'nin sadece akut dönemde değil KHB infeksiyonunun akut alevlenmeleri sırasında da pozitifleşmesidir. Ancak akut dönemdeki IgM titresi oldukça yüksek düzeyde iken, kronik infeksiyon sırasında düşük seviyelerde olmaktadır (101).

Anti-HBc IgM ile ilgili önemli özelliklerden bir tanesi, akut HBV infeksiyonunun pencere dönemi esnasında (HBsAg ve anti-HBs antikorunun saptanamadığı dönem) infeksiyonun tek göstergesi olduğudur (pencere döneminin uzadığı olgularda anti-HBc IgM ortadan kaybolur ve sadece anti-HBc IgG antikorları pozitif olarak saptanabilir) ve bu dönemde serum infeksiyöz olarak kabul edilmektedir. Diğer önemli özellik, anti-HBc IgM'nin sadece akut dönemde değil kronik HBV infeksiyonunun akut alevlenmeleri sırasında da pozitifleşmesidir. Ancak akut dönemdeki IgM titresi oldukça yüksek düzeyde iken, kronik infeksiyon sırasında düşük seviyelerde olmaktadır (101).

Anti-HBc IgG'nin pozitifliği kişinin HBV ile karşılaştığını göstermektedir ama akut, kronik veya eski infeksiyonu birbirinden ayırt etmemektedir. Bütün serolojik göstergelerin negatif olmasına karşılık tek başına anti-HBc IgG pozitifliği şu durumlarda saptanabilir:

a)Hepatit B infeksiyonundan iyileşmiş ve anti-HBs düzeyi saptanamayacak seviyeye inmiş kişiler. Böyle bir kişiye tek doz HBV aşısı yapılırsa 2 hafta sonra anamnestic bir reaksiyon sonucu anti-HBs yanıtı alınır.

b)HBsAg'nin saptanamayacak kadar düşük seviyede olduğu kronik infeksiyonlu kişiler.

c)Uzamış pencere dönemi. Pencere dönemi uzarsa anti-HBc IgM antikorları, anti-HBc IgG antikorları ile yer değiştirir.

d)Yalancı pozitiflik.

e)Kan transfüzyonunu takiben veya anneden bebeğe antikorların pasif olarak aktarımı. Bunlar 3-6 ay içinde aşamalı olarak ortadan kaybolurlar (4, 23, 24, 36).

KHB infeksiyonlu hastalar, HBV replikasyonlarının seviyesini ve infektivitelerinin potansiyelini saptamak için HBeAg ve anti-HBe bakımından incelenebilirler. HBeAg pozitif olan serumlar, anti-HBe pozitif serumlara göre belirgin

olarak daha yüksek konsantrasyonlarda HBV içermektedirler. Bu nedenle, HBeAg pozitif hastaların cinsel ilişki yoluyla, perkutan yol ile veya perinatal olarak HBV bulaştırma ihtimalleri çok daha fazladır. İnterferon gibi antiviral bir ajanla tedavinin etkinliğinin saptanmasında HBeAg'nin kaybolması ve anti-HBe antikorlarının oluşması arzu edilen bir değişimdir (36).

2.1.10.2. Moleküler Tanı Yöntemleri

HBV tanısında 1980'li yıllardan itibaren serolojik tanı yöntemlerinin yanı sıra moleküler tanı yöntemlerinin de kullanımı gündeme gelmiş ve HBV konusunda çeşitli yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Önceleri insan serum ve dokularında dot blot hibridizasyon veya sıvı ortamda gerçekleştirilen klasik hibridizasyon teknikleri kullanılarak HBV DNA'sı saptanmıştır. Ancak bu yöntemler ile 10^5 virus partikülü/ml belirlenebilmekte, örnekte daha az sayıda DNA varlığında yöntem yetersiz kalmaktadır. Bu sıkıntıları aşmak için, Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi ortamdaki nükleik asit miktarını saptanabilir düzeye kadar çoğaltacak yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerle önceleri örnekte viral genomun varlığı kalitatif yönden araştırılmakta iken, geliştirilen tekniklerle bunun yanı sıra kantitatif olarak genomun örnekteki miktarı da saptanmaya başlanmıştır (78).

HBV DNA'sını saptamak için uygulanan testleri iki grupta toplamak mümkündür. Bunlar; hibridizasyon temelli testler ve PZR temelli hedef nükleik asit amplifikasyon testleridir (78, 103).

Hibridizasyon temelli testlerde, hedef nükleik aside spesifik problemlerin bir dizi hibridizasyon sonucu; viral DNA'ya bağlı, olabildiğince yüksek sinyalin eldesi esasına dayanır. Bunun için ya proba bağlı sinyal moleküllerinin sayısı ya da gücü artırılır. Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde duyarlılık sınırları 10^5 - 10^6 (1pg DNA)'den 10^3 virüs partikülü/ml'e kadar duyarlılığı olabilmektedir (78, 103).

Nükleik asit amplifikasyon temelli testler ise viral DNA veya RNA üzerindeki spesifik hedef gen bölgelerinin çoğaltılması prensibine dayanır. En çok uygulanan teknik PZR olup duyarlılığı 10^2 - 10^3 arasındadır (103).

2.1.10.3. HBV ilaç direncinin saptanması

HBV ilaç direncinin görüntülenmesi için birçok teknik vardır. Bu yöntemler genotipik ve fenotipik yöntemler şeklinde gruplandırılabilir. Bu yöntemler duyarlılık, uygulanabilirliği, maliyetleri, sonuçların yorumlanabilirliği açısından farklılık göstermektedir (Çizelge 2.8) (103).

Çizelge 2.8. HBV İlaç direncinin saptanmasında kullanılan test yöntemlerinin karşılaştırılması (103 nolu kaynaktan değiştirilmiştir).

	Duyarlılık ¹	Maliyet	Değerlendirme zorluğu	Otomatize uygulanabilirliği	İşgücü yoğunluğu
Genotipik metotlar					
Direk sekans	% 15-50	Yüksek	Yüksek	Evet	Yüksek
RFLP	% 5-10	Düşük	Orta	Hayır	Yüksek
RT-PCR	% 5-10	Yüksek	Orta	Hayır	Düşük
LİPA	5%	Orta	Düşük	Evet	Düşük
Floresans	UD	Orta	Orta	Evet	Orta
MALDI-TOF	< % 5	Orta	Orta	Evet	Orta
Mikrodizilimler	UD	Yüksek	Yüksek	Evet	Düşük
İndirekt metotlar					
Viral yük	UD	Düşük	Düşük	Evet	Düşük
Fenotipik deneyler					
	UD	Yüksek	Yüksek	Hayır	Yüksek

¹ Duyarlılık, yöntemin mutant ve wild tip virus karışımında saptanabildiği en düşük düzey (%).
UD-Uygulanabilir değil

Genotipik metotlar

Genotipik yöntemlerden direk DNA sekans yöntemi yeni genotipik yöntemler geliştirmek için altın standarttır. Viral genotip üzerindeki hedef HBV DNA bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonrasında sekans yapılması bu gen bölgeleri hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Bu tekniğin temel avantajı yeni ilaç tedavisine başlayan hastalarda oluşabilen yeni mutasyonların saptanabilmesidir. Dezavantajı ise zaman alıcı olmasıdır (104).

Line probe deneyi (LIPA) ters hibridizasyona dayanır. Hedef bölgenin PZR ile amplifikasyonu yapıldıktan sonra, aranacak mutasyon için spesifik prob tasarlanarak değerlendirme yapılır. Bu temelde yöntemin dezavantajı yalnızca bilinen mutasyonların taranabilmesi ve yeni mutasyon profilleri için güncelleme ihtiyacının olmasıdır (104).

DNA mikrodizilimleri (DNA çip teknolojisi) yönteminde yine PZR amplifikasyonu sonrası mutasyonların saptanması için yüksek yoğunluklu çipler kullanılır. Dezavantajı çip üzerine hibridize edilmiş oligonükleotid problemlerin fazla çeşit mutasyonel analize izin vermesine rağmen bu mutasyonların bilinen mutasyon profilleri olması ve yine yeni mutasyon profilleri için güncelleme ihtiyacının olmasıdır (104).

Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi ise filogenetik analizlerin yapılması amacıyla uygulanmakta olup bu yöntemle sekans analiz bilgisine genotipleme bilgisinin eklenmesi ve ağırlıklı olarak moleküler epidemiyolojik çalışmalarda tercih edilmektedir. RFLP, PZR ile amplifikasyonu yapılmış genomun özellikle genotip ve subgenotiplerde spesifik olarak bulunan korunmuş kesim bölgelerinin spesifik enzimler ile kesilmesi ve karşılaştırmalı olarak analizi esasına dayanır (78).

MALDI-TOF kütle spektrometresi temelli genotiplemede yönteminde ise, HBV temelinde, YMDD motifini kodlayan varyant ve wild-tip HBV oligonükleotidler moleküler ağırlıklarındaki farklılık analiz edilerek karşılaştırılır. HBV genomunun doğal olarak var olan 7 mer *Fok I* ve 13 mer *BstF5I* bölgelerinin kesimi ve spesifik primerler ile PZR yöntemi temelinde amplifikasyonu sonrasında kütle polimorfizm analizi yapılması esasına dayanır (104).

İndirekt metotlar

İndirekt metotlar kapsamında, HBV DNA'nın ölçümü (viral yük deneyi) ve bu kantitatif analizin değerlendirilmesi temelinde tedaviye yanıt ve direncin olup olmadığı dolaylı olarak değerlendirilebilir. Bu temelde, ilaç direnç oluşumu ve sonucunda tedaviye yanıtın durması viral yükün artması ile sonuçlanmaktadır. HBV DNA miktarındaki anormal değişiklikler fenotipik direnç oluşumunun başladığına işaret

edebilmektedir, ancak bunun spesifik genotipik yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir (103).

Fenotipik metotlar

Bu metotlar hücrel teknikler ya da hayvan deneylerine temelli yapılır. Bu gibi yöntemler HBV replikasyonu ve cccDNA'nın hücrel döngüsünün izlenmesi amacıyla uygulanmaktadır. Bu yöntemlerin uygulanması açısından yüklü iş gücüne sahip olması nedeniyle rutin uygulamaları yoktur (103).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler

Çalışmaya Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı'ndan 2004 yılından beri çalışmalarımıza dahil etmiş olduğumuz KHB tanısı konmuş hastalardan 61'inin serum örneği dahil edilmiştir. Serumdan DNA ekstrakte edilip HBx PCR için kullanılmış ve HBx geninin nükleotid 1400-1979 arasında kalan bölge nested PCR ile amplifiye edilerek saflaştırılmış, daha sonra DNA cycle-sequencing metodu ile dizi analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen diziler, gen bankasından temin edilen referans dizi kayıtları ile karşılaştırılarak HSK ile ilişkilendirilmiş çeşitli nokta mutasyonları araştırılmıştır.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

PZR cihazı (Thermal Cyclers, Eppendorf Mastercycler)
Güvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe)
Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra P30)
Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra)
Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich- Universal 32 R)
Mikrodalga Fırın (Beko- MD 1500)
Derin Dondurucu (Uğur)
Etüv (Memmert)
Otoklav (Nüve- OT 020)
Hassas Terazisi (Scaltec)
Buzdolabı (Indesit)
Vortex (NM- 110)

Su Banyosu (Memmert)
Distile su cihazı (Nüve NS 108)
Mikropipet Seti (Gilson- Pipetman- P 10-P100-F1000)
Sekans dikey jel tankı (Life Technologies, Gibco BRL Sequencing System,
Model S2, Gaithersburg, MD 20884-9980 USA)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tris-Hidroklorid (Sigma T- 5941, Lot 31 K5466)
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), sodium salt (Lachema- 302430300, cat
nr 30354)
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma L-4509 USA)
Tris-baz (Sigma-Aldrich-T8937)
Borik asit (Merck K29935665 204)
Brom fenol mavisi (SCP Science B7722)
Sükroz (Merck 1.07651)
Etanol absolut (Riedel- deHaän/ 32221 Germany)
Fenol kristalleri (Sigma P-1039, USA)
Kloroform (Merck K28735331 107)
Agaroz (Sigma- A-9539 lot 013K0008)
Taq DNA Polimeraz (Promega M1665)
10X PCR Buffer (Mg Free) (Promega M190G)
5 mM MgCl₂ (Promega A351H)
10 mM dNTP Mix (Sigma Deoxynucleotide set dNTP-100)
Proteinaz K (Sigma P 2308)
100 baz çiftlik (bç) Marker (100 bp DNA Step Ladder) (Promega G6951)
Etidyum-Bromid (Et-Br) (Sigma E8751-1G USA)
Sigma Cote® (Sigma Cat.#SL-2)
Akrilamid-Bis (Merck L54056638 Germany)
Amonyun persülfat (APS) (Sigma A3678-100G)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Fluka 87689 Switzerland)

Üre (Merck K35483387 Germany)
Glasiyal Asetik Asit (Riedel- deHaän/27225 Germany)
AgNO₃ (Merck K22699210 616 Germany)
Na₂CO₃ (Merck A766492 632 Germany)
Formaldehit (Riedel- deHaän/15512 Germany)
Sekanslama elektroforez tankı camları (Whatman Biometra® glass plates)
Promega Silver Sequence DNA Sequencing System (Q4130)
Dizi analizi reaktifleri (Q4131)
Sequencing Grade *Taq* DNA polymerase (M203D)
DNA Sequencing 5X Buffer (Q407A)
Silver Sequence d/dd G Deaza (Q417A)
Silver Sequence d/dd A Deaza (Q419A)
Silver Sequence d/dd T Deaza (Q420A)
Silver Sequence d/dd C Deaza (Q418A)
DNA Sequencing Stop Solution (Q408A)
Boyama solüsyonları (Q4132)
Gümüş Nitrat (Silver Nitrate Q4133)
Q4134
Band Silane Solüsyonu (Q421A)
%37'lik Formaldehit (Q427A)
Sodyum tiyosülfat 10mg/ml (Q428A)
Sodyum karbonat (Q440A)
Distile Su
DNase, RNase Free Su
Primerler (Iontek)

3.2.3. Kullanılan Çözeltiler

Çalışmada kullanılan çözeltiler Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan çözeltiler, içerik ve miktar bilgisi.

Çözeltiler	İçerik	Miktar
1. Parçalayıcı Tampon (Lizis Tamponu) (100 mL), pH 8.0	SDS	0.67 gr
	Tris-HCl (pH 8)	0.209 gr
	EDTA	0.249
2. 10X TBE (500 mL), pH 8.8	Tris Base	60.55 gr
	Borik Asit	30.91 gr
	EDTA	2.63 gr
3. 1X TBE (100 mL)	10X TBE	10 mL
	Distile Su	90 mL
4. 1:1 Fenol-Kloroform (100 mL)	Fenol	50 mL
	Kloroform	50 mL
5. % 1’lik Agaroz Jel Solüsyonu	1X TBE	50 mL
	Agaroz	0.5 gr
	Et-Br	3 µL
6. Proteinaz K (100 mg/ml)	Proteinaz K	100 mg
	Steril Distile su	1 mL
7. Yükleme Tamponu (20 mL)	Sükroz	4 gr
	Brom fenol mavisi	0.05 gr
8. % 70’lik Etil Alkol (100 mL)	Etil Alkol	70 mL
	Distile Su	30 mL

Çizelge 3.1. Kullanılan çözeltiler, içerik ve miktar bilgisi (Devam)

Çözeltiler	İçerik	Miktar
9. Kısa Cam Bağlama Solüsyonu	Etil Alkol (% 95)	1 mL
	Asetik Asit (% 0.5)	5 µL
	Bind Silane	3 µL
10. Tespit-Stop Solüsyonu (1000 mL) (% 10'luk Asetik asit)	Asetik Asit	100 mL
	Bidistile Su	900 mL
11. Boyama Solüsyonu	Gümüş Nitrat (AgNO ₃)	1 gr
	Formaldehit (% 37)	1.5 mL
	Bidistile su	1000 mL
12. Banyo Solüsyonu	Sodyum Karbonat	45 gr
	Formaldehit (% 37)	2.25 mL
	Sodyum tiyosülfat (10 mg/ml)	300 µL

3.3. Yöntemler

3.3.1. Moleküler Analiz

3.3.1.1. HBV DNA Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmaya dahil edilen 61 KHB'li hasta serum örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapıldı. Çalışılacak olan serum örneklerinden DNA ekstraksiyonu için aşağıdaki protokol uygulandı.

• Serum Örneklerinden DNA'nın Ekstraksiyonu

1,5 ml'lik steril ependorf tüpüne, 100 µl serum örneği kondu. Serum örneği üzerine 300 µl lysis tamponu (10mM Tris/HCl pH 8.0; 5mM EDTA, % 0.5 SDS) + 1 µl Proteinaz-K (100 mg/ml) ilave edip vortekslendi. Bu karışım, 56°C'lik su banyosunda bir gece boyunca inkübe edildi. Bu karışım üzerine 800 µl fenol-kloroform ilave edildi. İyice alt üst edip +4°C'de 30 dakika bekletildi. Bu süre içinde tüpler zaman zaman alt üst edilerek karıştırıldı. Tüpler 12.000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı (üst kısım) alınarak yeni steril bir tüpe aktarıldı. Yeni tüpe alınan süpernatant üzerine, süpernatantın 2 katı hacimde olacak şekilde kloroform ilave edildi. Alt üst edilerek +4°C'de 30 dakika bekletildi. Bu süre içinde tüpler zaman zaman alt üst edilerek karıştırıldı. Tüpler 12.000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alınıp yeni steril bir tüpe aktarıldı. Süpernatant üzerine 1 ml soğuk etanol (% 95'lik) ilave edildi. Yavaşça alt üst edip -20°C'de gece boyunca bekletildi. Ertesi gün tüpler 12.000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Tüpün dibindeki nükleik asit pelleti kısmına zarar vermeden üst kısmı dikkatlice uzaklaştırıldı. Tüpler temiz kağıt havlular üzerine ters olarak yerleştirildi ve 10 dakika bekletilerek kurutuldu. Pellet, 20 µl steril distile su ile yavaş hareketlerle pipetaj yapılarak çözdürüldü. Hazırlanan ekstrakt çalışılincaya kadar -20°C'de saklandı.

3.3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

HBV X gen bölgesi spesifik primerler kullanılarak PZR tekniği ile çoğaltıldı. Mutasyon analizi yapılacak hedef bölge ve bu bölge ile ilgili primer dizileri Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Hedef bölge ile ilgili primer dizileri.

X Gen Bölgesi	Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Ürün Uzunluğu (bp)
1. tur PZR	HBV X1sense external (Nt. 1177-1190)	5'- TGC CAA GTG TTT GCT GAC GC – 3'	802
	HBV X2 (Nt. 1961-1979)	5'- AAG GAA AGA AGT CAG AAG G – 3'	
2. tur PZR	HBX IS (nt.1400-1423)	5'- CTG GAT CCT ACG CGG GAC GTC CTT - 3'	579
	HBV X2 (Nt. 1961-1979)	5'- AAG GAA AGA AGT CAG AAG G – 3'	

PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. HBV’nin X gen amplifikasyonu 2 tur PZR ile gerçekleştirildi. Bu gen bölgesi için standart PZR reaksiyonu son hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile su, 10X PZR tamponu (Promega), MgCl₂ (Promega), dNTP (Fermentans), primerler, *Taq* DNA polimeraz (Promega) ve ekstrakte edilen HBV DNA’sı konularak hazırlandı. Her bir örnek için 1. ve 2. tur reaksiyon karışımları Çizelge 3.3’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu 1.ve 2. tur reaksiyon karışımları.

PZR malzemeleri	Miktar (µl)	
	1.Tur	2.Tur
Distile su	37.75	39.75
MgCl ₂ (25 mM)	4	4
10 X PZR tamponu	5	5
dNTP mix (10 mM)	1	1
Primer (X1) (100 pmol/µl)	0.5	
Primer (X2) (100 pmol/µl)	0.5	0.5
Primer (X-IS) (100 pmol/µl)		0.5
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.25	0.25
HBV DNA'sı	3	1
Toplam Hacim	50	50

Oluşturulan PZR karışımı vorteksenerek karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait ve üzerinde numaraları yazılı steril 0,2 µl'lik PZR reaksiyon tüplerine paylaştırıldı. Üzerlerine DNA örnekleri konulduktan sonra termal döngü cihazına yerleştirildi. Polimeraz gen bölgeleri için ısı döngü cihazında PZR koşulları Çizelge 3.4'teki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.4. Isı döngü cihazında kullanılan PZR koşulları (1. ve 2. tur).

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	5 dakika	1
Denatürasyon	94	30 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	55	30 saniye	30
Zincir Uzaması (Extension)	72	45 saniye	
Bekleme	4	∞	1

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örnekler elektroforez işlemi uygulanana kadar +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.3.1.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

PZR ile hedef bölge amplifikasyonla çoğaltıldıktan sonra PZR ürünleri, % 1,5’luk agaroz jeline yüklenerek ürünlerin elektroforezi yapıldı. Hedef bant oluşumu gözlenen örneklerin bir sefer daha amplifikasyonu yapıldı. Hazırlanan jelde yürütülen DNA’ların uzunlukları, büyüklükleri belli DNA fragmentlerini içeren moleküler ağırlık standardı ile kıyaslanarak saptandı. Elektroforez tamponu olarak Tris-Borik Asit-Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) [TBE] kullanıldı. 10X konsantre stok olarak hazırlanan bu tampon kullanılmadan önce 1X olacak şekilde distile su ile sulandırıldı. Bu reaksiyonların her bir seti için negatif (steril distile su) kontroller kullanıldı.

Agaroz Jelinin Hazırlanması

Bir balon jofede 0,45 g agaroz, 30 ml 1X TBE solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Biraz soğuduktan sonra Et-Br'den 3 µl eklendi. Daha sonra jel, tarakların yerleştirildiği jel tepsisine yavaşça döküldü. Katılaşana kadar (25-30 dakika) oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PZR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirildi. Daha önceden PZR işlemi yapılmış olan buzdolabındaki örneklerden 5'er µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl 1X TBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (% 20 sükröz veya gliserol, % 0,25 brom fenol mavisini) ile iyice karıştırıldı. Daha sonra da elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Jelin ilk kuyusuna molekül uzunluğu hesaplamalarının yapılması amacıyla 100 bp'lik DNA Step Ladder (Promega G6951) konuldu (0,5 µl step ladder + 5 µl 1X TBE). Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağı çalıştırıldı. Kullanılan mini tank için 30 mA akım verilerek elektroforez başlatıldı. Yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin göçü takip edilerek jelin 2/3'lük kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu (30-40 dk). Jel, tanktan çıkarılarak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-transluminatöründe incelendi ve jel görüntüleme sisteminde fotoğrafları çekilerek kayıtları yapıldı.

3.3.1.4. Hedeflenen PZR ürününün Tespiti ve analizi

Agaroz jel elektroforez işleminden sonra X gen bölgesine spesifik primerlerin kullanıldığı reaksiyon tüplerinin elektroforezinde 579 bp hizasında gözlenen bantlar hedef X gen bölgesi olarak değerlendirilmiştir.

3.3.1.5. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

PZR ile çoğaltılmış ürünlerin dizi reaksiyonundan önce saflaştırma işleminin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla çalışmamızda amonyum-asetat'ın kullanıldığı manuel saflaştırma yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde; 100 µl PZR ürünü, eşit hacimde (100 µl) 4 M amonyum asetat ile karıştırıldı. Sonra bu hacime eşit miktarda (200 µl) 2-propanol (iso-propilalkol) ilave edilerek karıştırılarak oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 12.000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp 500 µl % 70'lik etil alkol ilave edildi. 12.000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve DNA kurutuldu. 10 µl nükleazsız distile su, Tris-Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) [TE] tamponu veya 1X sekanslama tamponu ile süspanse edildi. Daha sonra ürünler % 1,5'luk agaroz jeline yüklenerek elektroforezi yapıldı. Oluşan bantların yoğunluğuna göre saflaştırılan DNA, sekans reaksiyonunda kullanılmak üzere nükleazsız distile su ile sulandırıldı.

3.3.2. Sekans Reaksiyonu

Sekanslama reaksiyonu kullanılan kitin üretici firmasının önerdiği şekilde gerçekleştirildi (105). Her bir sekans reaksiyonu için 4 adet 0,2 ml'lik PZR reaksiyon tüpü, sırasıyla Adenin (A), Sitozin (C), Guanin (G) ve Timin (T) olarak işaretlenerek her birine 2 µl deoksi/dideoksinükleotid (d/ddNTP) karışımı konuldu. Tüplerin kapakları kapatılarak +4°C'de sekans reaksiyon karışımı hazırlanıncaya kadar bekletildi. Reaksiyonda kullanılacak DNA'lar denatürasyon amacı ile 80°C'de 2 dakika bekletildikten sonra buz üzerinde bekletildi. Çizelge 3.5'de dizi analizi yapılacak olan her bir suş için gereken sekans reaksiyonunun hazırlanışı verilmiştir (105).

Çizelge 3.5. Sekans reaksiyon karışımı.

Kullanılan Reaktif	Miktar (µl)
Hedef DNA	3
DNA Sequencing 5X Buffer	5
Primer (sense internal) (3.5 pmol/µl)	3
Nükleaz-free distile su	4.5
Sequencing Grade Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	1

Daha sonra hazırlanan sekans reaksiyonu karışımından 4'er µl, +4°C'de bekleyen A, C, G, T d/ddNTP üzerine ilave edildi. Mikrosantrifüjde dikkatlice santrifüj edildi. Döngü reaksiyonu başlatılarak reaksiyon için hazırlanan PZR tüpleri ısı döngü cihazına, sıcaklık 95°C'ye ulaştığı zaman yerleştirildi. Dizi analizinde kullanılan reaksiyon programı Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Sekans analizinde kullanılan reaksiyon şartları.

Primer 24 bazdan az ve GC içeriği %50'den az ise		
Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
95	2 dakika	1
95 (Denatürasyon)	30 saniye	
42 (Annealing)	30 saniye	45-60
70 (Extension)	1 dakika	
4	∞	∞

Çizelge 3.6. Sekans analizinde kullanılan reaksiyon şartları (Devam).

Primer 24 bazdan fazla ve GC içeriği %50'den fazla ise		
Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
95 (Denatürasyon)	30 saniye	
70 (Annealing/Extension)	30 saniye	60
4	∞	∞

Isı döngü cihazındaki program tamamlandıktan sonra reaksiyonun sonlandırılması için örnekler cihaz üzerinde iken mikrosantrifüj tüplerinin kapakları açılarak 3'er µl DNA sekans durdurma solüsyonu her bir örneğin üzerine eklendi. Örnekler daha sonra +4°C'de elektroforez yapılıncaya kadar saklandı.

3.3.2.1. Dizi Analizinde Kullanılacak Olan Sekans Camlarının Hazırlanması

Sekans reaksiyonunda kullanılan camların biri diğerinden daha kısadır. Camlar sıcak su ve % 1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) ile yıkandı. Camlar durulanırken ise deterjan kalıntılarını çıkarmak için deiyonize su (ultra-pure veya bidistile su) kullanıldı. Camlar toz bırakmayan kağıt havlular kullanılarak kurulandı ve temiz kurutma kağıtları üzerinde alındı (105).

• Kısa Camın Hazırlanması

Jel hazırlanırken aynı zamanda temizlenmiş olan kısa cam bağlayıcı solüsyon ile muamele edildi. 1 ml % 95'lik etil alkol, 5 µl % 0,5'lik asetik asit ve 3 µl Bind Silane (Promega) temiz bir ependorf tüpüne konularak bağlayıcı solüsyon taze olarak hazırlandı. Hazırlanan solüsyon, toz bırakmayan kağıt havluya emdirilerek kısa camın

bütün yüzeyi solüsyon ile kaplandı. 4-5 dakika sonra yaklaşık 2 ml % 95'lik etil alkol, toz bırakmayan kağıt havlu ile yatay ve dikey yönde, cama fazla bastırmadan uygulandı. Bu işlem eğer çok fazla bastırılarak uygulanırsa bağlayıcı solüsyon yerinden kalkmakta ve jeli iyi tutamamaktadır. Bu yıkama işlemi bağlayıcı solüsyonun fazlasını almak için 2 kez tekrarlandı. Bu işlemler sırasında uzun camın bağlayıcı solüsyon ile bulaşmasının önlenmesi önemlidir. Aksi takdirde jel iki cama da yapışmaktadır (105).

• Uzun Camın Hazırlanması

Uzun cam Sigma Cote solüsyonu ile muamele edildi. Eğer su cam yüzeyinde damla halinde kalıyorsa her seferinde camı bu solüsyon ile muamele etmeye gerek yoktur. Bağlama solüsyonu ile uzun camın çapraz kontaminasyonunu engellemek için öncelikle eldivenler değiştirildi. Eğer ki uzun cam Bind Silane ile kontamine olursa % 10'luk NaOH'de 30-60 dakika tutulması gerekmektedir. Sigma Cote solüsyonu toz bırakmayan kağıt havlu yardımı ile cama sürüldü. 5-10 dakika sonra toz bırakmayan kağıt havluyla fazlası silindi (105).

3.3.2.2. Jel Solüsyonunun Hazırlanması ve Cam Kasete Dökülmesi

Jel 7 M üre içeren, % 4-6'luk poliakrilamid jel (19:1 akrilamid-bisakrilamid) TBE tamponu ile hazırlandı. 34,5 gr üre tartılarak cam behere aktarıldı. Üzerine 50 ml bidistile su ilave edilerek ısıtıcıda kaynayıncaya kadar yavaş yavaş karıştırıldı. Üre kristallerinin tamamen eridiği gözlemlendiğinde beher ısıtıcıdan alınarak bir mezüre aktarıldı. Üzerine 12,5 ml akrilamid solüsyonu (19:1), 7,5 ml 10XTBE tamponu ve 250 µl % 10'luk amonyun persülfat (APS) ilave edildi. Son hacim 80 ml'ye bidistile su ile tamamlanarak jel temiz bir behere aktarıldı. Beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak jelin içerisine toz ve yabancı partiküllerin girmesi engellendi (105).

Jel hazırlandıktan sonra jelin döküleceği camların hazırlanmasına geçildi. Kısa cam Bind Silane ile, uzun cam ise Sigma Cote ile muamele edildi. Kısa camın muamele edilen yüzeyinin iki kenarına 0,4 mm kalınlığındaki boşluk plastikleri konularak uzun

camın muamele edilen yüzeyi boşluk plastiklerinin üzerine gelecek şekilde yerleştirildi. Her iki cam dikkatli bir şekilde cam sıkıştırıcı plastik taşıyıcıya konuldu. Taşıyıcının alt kısmındaki doldurma deliği açıldı. Hazırlanmış olan jele 50 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) eklenerek jel, 50 ml'lik bir enjektör yardımı ile camların üst kısmından dikkatlice iki cam arasındaki boşluğa dökülmeye başlandı. Bu sırada jelde hava baloncuklarının oluşmamasına dikkat edildi. Jel, doldurma deliğinden çıkmaya başladığı an delik kapatılarak jelin üst kısımdan dökülmesi durduruldu. Camların üst kısmındaki jel içerisine, yükleme sırasında kullanılan tarakların ters yüzleri ile, 2-3 mm kadar bir oluk oluşturuldu. Tarakların yerleştirildiği bu kısmının daha iyi sıkıştırılması için taşıyıcının kenarları, camların ortası ve iki kenarı bağlama klipsleri ile tutturuldu. Daha sonra jelin fazlası taraklar üzerine dökülerek jelin yaklaşık 2 saat boyunca polimerize olması beklendi (105).

Süre sonunda bağlama klipsleri açılarak cam kaset, sıkıştırıcı plastik taşıyıcıdan çıkartıldı. Camların üst kısmındaki taraklar çıkartılarak polimerize olmayan jel ve üre kristallerinin temizlenmesi için camlar bidistile su ile yıkandı. Yıkamadan sonra camlar toz bırakmayan kağıt havlu ile silinerek elektroforez aşamasına geçildi.

3.3.2.3. Elektroforez

Cam kaset dizileme elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın, önce üst tampon rezervuarına 500 ml 1XTBE tamponu ilave edildi. Alt kısma veya cam kaset ile alüminyum plaka arasındaki bölüme beş dakika boyunca bir sızıntı gözlenmediyse alt kısma yine 500 ml aynı tampondan ilave edildi. Bantların iyi açılması için cam kaset dizileme elektroforez tankına yerleştirildikten sonra, tek iplikli DNA zincirleri arasında H bağı oluşumunun engellenmesi için jel 75 Watt'lık elektrik akımı ile sıcaklığı 50°C'ye ulaşmıncaya kadar, (yaklaşık 2 saat) ısıtıldı. Jel ısıtıldıktan sonra sivri dişli taraklar jelin üst kısmına hafifçe batırıldı. Yükleme başlamadan önce sekans reaksiyonu sonucu oluşan ürünler 70°C'de 5 dakika su banyosunda ısıtıldı ve hemen buza batırılarak, ürünlerin 3 µl'si hızlı bir şekilde jele yüklenerek 75 Watt'lık elektrik akımı ile elektroforeze devam edildi. Elektroforez bittikten sonra elektroforez tankından

çıkarılan cam kaset birbirinden ayrıldı. Küçük cama yapışık halde kalan jele gümüş boyama protokolü uygulandı (105).

3.3.2.4. Sekans Jelinin Gümüş Boyanması

Bu protokolde kullanılan solüsyonlar ve malzemeler aşağıda verilmiştir (105).

Tespit-Durdurma (Fix-stop) solüsyonu

Boyama solüsyonu

Banyo (Developing) solüsyonu

Yatay karıştırıcı

Kısa camdan daha geniş olan plastik tepsi

Boyama prosedürü süresince inkübasyonlar plastik tepsi içerisinde gerçekleşmektedir.

Boyama Solüsyonlarının Hazırlanması

Tespit-Durdurma Solüsyonu: % 10'luk asetik asittir. Bu solüsyon her boyama protokolü için yeniden hazırlandı (105).

Asetik asit 200 ml

Bidistile su 1800 ml

Boyama Solüsyonu (106):

Gümüş Nitrat (AgNO_3) 1 gr

Formaldehit (% 37) 1,5 ml

Bidistile su 1000 ml

Banyo Solüsyonu (106):

Sodyum karbonat (Na_2CO_3) 45 gr

Bidistile su 1500 ml

10°C'ye kadar soğutulur

Kullanmadan hemen önce develop solüsyonuna eklenenler:

Formaldehit (%37) 2,25 ml

Sodyum tiyosülfat (10 mg/ml) 300 µl

Boyama Protokolü: Boyama protokolü gümüş boyama tabanlı cycle-sequencing kiti üretici firmasının önerdiği şekilde gerçekleştirildi (105).

Jelin tespiti: Plastik tepsideki jel, tespit-durdurma solüsyonu ile kaplandı ve marker boya (brom-fenol mavisi) izleri kayboluncaya kadar yaklaşık 15 dakika boyunca çalkalanarak yıkandı. Bu işlem, üre kalıntılarının iyice çıkması için bir kez daha tekrarlandı. Jel çalkalamadan bir gece boyunca tespit-durdurma solüsyonunda muhafaza edilebilir.

Jelin yıkanması: Jel beşer dakikadan beş kez bidistile su ile çalkalanarak yıkandı. Bu aşamada asitin jelden tamamen uzaklaşması sağlandı.

Jelin boyanması: İki saat boyama solüsyonu ile çalkalanarak muamele edildi

Jelin yıkanması: Jel tepsi içerisine yerleştirilerek bidistile su ile 5-10 saniye, iki kez hızlı bir şekilde yıkandı.

Jelin banyosu (develop): Jel, soğutulmuş ve kullanmadan hemen önce 2,25 ml % 37'lik formaldehit ve 300 ml sodyum tiyosülfat eklenmiş banyo solüsyonunun 750 ml'sinin bulunduğu tepsiye yerleştirildi. Hedef DNA'lar (template) görününceye kadar ya da develop başlayıncaya kadar jelin bulunduğu tepsi çalkalandı. Jel daha sonra geriye

kalan 750 ml soğuk banyo solüsyonun aktarıldığı tepsiye alındı ve çalkalanmaya devam edildi. 2-3 dakika içinde bantların hemen hepsi görünür hale gelmeye başladı.

Banyonun durdurulması: Uzun banyo aşaması koyu renkte arka planın (kararma) oluşması ile sonuçlanacağından jelin tamamen boyanmasının engellenmesi için banyonun durdurulması işlemine geçildi. Görüntü gelişim reaksiyonunun sonlandırılması için ve jelin tespit edilmesi için 1000 ml tespit-durdurma solüsyonu direkt olarak banyo solüsyonu içindeki jele döküldü. Çalkalanarak 2-3 dakika süresince inkübe edildi.

Jelin yıkanması: Jel ikişer dakikadan iki kez bidistile su ile muamele edildi

Jelin kurutulması: Jel, oda ısısında tutularak kurumaya bırakıldı (105).

3.3.2.5. Görüntüleme

Jelde oluşan bantlar alttan beyaz flouresan ışık veren negatoskop üzerinde incelendi ve tarayıcıdan tarandı ve fotoğrafları çekilerek saklandı.

3.3.2.6. Değerlendirme

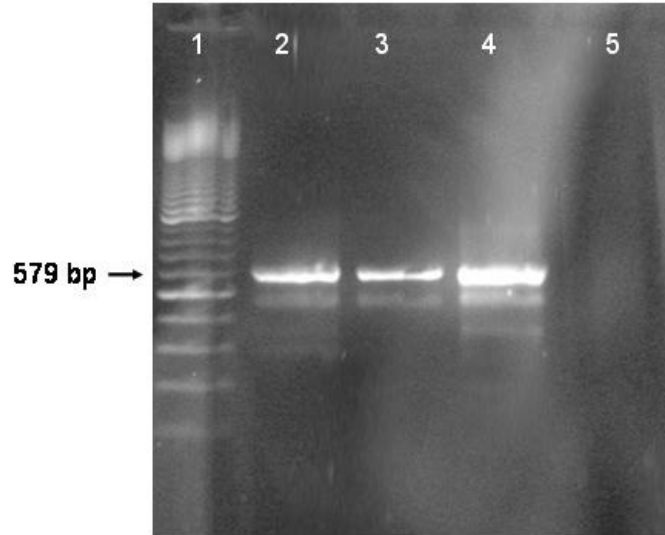
Değerlendirme aşamasında, Gen bankası veri tabanından elde edilen AY721609 (106) kayıt kabul numaralı dizi ile jelde oluşan diziler, 5' ucundan 3' ucuna doğru karşılaştırılarak okundu. Belirlenen nükleotid değişiklikleri kayıt edildi

4. BULGULAR

4.1. Moleküler Analiz Sonuçları

4.1.1. PZR Aşaması

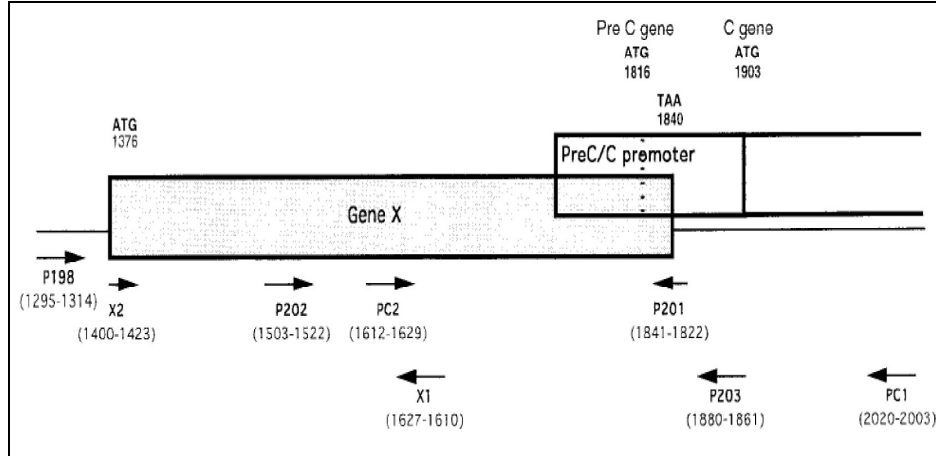
HBV X geninin HSK ile olası ilişki gösteren mutasyonların sıklıkla bildirildiği nükleotid 1400-1979 arasında kalan 579 bç'lik fragmet nested PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünleri, Et-Br ile boyanmış % 1,5'luk agaroz jelinde uygulanan elektroforez ile analiz edilmiştir. Jelin UV-transillüminatöründe incelenmesi ve 579 bç'lik hedefin elde edildiği örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.1). Daha sonra bu ürünler saflaştırılarak DNA dizi analizinde kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Seminested PZR yöntemi ile elde edilen PCR ürünlerinin % 1,5'lik agaroz jel elektroforezi ile gösterilmeleri. (Kolon 1: Moleküler ağırlık standardı [GeneRuler 100 bç DNA ladder, Fermentas], Kolon 2, 3, 4 HBV'li hastaların örneklerinde amplifiye edilen 579 bç'lik X gen bölgesi PZR ürünü, kolon 5; negatif amplifikasyon ürünü)

4.1.2. Gümüş Boyama DNA Dizi Analizi Sonuçları

Primer spesifik PZR aşamasından sonra, elde edilen PZR ürünlerinin dizi analizi reaksiyonunu etkilememesi için, PZR reaksiyon bileşenlerinden arındırmak amacı ile, amonyum asetat yöntemi ile saflaştırıldı ve % 1,5'luk agaroz jelinde yeniden elektroforeze tabi tutularak eldeki PZR ürünlerinin uygun miktar ve kalitede olup olmadıkları görsel olarak değerlendirildi. Uygun olan ürünlere dizi analizi reaksiyonu uygulandı ve daha önce belirtildiği şekilde denatürasyon şartlarında 7M üreli poliakrilamid sekanslama jelinde vertikal elektroforeze tabi tutuldu. Sekanslama jelinde elektroforezleri yapılan örnekler, elektroforez sonrası gümüş boyama metodu ile boyanarak negatoskopta, floresan ışık üzerinde incelendi ve fotoğrafları çekildi. Gen Bankasından temin edilen AY721609 (106) nolu referans dizi ile karşılaştırarak değerlendirilmesi yapıldı. Referans dizi ile yapılan karşılaştırma Vector NTI 10.0 bilgisayar programı ile yapıldı (Çizelge 4.1). Çalışmamızda kullandığımız primerler nt.1400-1979 arasında kalan bölgeyi dizilemektedir. Bu bölge içerisinde HBx geninin önemli bir kısmı, preC/C promoter bölgelerinin hemen hemen tamamı vardır. Ayrıca nt.1700-1870 arasında kalan bölgede HBx geni ve preC/C promoter bölgesi üst üste çakışmaktadır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Dizi analizi yapılan HBx geni bölgesi primer bağlanma pozisyonları ve amplifikasyonu yapılan bölge (107 nolu kaynaktan değiştirilmiştir).

Çizelge 4.1. AY721609 nolu referans dizi ve bizim elde ettiğimiz dizilerin karşılaştırması amacıyla kullandığımız hedef bölge (106 nolu kaynaktan değiştirilmiştir).

123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
0 AACTCCACAACCTTCCACCAAACTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCCTGTATTTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAAC
90 CCTGTCCGACTACTGTCTCTCCCATATCGTCAATCTTCTCGAGGATTGGGGACCCCTGCCTGAACATGGAGAACATCACATCAGGATTC
180 CTAGGACCCCTGCTGTTACAGCGGGGTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCT
270 CTCAATTTTCTAGGGGAACTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCAACCTCCAATCACTCACCACCTCCTGTCCTCCAAC
360 TGACCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGCGCTTTTATCATCTTCTCTTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGCTTCTCTG
450 GACTATCAAGGTATGTTGCCGTTTGTCTCTAATCCAGGATCTTCAACTACCAGCACGGGACCATGCAGAACCTGCACGACTCCTGCT
540 CAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTGCTGTACCAAACTTCGGACGGAATTCACCTGTATTTCCATCCCATCATCTGGGCTTTC
630 GGAAAATTCCTATGGGAGTGGGCTCAGCCGTTTTCTCCTGGCTCAGTTACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTCCCCC
720 ACTGTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTTGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTTACCCTGTTACCAAT
810 TTCTTTGTCTTTGGGTATACATTTAAACCCTAACAAAAAAGATGGGGTACTCTTTACATTTTCATGGGCTATGTCATTGGATGTT
900 ATGGGTCAATGCCACAAGATCACATACAAAAAATCAAAGATGTTTTCGAAAACCTCCTGTTAACAGACCTATTGATGGAAAGTCT
990 GTCAACGTATTTCTGCTTTTGGGTTTTGCTGCCCTTTTACACAATGCGGTTATCCTGCTTAAATGCCCTGTATGCATGTATTCAGT
1080 CGAAGCAGGCTTTTACTTTCTCGCCAACCTACAAGGCTTTCTGTGTAACAATAACCTGAACCTTTACCCCGTTGCCCGGCAACGGCCAG
1170 GTCTGTGTTCCAAAGTGTTCGCTGACGCAACCCCACTGGCTGGGGCTTGGTATGGGCCATCAGGCGCATGCGTGGAACTTTCTGGCTCCTC
1260 TGCCGATCCATACTGCGGAACCTTAGCCGCTGTTTTGCTCGCAGCAGGTCTGGAGCAAACTTCTCGGGACGGATAACTCTGTTGTTCC
1350 TCTCCCGCAAATACATCGTATCCATGGCTGTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTGTGTTACGTCCCGTCGG
1440 CGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTTCTCGGGTCTGCTGGGACTTCTCGTCCCTTCTCGCTGCGGTTTCGACCGACCACGGGGCGCA
1530 CCTCTCTTTACGCGGACTCCCGTCTGTGCCTTCTCATTCGCCGACCCTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTCGCATGGAAACCAC
1620 CGTGAACGCCACCAATCTTGCCCAAGGCTTTACATAAGAGGACTCTGGACTCTCTGTAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTT
1710 CAAAGACTGTTTGTCAAAGACTGGGAGGAGTGGGGGAGGAGATTAGATTAAGGTGTTGTTATAGGAGGCTGAGGCATAAATGGT
1800 CTGCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTTTTGTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGG
1890 TGGCTTTGGGGCATGGACATGATCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACTGTGGAGTACTCTCGTTTTTGGCTTCTGCTTCTTCCCTTCA
1980 GTACGTGATCTTCTAGATACTGCCTCAGCTCTGTATCGGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCTTCTGCTGCTCAGG
2070 CAAGCAATCTTTGCTGGGGGAACTAATGACTCTAGCCACCTGGGTGGGTGGTAAATTTGGAAGATCCAATATCCAGGGACCTAGTAGTC
2160 AGTTATGTTAACACTAATATGGGCCATAAAGTTTCAGGCAACTATTGTGGTTTTCACATTTCTGTCTCACTTTTGGAAAGAAACGGTCATA
2250 GAGTATTTGGTGTCTTTTGGAGTGTGGATTCGCACTCCTCCAGCTTATAGACCACCAAAATGCCCTATCTTATCAACTTCCGGAGACT
2340 ACTGTTGTAGACGACGAGGACGCTCCCTAGAGAAGAATCCCTCGCCTCGCAGACGAAGTCTCAATCGCCGCTCGCAGAAGATCT
2430 CAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGTATTCCTTGGACTCATAAGGTGGAAACTTTACGGGGCTTATCTCTACTGTCTCCTGTCTTTAA
2520 CCCTCATGGAAAACCCCTCTTTTCCCTAATATACATTTACACCAAGACATTATCAAAAAATGTGAACAATTTGAGGCCCACTCACAGT
2610 CAATGAGAAAAGAAGACTGCAATGATTATGCCTGCTAGGTTCTATCCAAATGTACCAAAATATTTGCCATTGGATAAGGGTATTAACC
2700 TTATTACCAGAATCTAGTTAATCAGTACTTCCAAACCAGACATTATTTACACACTCTATGGAAGTGGGTATATTATATAAGAGAGA
2790 AACTACACATAGCCCTCATTTTGTGGTTCACCATATCTTGGGAACAAGAGCTACAGCATGGGGCAGAATCTTTCCACCAGCAATCCTC
2880 TGGGATCTTTCCCGACCACAGTTGGATCCAGCCTTCAGAGCAAACCCGAAATCCAGATTGGGACTTCAATCCCAACAAGGACACCT
2970 GGCCAGACGCCAACAGGTAGGAGCTGGAGCATTCGGGCTGGGATTACCCACCAGCAGGAGCCTTTTGGGGTGGAGCCCTCAGGCTC
3060 AGGCATACTACAAACCTTGCCAGCAAATCCGCTCCTGCCTTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCTCTGTCTCCACCTT
3150 TGAGAAACACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGG

Kırmızı bölge: HBV sense external (X1)
Mavi bölge: HBV X sense internal (IS)
Gri bölge: Elde edilen dizilerin karşılaştırması amacıyla kullanılan hedef bölge
Sarı bölge: HBV antisense (X2)

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde KHB enfeksiyonu tanısı ile tedavi görmekte olan hastalardan alınan serum örneklerinde virusun X geninin nt.1400-1979 arasında kalan 579 bç'lik kısmında HSK ile muhtemel ilişkili mutasyonlar araştırılmıştır. Çalışma kapsamında PZR ile çoğaltılan ürünler,

dizileme reaksiyonuna tabi tutularak jelde yürütüldü ve gümüş boyama ile boyanarak ilgili diziler, referans dizi ile (AY721609) karşılaştırıldı.

Çalışmamızda dizi analizi yapılan toplam 61 örneğin 1'inde (%1.63) 1653T, 10'unda (% 16,39) 1896A, 3'ünde (% 4,91) ise 1762T mutasyonları, 1'inde (% 1,63) ise 1762T-1764A dual mutasyonu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2 ve 4.3) (Şekil 4.3).

Çizelge 4.2. Çalışılan hasta grubu ve belirlenen mutasyonlar.

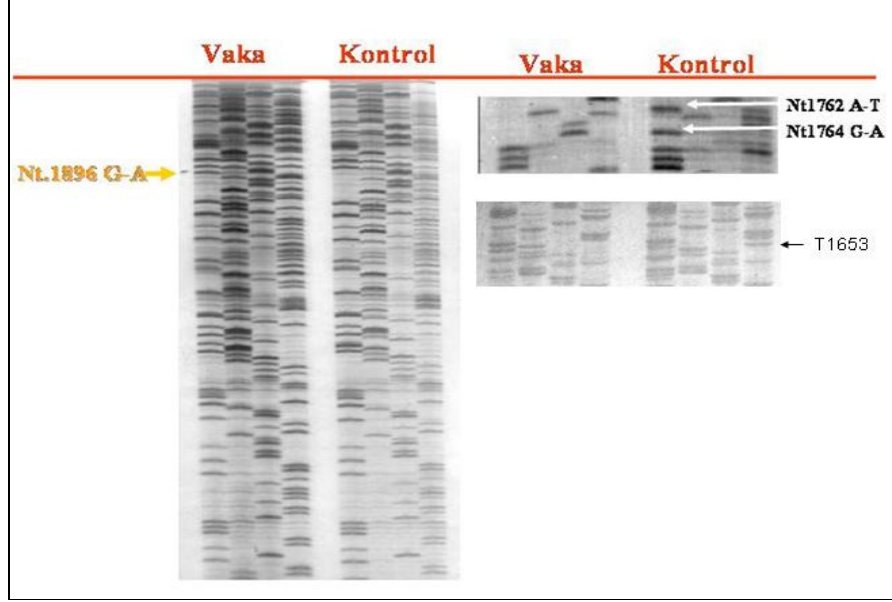
Hasta no	Çalışılan örnek türü	Hedef bölgede tespit edilen mutasyon türü
1	Serum	Mutasyon yok
2	Serum	Mutasyon yok
3	Serum	Mutasyon yok
4	Serum	Mutasyon yok
5	Serum	Mutasyon yok
6	Serum	Mutasyon yok
7	Serum	Mutasyon yok
8	Serum	Mutasyon yok
9	Serum	Mutasyon yok
10	Serum	Mutasyon yok
11	Serum	Mutasyon yok
12	Serum	Mutasyon yok
13	Serum	Mutasyon yok
14	Serum	Mutasyon yok
15	Serum	Mutasyon yok
16	Serum	Mutasyon yok
17	Serum	1653T
18	Serum	Mutasyon yok
19	Serum	Mutasyon yok
20	Serum	Mutasyon yok
21	Serum	Mutasyon yok
22	Serum	1896A
23	Serum	1896A
24	Serum	1896A
25	Serum	1896A
26	Serum	1896A
27	Serum	1896A
28	Serum	1896A
29	Serum	Mutasyon yok
30	Serum	Mutasyon yok
31	Serum	1896A
32	Serum	Mutasyon yok
33	Serum	1762T-1764A
34	Serum	1896A
35	Serum	1896A
36	Serum	Mutasyon yok

Çizelge 4.2. Çalışılan hasta grubu ve belirlenen mutasyonlar (devam).

Hasta no	Çalışılan örnek türü	Hedef bölgede tespit edilen mutasyon türü
37	Serum	Mutasyon yok
38	Serum	Mutasyon yok
39	Serum	Mutasyon yok
40	Serum	1762T
41	Serum	Mutasyon yok
42	Serum	Mutasyon yok
43	Serum	1762T
44	Serum	Mutasyon yok
45	Serum	1762T
46	Serum	Mutasyon yok
47	Serum	Mutasyon yok
48	Serum	Mutasyon yok
49	Serum	Mutasyon yok
50	Serum	Mutasyon yok
51	Serum	Mutasyon yok
52	Serum	Mutasyon yok
53	Serum	Mutasyon yok
54	Serum	Mutasyon yok
55	Serum	Mutasyon yok
56	Serum	Mutasyon yok
57	Serum	Mutasyon yok
58	Serum	Mutasyon yok
59	Serum	Mutasyon yok
60	Serum	Mutasyon yok
61	Serum	Mutasyon yok

Çizelge 4.3. Belirlenen mutasyon tipleri ve oranları

Tanı/Mutasyon tipleri	1653T n (%)	1896A n (%)	1762T n (%)	1762T-1764A n (%)
Kronik hepatit B (n=61)	1 (% 1,63)	10 (% 16,39)	3 (% 4,91)	1 (% 1,63)



Şekil 4.3. HBx gen Kor promoter / Prekor bölgesinde tespit edilen e-minus Nt.1893 G-A, Nt.1762 A-T ve Nt.1764 G-A mutasyonları ve Enh II bölgesinde tespit edilen Nt. 1653 C-T mutasyonu

5. TARTIŞMA

HBV infeksiyonu tüm dünyada hayatı tehdit etmekte ve birçok ülkede rutin aşı programları olmasına rağmen, yine de çok sayıda infekte insan bulunmaktadır. Tüm dünyada, tahmini olarak 350-400 milyon kişi HBV ile kronik olarak infektidir ve bu sayının 280 milyondan fazlası HBV infeksiyonunun birinci derece yaygın olduğu bölgelerde yaşamaktadır (108).

HBV infeksiyonu AHB'den başlayarak, KHB, siroz ve HSK ile sonuçlanabilen geniş spektrumda karaciğer hastalığı oluşturabilmektedir (8).

HBV infeksiyonunun yaygın olduğu bölgelerde infeksiyon, perinatal ya da çocukluğun erken zamanlarında kazanılmaktadır. İnfeksiyonu perinatal dönemde edinmiş kişilerin % 90'ından fazlasında, çocukluğun erken zamanlarında edinilmiş infeksiyonların % 20-40'ında, ergenlik çağında ve yetişkin dönemde edinilmiş infeksiyonların ise % 0-10'unda kronikleşme görülmektedir (108).

HBV infeksiyonunun patobiyojisi, viral parametreler (genotip, mutasyon içerikleri, HBV DNA düzeyi vb.) ve birçok anahtar hücrel proteinlerin ifadesini etkileyen çeşitli mekanizmalar ile yakından ilişkilidir (109).

Uluslararası kanser araştırmaları ajansı (IARC) insanlarda kanser oluşumu ile ilişkili olan çeşitli virus grupları belirlemiştir. Bunlar, Hepatit B virusu, Hepatit C virusu, İnsan Papilloma virusu (Tip 16 ve 18), İnsan T-hücre lenfotropik virus tip I, Epstein-Barr virusu ve İnsan immün yetmezlik viruslarıdır. Bu virus grupları, ilgili oldukları kanser çeşitlerinin oluşumunda ortalama % 15 dolaylarında etkili oldukları vurgulanmakla birlikte bu oranın ilgili mekanizmaların aydınlatılmasıyla daha da yüksek rakamlarla ifade edileceği tahmin edilmektedir (110).

Kanserin erken tanısını amaçlayan epigenetik araştırmaların en önemli amacı yeni biyomarkırların araştırılması temeline dayanmaktadır (111). Bu amaç doğrultusunda, HBV biyomarkırları üzerinde yapılan çeşitli moleküler ve epidemiyolojik araştırmalar ile HSK'nın erken tanısında önemli bilgiler edinilmeye başlanmıştır (112). Bu araştırmalar ile HBV ve HSK ilişkisi değerlendirilmiş ve bu ilişkiye dair dikkat çekici kanıtlar bulunmuştur. HSK'nın dünya genelinde coğrafik dağılımı yaygın olan bölgelerde HBV infeksiyonunun da yaygın olması HSK etiyojisi

açısından önemli bir saptamadır (76). Bu temelde, 350-400 milyon HBV taşıyıcısının % 20-25'inin karaciğer kanseri riski altında olduğu tahmin edilmektedir (112).

HSK tanısında kullanılan en yaygın biyomarkır 6 aylık serum a-fetoprotein (AFP) değer ölçümü ve bunun ultrason verileri ile desteklenmesidir (113). Ancak AFP değer ölçümlerinin HSK için kesin ve erken bir biyomarkır olarak kabul edilmesinde duyarlılık oranları (% 50-70) bakımından sorunlar bulunmaktadır (114). AFP konsantrasyonunun normal hamilelik, diğer karaciğer ilişkili hastalıklarda, HSK ilişkili olmayan tümör oluşumlarında da yükselmesi ve hastalığın ileri düzeyine ait bir marker olması AFP konsantrasyonunun HSK için yeterince spesifik ve erken bir tanı olmadığı sonucunu doğurmaktadır (112, 114). Bu açıdan, HSK riski altındaki 400 milyon HBV taşıyıcısı için HSK gelişiminin, klinik tanı öncesinde tanımlanması ve gelişiminin erken teşhis ile engellenmesi büyük önem kazanmaktadır.

HBV ve HSK ilişkisinin moleküler epidemiyoloji temelinde araştırıldığı çalışmalarda, en sık çalışılan bölgeler prekor/kor promotör (özellikle A1762/G1764, T1763), X ve PreS gen bölgeleridir.

HBV X gen bölgesinin ifade ettiği X proteinine ilk aşamada konak hücreleri veya diğer viruslarda homolog herhangi bir protein bulunamamıştır ve bu nedenle "X" adı verilmiştir. Ancak daha sonraki çalışmalarda HBV gibi *Hepadnaviridae* ailesinde yer alan sincaplara tropizm gösteren GSHV ve dağ sıçanlarına tropizm gösteren WHV'de X proteininin homolog yapısının bulunduğu ancak grubun diğer üyesi olan kuşlara tropizm gösteren DHBV'de bu yapının olmadığı görülmüştür (2).

HBV X gen bölgesi ve ifade ettiği X proteini konusunda ilgi çeken dört temel nokta olmuştur (2,39);

1. X ORF'nin memeli *Hepadnaviridae* üyelerinde evrimsel süreçte çok iyi muhafaza edilmiş olması, bu bölgenin virusun replikasyonunda güçlü avantaj sağladığı öngörülmektedir.
2. Bu replikasyon potansiyeli ile ilişkili şekilde, WHV'de viral infeksiyon için X proteininin zorunlu olduğu görülmüştür.
3. Birçok çalışmada X proteininin X-transgenik farelerde hücre transformasyonu oluşturduğu rapor edilmiştir.

4. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda HBV enfeksiyonunun prevalant olduğu bölgelerde HSK'nın da prevalant olması ikisi arasındaki ilişkiyi anlamlı kılmaktadır.

Bir HBV taşıyıcısında HSK gelişimi 20 yıldan fazla zaman almaktadır, bu süreçte HBV genomunun birçok bölgesinde mutasyon oluşabilmektedir. Özellikle X geni gibi bir regülatör (BCP, Kor promoter, Enhansır II) bölgede oluşan mutasyonların HSK oluşumundaki rolü hücrel onkojen ve inflamasyon sonucu oluşan genotoksitite gibi diğer karsinojenik ajanlarla birlikte değerlendirilmesi, HBV ilişkili HSK mekanizmasının açıklanmasında önemlidir (115).

Çeşitli moleküler çalışmalar temelinde hücrel temelli çeşitli promotör hiper/hipometilasyonları kaynaklı anormal gen regülasyonlarının keşfi; viral parametreler temelli olarak ise HBV gen bölgelerinin mutasyonel analizleri sonucunda prevalant formların belirlenmesi, daha erken ve kesin olan yeni biyomarkırların bulunması açısından ümit vericidir (109).

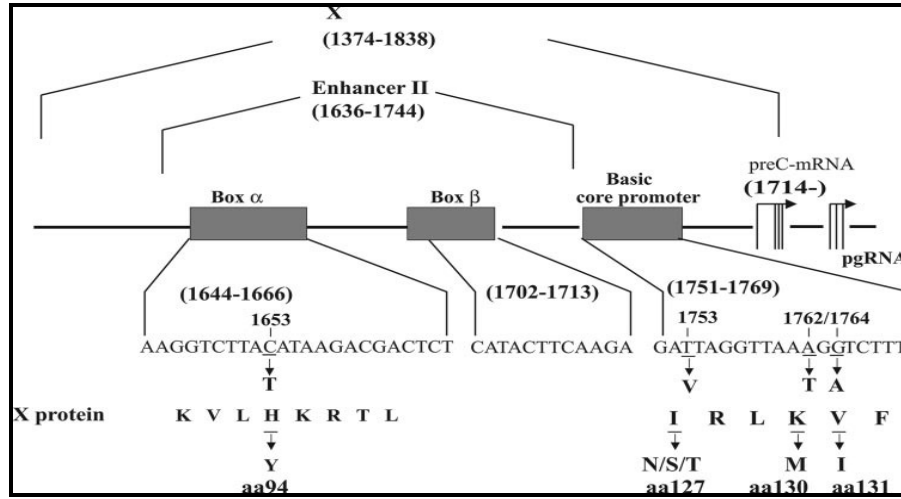
Çalışmamız kapsamında kullandığımız primerler nt.1400-1979 arasında kalan bölgeyi dizilemektedir. Bu bölge içerisinde HBx geninin önemli bir kısmı, preC/C promoter bölgelerinin hemen hemen tamamı vardır. Ayrıca nt.1700-1870 arasında kalan bölgede HBx geni ve preC/C promoter bölgesi üst üste çakışmaktadır (Şekil 4.2). Bu sebeple elde ettiğimiz dizi analizi verileri sadece HBx geni değil aynı zamanda yukarıda sözü edilen preC/C promoter bölgelerinde sıklıkla tespit edilen mutasyonları da içermektedir.

Elde ettiğimiz bulgulara bakıldığında; 61 örneğin 1'inde (% 1,63) 1653T, 10'nunda (% 16,39) 1896A, 3'ünde (% 4,91) 1762T mutasyonları, 1'inde (% 1,63) ise 1762T-1764A dual mutasyonu tespit edilmiştir.

Literatürde bildirilen çalışmalarda 1653T mutasyonu HSK'lı gruplarda non-HSK'lı gruplara göre önemli ölçüde yüksek oranda tespit edilmiş ve bu mutasyonun bir markır olarak kullanılabileceği önerilmiştir (116, 117).

Nükleotid C1653; X geninin enhansır II bölgesindeki alfa kutusunda yer almaktadır (Şekil 5.1). Bu nükleotidin 1653T şeklinde mutasyona uğraması ile enhansır II, core promoter ve alfa kutusu elementlerinin (nt.1646-1668) promoter aktivitelerinde 100 kattan fazla artışın ortaya çıkmasına sebep olabileceği belirtilmektedir. Bu mutasyon ile kor/bazal kor promoter ve ilişkili faktörlerin alfa kutusundaki bağlanma

bölgesinin mükemmel bir palindromik diziye (1648T CTTATATAAGA) dönüştüğü ve bu dönüşümün, alfa kutusunun bağlanma afinitesini ve enhansır II/kor promoter aktivitesini önemli ölçüde arttırabileceği böylece bazal kor promoter aktivitesi aracılığı ile HBeAg üretiminde önemli bir artışa sebep olabileceği ve sonuç olarak HSK'ya giden mekanizmaları önemli ölçüde hızlandırdığı bildirilmiştir (116, 118).



Şekil 5.1.HBx geninin Enhanser II, BCP ve PreC geninin üst üste çakışan bölge dizileri (117).

Bizim bulgularımız arasında % 1,63 oranında 1653T mutasyonunun tespit edilmesi bu sebeplerden dolayı önemlidir.

Ayrıca bulgularımız arasında 1762T mutasyonu da vardır. Literatürde bu mutasyonun hem HSK'lı hemde non-HSK'lı gruplarda sıklıkla tespit edildiği belirtilmektedir (116, 118, 119).

Çin'de yapılmış prospektif bir kort çalışmasında 1762T/1764A dual mutasyonu 15 HSK'lı vakanın 8'inde henüz HSK gelişmeden önce tespit edilmiştir. Çalışmayı yapan araştırmacılar 1762T/1764A dual mutasyonunu HSK için yüksek bir potansiyel risk olarak önermişlerdir (119).

Bizim bulgularımız arasında da 1 örnekte (% 1,63) 1762T/1764A dual mutasyonu tespit edilmiştir. Bu mutasyon her ne kadar prokor/kor promoter bölgesinde yer almışsa da X geninin üst üste çakışma alanında yer almaktadır.

Örneklerimizin 10'unda (% 16,39) 1896A mutasyonunun tespit edilmiş olması, çalıştığımız alanın dizi analizinde kullandığımız primerlerce sentez alanı içerisinde olmasından ve ayrıca bu hastaların büyük bir kısmının HBeAg negatif hasta olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Liu ve arkadaşlarının değerlendirmeye aldığı bir meta-analizde (120), HBV ile infekte olan ve hastalığın akut, kronik hepatit, siroz ve HSK aşamasında olan hastalarda mutasyon analizi yapılan bir grup çalışma istatistiksel olarak incelenmiştir. Meta analiz kapsamında 2801'i HSK'lı toplam 11.582 HBV ile infekte olan hasta, 1966-2008 yılları arasında yapılmış 43 çalışma üzerinden değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızla ilişkili olarak, bu meta analizde 1653T, 1762T/1764A ve 1896A mutasyonlarının HSK ile olan muhtemel ilişkileri istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Bu analize göre; 1653T ve 1762T/1764A mutasyonlarının HSK ile ilişkili olduğu görülmüştür; ancak 1896A mutasyonu ile HSK arasında anlamlı bir ilişki görülememiştir. 1653T mutasyonunun HSK riskini 2.76 ve 1762T/1764A mutasyonunun ise HSK riskini 3.79 kat arttırdığı rapor edilmiştir. HSK oluşum riskinin KHB döneminde öngörülebilmesi kapsamında 1653T mutasyonunun duyarlılığı % 40,0 ve özgünlüğü % 81,9 saptanırken, 1762T/1764A dual mutasyonu için ise duyarlılık % 70,6 ve özgünlük % 60,6 olarak saptanmıştır.

Çalışmamız temel olarak retrospektif bir çalışma olarak tasarlanmıştır. Bununla birlikte HSK ile ilişkili mutasyonların bölgemizdeki hasta popülasyonlarında da mevcut olduğunu gösterilmesi bakımından, bulgularımız klinik açıdan önemli bulgulardır. Bu sebeple tedavi edilmekte olan hastaların HSK öncesi takip edilmelerini sağlamaya yönelik olarak başka bir prospektif nitelikli çalışmanın tasarlanması gerekliliğini ve tedavi süresince HSK ile ilişkili olduğu bildirilen mutasyonların takip edilmesinin gerekli olduğunu düşündürmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışma ile Mersin ilinde KBH'li hastalarda HSK gelişimi ile olası ilişkili X geni mutasyonları ilk defa analiz edilmiştir. Planladığımız bu çalışma retrospektif olarak tasarlanmış olmakla beraber HSK gelişimi ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bildirilen 1653T ve 1762T-1764A dual mutasyonları % 1,63 ve % 1,63 oranlarında tespit edilmiştir. Bulgularımız bölgemizde HSK ile ilişkili olan mutasyonların varlığını ortaya koymakta, ayrıca gelecekte prospektif klinik kord çalışmalarının planlanmasının HSK takibine yönelik olarak daha iyi hasta tedavisine katkı sağlayacağını göstermiştir.

Çalışmada kullandığımız dizi analizi tekniği, nonradyoaktif ve bu nedenle uygulaması geleneksel diğer radyoaktif yöntemlerden daha güvenlidir. Ayrıca, sonuçların bir gün içerisinde elde edilebilmesi ve laboratuvar şartları bir kez standardize edildikten sonra oldukça ekonomik olması ve otomatize metodlarda olduğu gibi cihaz ve kit bağımlılığına sebep olmamasından dolayı önemli bir avantaj sağlamaktadır. Bununla birlikte prospektif klinik kort çalışmalarında rutin olarak kullanıma uygun değildir. Bu çalışmalarda daha iyi standardize edilmiş otomatize dizi analizi metodlarının kullanılması daha uygun olacaktır.

Elde edilen tüm bu bulgular uluslararası platformlarda gerek yazılı gerek ise sözel bildiri ve makalelerle yayımlanacak ve hem bölgemiz hem de ülkemizde ilk defa elde edilen bu önemli veriler bilim dünyasına ve tıbbı sunulacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. **Kıyan M.** Hepatit B Virus. In: Tekeli E, Balık İ. *Viral Hepatit*. 1' Baskı. İstanbul: Karakter color AŞ, **2003**; 86-120.
2. **Mason WS, Seeger C.** Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*, **2000**;64:51-68.
3. **World Health Organization.** Hepatitis B. *World Health Organization Fact Sheet*, **2004**;WHO website: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/en/index.html>.
4. **Özacar T, Bilgiç A.** Hepatit B virusu. In: Topçu AV, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 1' Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, **2002**; 1350-1370.
5. **Neuveut C, Wei Y, Tiollais P, Buendia MA.** Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathologie Biologie*, **2010**;DOI: 10.1016/j.patbio.2010.03.005.
6. **Stephan S.** Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol*, **2007**;13(60):14-21.
7. **Jensen DM, Te SH.** Epidemiology of Hepatitis B and C Viruses: A Global Overview. *Clin Liver Dis*, **2010**;14:1-21.
8. **Liang TJ.** Hepatitis B: The Virus and Disease. *Hepatology*, **2009**;45(5):13-21.
9. **Sonsuz A.** HBsAg (+) hastaya yaklaşım. 10. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi. Antalya, 15-19 Ekim 2008; 142-146.
10. **Chu CM, Liaw YF.** Hepatitis B virus infection. *Lancet*, **2009**;373:582-592.
11. **Missale G, Boni C, Ferrari C, Urbani S.** Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol*, **2003**;39:36-42.
12. **Mehta AS, Block TM, Fimmel CJ, Jordan R.** Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, **2003**;22:5093-5107.
13. **Werb Z, Coussens LM.** Inflammation and cancer. *Nature*, **2002**;420(6917):860-870.

14. **Moradpour D, Wands JR.** Molecular pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. In: Boyer T, Wright T, Manns M. *Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease*. 5th Ed. Philadelphia: Saunders, **2006**; 165-175.
15. **Dong ZZ, Yao M, Yao DF.** Specific molecular markers in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, **2007**;6:241-247.
16. **Rodriguez UA, Brunetto MR, Bonino F.** Hepatitis B virus mutants. *Intervirol*, **1999**;42(2):69-80.
17. **İnal AS, Dundar Hİ.** Viral Hepatit. 1 Baskı. İstanbul: Orhan Matbaası, **2005**;10-20.
18. **Tabak F.** Virus Hepatitlerinin Epidemiyolojisi. In: Yucel A, Tabak F. *Günümüzde virus hepatitleri*. 2 Baskı. İstanbul: İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği. **1998**; 21-30.
19. **Oketani K, Oketani M, Xiaohong C, Arima T.** Low level wild-type and pre-core mutant Hepatitis B viruses and HBsAg negative reactivation of chronic Hepatitis B. *J Med Virol*, **1999**;58:332-337.
20. **Yenen OS.** Viral Hepatitler. In: Topçu AV, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları*. 1 Baskı. İstanbul: Nobel Kitapevleri Ltd. Şti, **1996**; 641-700.
21. **Schildgen V, Lüsebrink J, Schildgen O.** HBV: Virology. In: Mauss SA, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H. *Hepatology: A Clinical Textbook*. 1st Ed. Germany: Flying Publisher, **2009**; 55-74.
22. **Thomas HC, Karayiannis P.** Hepatitis B Virus: General Features. In: Mary BWJ, Regenmortel MHV. *Encyclopedia of Virology*. 3rd Ed. Strasbourg, France: Elsevier B.V, **2008**; 350-360.
23. **Özacar T, Bilgiç A.** Hepatit B ve D virusları. In: Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. 1 Baskı. Ankara: Güneş Kitapevi, **1999**; 1056-1070.
24. **Badur S.** Viral Hepatitler. In: Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S. *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*. 1.Baskı. Ankara: Güneş Kitapevi, **2004**; 175-202.
25. **Navas MC, Pujol FH, Hainaut P, Chemin I.** Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, **2009**;286:80-88.
26. **Wright TL, Terrault NA.** Viral hepatitis A through G. In: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. 6th Ed. New York: W.B Saunders Company, **1998**; 1123-1155.
27. **Hoofnagle JH.** Hepatitis B In: Haubrich WS, Schaffner F, Berk JE. *Bockus Gastroenterology*. 5th Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, **1995**; 2062-2078.

28. **Oishi N, Tang T, Kaneko S, Seishi M.** Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci*, **2006**;97(10):977-983.
29. **Gill FM, Hunt CM, Allen MI.** Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology*, **2000**;31:1037-1044.
30. **Kıyan M.** Hepatit B virusu. In: Kılıçturgay K, Badur S. Viral Hepatit. 1. Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, **2001**; 85-120.
31. **Mahoney FJ.** Update on diagnosis, management and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev*, **1999**;39:351-366.
32. **Gerlich WH, Kann M.** Structure and Molecular Virology. In: Thomas H, Lemon S, Zuckerman A. *Viral Hepatitis*. 3rd Ed. Churchill Livingstone: Blackwell Publising, **2005**; 149-179.
33. **Foster GR, Thomas HC, Sumiya M.** Mutation of gene for mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet*, **1996**;348(9039):1396-1397.
34. **Kew M, Françosi G, Damme PV, Meheus A.** Mutant hepatitis B viruses: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implication? *Vaccine*, **2001**;19:3799-3815.
35. **Alexopoulou A.** Mutants in precore, core promoter and core regions of Hepatitis B virus and their clinical relevance. *Annals of Gastroenterology*, **2009**;22(60):13-23.
36. **Robinson WS.** Hepadnaviridae: Hepatit B and D viruses. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller A, Tenover FC, Tenover RH. *Principles and Practice of Infectious Disease*. 5th Ed. New York: Churchill Livingstone, **2000**; 1652-1685.
37. **Schneider RJ, Bouchard MJ.** The enigmatic X gene of Hepatitis B virus. *J Virol*, **2004**;78(23):10725-10734.
38. **Murakami S.** Hepatitis B Virus X Protein: Structure, Function and Biology. *Intervirology*, **1999**;42:81-99.
39. **Ichida T, Matsuda Y.** Impact of hepatitis B virus X protein on the DNA damage response during hepatocarcinogenesis. *Med Mol Morphol*, **2009**;42:138-142.
40. **Nassal M, Beck D.** Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol*, **2007**;13(60):48-64.
41. **Gong ZJ, Meyer SD, Suwandhi W, Pelt JV, Yap SH.** Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes. *J Viral Hepat*, **2003**;4(3):145-153.

42. **Urban S, Glebe D.** Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol*, **2007**;13(60):22-38.
43. **Glebe D.** Recent advances in hepatitis B virus research: A German point of view. *World J Gastroenterol*, **2007**;13(60):8-13.
44. **Yoon GS, Jeong JK, Ryu WS.** Evidence that 5' -end cap structure is essential for encapsilation of hepatitis B virus pregenomic RNA. *J Virol*, **2000**;74(12):5502-5508.
45. **Locarnini S, Lee JY.** Hepatitis B virus: pathogenesis, viral intermediates and viral replication. *Clin Liver Dis*, **2004**;8:301-320.
46. Erişim; http://www.medscape.com/viewarticle/560945_3. ErişimTarihi: 01.07.2010.
47. **Zoulim F, Kay A.** Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res*, **2007**;127(2):164-176.
48. **Mantegani A, Mayerat C, Frei PC.** Does hepatit B virus genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat*, **1999**;6(4):299-304.
49. **Herron JC, Freeman S.** Evrimsel dūřünce için bir rnek: HIV'i anlamak. In: Karaytuę S, ıplak B, Başıbyk HH, Gndz İ. *Evrimsel Analiz*. 1' Baskı. Ankara: Palme yayınevi, **2007**; 3-19.
50. **Wu GY, Coash M.** Molecular virology of Hepatitis B and C: Clinical implications. In: Shetty K, Wu GY. *Clinical Gastroenterology: Chronic Viral Hepatitis*. 2nd Ed. New Jersey: Humana Press, **2009**; 1-31.
51. **McMillan J, Locarnini S, Bartholomeusz A.** The hepatit B virus and common mutants. *Semin Liver Dis*, **2003**;23:5-20.
52. **berg M, Ljunggren KK, Kidd AH.** The hepatitis B virus X gene: analysis of functional domain variation and gene phylogeny using multiple sequences. *J Gen Virol*, **1995**;76:2119-2130.
53. **Saitoh T, Uchida T, Shinzawa H.** Mutations of the X region of hepatis B virus and clinical implications. *Pathol Int*, **1997**;47:183-193.
54. **Bonura C, Tu H, Gianini C, Mouly H, Soussan P ve ark.** Biological Impact of Natural COOH-Terminal Deletions of Hepatitis B Virus X Protein in Hepatocellular Carcinoma Tissues. *Cancer Res*, **2001**;61:7803-7810.
55. **Lin J, Liu XH, Zhang SH, Feitelson MA, Gao HJ.** COOH-terminal deletion of HBx gene is a frequent event in HBV-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, **2008**;14(9):1346-1352.

56. **Guo JT, Block TM, London Thomas.** Clinical İmplication of the molecular biology of Hepatitis B Virus. In: Arias MA, Alter HJ, Boyer JL, Cohen DE, Fausto N, Shafritz DA, Wolkoff AW. *The Liver*, 5th Ed. Oxford: Blackwell Publishing, **2009**; 859-876.
57. **Thimme R, Baumert TF, Weizsäcker F.** Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, **2007**;13(60):82-90.
58. **Lok ASF, Hussain M.** Mutations in the hepatitis B virus polymerase gene associated with antiviral treatment for hepatitis B. *J Viral Hepat*, **1999**;31(6):1318-1326.
59. Erişim:http://www.mdconsult.com/das/book/body/207596419-2/0/1492/14-u1.0-B978-1-4160-2805-5..50156-7--f3.fig. ErişimTarihi: 29.06.2010.
60. **Richman DD, Perrillo LP, Sherman KE.** Asia-Pasific Pocket Guide to Hepatitis B virus. New Jersey: University of Wisconsin Board of Reagents and MDG Development Group, **2009**.
61. **Değertekin B.** Hepatit B Patogenezi, Doğal Seyri ve Kliniği. *Journal of Gastroenterohepatology*, **2010**;3(60):45-52.
62. **Leung N, Hui CK, Yuen ST, Zhang HY, Leung KW ve ark.** Natural history and disease progression in Chinese chronic hepatitis B patients in immune-tolerant phase. *Hepatology*, **2007**;46(2):395-401.
63. **Fattovich G.** Natural history of hepatitis B. *J Hepatol*, **2003**;39:50-58.
64. **Lai CL, Lau GKK, Wu PC.** The natural history of chronic hepatitis B infection. *Hong Kong Med J*, **1997**;3:283-288.
65. **Sonsuz A.** Kronik Hepatit B ve C. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri (Sempozyum Dizisi No:58). İstanbul, 79-90.
66. **Shi CH, Shi YH.** Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, **2009**;15(25):3099-3105.
67. **Tasyaran M.** HBV infeksiyonunun epidemiyolojisi. In: Kılıçturgay K, Badur S. Viral Hepatitle Savaşım Derneği. 1.Baskı. İstanbul, **2001**; 85-120.
68. **EASL.** International Consensus Conference on Hepatitis B. Consensus statement (Short version). *J Hepatol*, **2003**;38(4):533-540.
69. **Kew MC.** Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Pathologie Biologie*, **2010**; DOI:10.1016/j.patbio.2010.01.005.

70. **Alter MJ.** Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol*, **2003**;39:64-69.
71. **Ertuğrul Ö, Baykan M.** Türkiye'de HBV ve HCV infeksiyonlarının durumu. *Genel Tıp Derg*, **2001**;11(2):89-92.
72. T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Çalışma Yıllığı, 2004. Erişim: <http://www.saglik.gov.tr/extras/istatistikler/temel2004/tablo-42.htm>. ErişimTarihi: 03.07.2010.
73. **Shin HR, Ferlay, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM.** Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. *Int J Cancer*, **2010**; DOI: 10.1002/ijc.25516.
74. **Bray F, Parkin DM, Ferlay J, Pisani P.** Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin*, **2005**;55:74-108.
75. **Ribes J, Bosch FX, Diaz M, Veries R.** Primary Liver Cancer: Worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*, **2004**;127:5-16.
76. **Law MG, Niguyen VTT, Dore GJ.** Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: Epidemiological characteristics and disease burden. *J. Viral Hepatit*, **2009**;16:453-463.
77. **Somali I, Alacacioğlu A, Şimşek İ, Astarcioglu İ, Özkan M ve ark.** Epidemiology and Survival of Hepatocellular Carcinoma in Turkey: Outcome of Multicenter Study. *Jpn J Clin Onco*, **2008**;38(10):683-688.
78. **Özdemir FT, Tözün N, Eren F.** Kronik HBV Enfeksiyonu. In: Nurdan T, Şimşek H, Özkan H, Şimşek İ, Gören A. *Klinik Gastroenteroloji ve Hepatoloji*. 1.Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi, **2007**: 395-412.
79. **Özdemir S.** Hepatit B ve D. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri (Sempozyum Dizisi No:38). İstanbul, Mart 2004: 143-149.
80. **Keeffe EB, Ayoub WS.** Current Treatment of Chronic Hepatitis B. In: Shetty K, Wu GY. *Clinical Gastroenterology: Chronic Viral Hepatitis*. 2nd Ed. New Jersey: Humana Press, **2009**: 243-257.
81. **Heatcote EJ, Marcelin P, Buti M, Gane E, Man RA ve ark.** Tenofovir Disoproxil Fumarate versus Adefovir Dipivoxil for Chronic Hepatitis B. *N Engl J Med*, **2008**;359:2442-2155.
82. **Yenice N, Mehtap Ö, Arıcan N, Gökden Y.** Kronik hepatit B enfeksiyonunda lamivudin monoterapisi, interferon alfa monoterapisi ve kombinasyon tedavisi. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, **2006**;5(60):31-35.
83. **Lok ASF, Osborn MK.** Antiviral options for the treatment of chronic hepatitis B. *J Antimicrob Chemother*, **2006**;57:1030-1034.

84. **Sherman M, Shafman S, Burak K, Doucette K, Wong W ve ark.** Management of chronic hepatitis B: Consensus guidelines. *Can J Gastroenterol*, **2007**;21:5-24.
85. **Viral Hepatitle Savaşım Derneği (VHSD).** Hepatit infeksiyonunda tanı ve tedavi. II. Viral Hepatit Tanı ve Tedavi Konsensus Toplantısı. Antalya, 2007: 5-14.
86. **Bader TF.** Treatment of Hepatitis B. 1st Ed. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, **2006**.
87. **Sablon E, Yuen MF, Hui CK, Decraemer H, Lai CL.** Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy. *Hepatology*, **2001**;34(4): 785-791.
88. **Dienstag J, Lai CL, Schiff E, Leung NW, Atkins M ve ark.** Prevalence and Clinical Correlates of YMDD Variants during Lamivudine Therapy for Patients with Chronic Hepatitis B. *Clinical Infectious Diseases*, **2003**;36:687-696.
89. **Liang JT, Ghany M.** Drug targets and molecular mechanism of drug resistance in choronic hepatitis B. *Gastroenterology*, **2007**;132:1574-1585.
90. **Ferir G, Kaptein S, Neyts J, Clercq ED.** Antiviral treatment of choronic hepatitis B virus infection: the past, the present and the future. *Rev Med Virol*, **2008**;18:19-34.
91. **Doo E, Hoofnagle JH, Liang TJ, FleischerR, Lok ASF.** Management of hepatitis B: Summary of a clinical research workshop. *Hepatology*, **2007**;45:1056-1075.
92. **Perrillo R.** Hepatitis B and D. In: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*. 9th Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, **2010**; 1287-1307.
93. **Zöllner B, Bömmel F, Sarrazin C, Spengler U, Hüppe D ve ark.** Tenofovir for patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus infection and high HBV DNA level during adefovir therapy. *Hepatology*, **2006**;44(2):318-325.
94. **Wünsche T, Bömmel F, Mauss S, Reinke P, Bergk A ve ark.** Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Hepatology*, **2004**;40(6):1421-1425.
95. **Liu Z, Hou J, Gu F.** Epidemiology and Prevention of Review Hepatitis B Virus Infection. *Int. J. Med. Sci.*, **2005**;2(60):50-57.
96. **Tekeli E.** Hepatit B virus infeksiyonunda korunma. In: Tabak F, Balık İ, Tekeli E. *Viral Hepatit*. 1.Baskı. İstanbul: Okay Matbaası, **2007**; 176-179.
97. **Santos VA, Khouri ME.** Hepatitis B: Epidemiological, immunological and serological considerations emphasizing mutation. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med*, **2004**;59(4):216-224.

98. **Lavanchy D.** Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*, **2004**;11(2):97-107.
99. **CDC.** A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Part 1: Immunization of infants, children, and adolescents. *MMWR* 2005;54(No.RR-16):1-32.
100. **Dusheiko G, Pawlotsky JM, Hatzakis A, Lau D, Lau G ve ark.** Klinik çalışmalar ve klinik uygulamalarda hepatit B virus enfeksiyonu tedavisinin virolojik izlemi: Standart yaklaşım için öneriler. *Gastroenterology Türkçe Baskı*, **2008**;3:85-97.
101. **Özsan M.** HBV enfeksiyonunda mikrobiyolojik tanı. In: Tabak F, Balık İ, Tekeli E. *Viral Hepatit*, 1.Baskı. İstanbul: Okay Matbası, **2007**; 121-130.
102. **Magiorkinis E, Hatzakis A, Haida C.** HBV virological assessment. *J Hepatol*, **2006**;44:71-76.
103. **Shapiro F, Sablon E.** Advances in Molecular Diagnosis of HBV Infection and Drug Resistance. *Int J Med Sci*, **2005**;2:8-16.
104. **Yeon JE.** Technique for the Early Detection of Drug-Resistant HBV DNA during Antiviral Therapy. *Intervirol*, **2008**;51:7-10.
105. **Gresshoff PM, Anolles GC.** Staining nucleic acids with silver: An alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. *Promega Notes Magazine*, **1994**;45:13.
106. Erişim; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/52857742>. ErişimTarihi: 16.09.2010.
107. **Corsaro D, Venard V, Kajzer C, Bronowicki JB, Faou AL.** Hepatitis B Virus X Gene Variability in French-Born Patients With Chronic Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *J Med Virol*, **2000**;62:177-184.
108. **Chen CJ, Hooje UH, Yang H.** Long-Term Outcomes in Hepatitis B: The REVEAL-HBV Study. *Clin Liver Dis*, **2007**;11:797-816.
109. **Chen JG, Kuang SY, Enger PA, Lu JH, Zhu YR ve ark.** Acceleration to death from liver cancer in people with hepatitis B viral mutations detected in plasma by mass spectrometry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2007**;16(6):1213-1218.
110. **Carbone M, Brodano-Barbanti G.** Viral Carcinogenesis. In: Chang AE, Ganz PA, Hayes DF, Kinsella TJ, Pass HI ve ark.. *Oncology: an evidence based approach*. 1st Ed. ABD: Springer, **2006**; 214-232.
111. **Haluskova J.** Epigenetic Studies in Human Diseases. *Folia Biologica*, **2010**;56:83-96.

112. **Yao DF, Dong Z, Yao M.** Specific molecular markers in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, **2007**;6:241-247.
113. **Marrero JA.** Hepatosellüler karsinom. *Current Opinion in Gastroenterology Turkish Edition*, **2006**;1(3):248-253.
114. **Niu D, Feng H, Chen WN.** Proteomic analysis of HBV-associated HCC: Insights on mechanisms of disease onset and biomarker discovery. *Journal of Proteomics*, **2010**;73:1283-1290.
115. **Cho EY, Kim HC, Choi CS, Shin SR, Park C ve ark.** Nucleotide changes related to hepatocellular carcinoma in the enhancer 1/x-promoter of hepatitis B virus subgenotype C2 in cirrhotic patients. *Cancer Sci*, **2010**;101:1905-1912.
116. **Shinkai N, Tanaka Y, Kiyooki I, Mukaide M, Hasegawa I ve ark.** Influence of Hepatitis B Virus X and Core Promoter Mutations on Hepatocellular Carcinoma among Patients Infected with Subgenotype C2. *J Clin Microbiol*, **2007**;45(10):3191-3197.
117. **Datta S, Banerjee A, Chandra PK, Biswas A, Panigrahi R ve ark.** Analysis of hepatitis B virus X gene phylogeny, genetic variability and its impact on pathogenesis: Implications in Eastern Indian HBV carriers. *Virology*, **2008**;382:190-198.
118. **Ito K, Arase Y, Saitoh S, Kobayashi M, Someya T ve ark.** T1653 mutation in the box alpha increases the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus genotype C infection. *Clin Infect Dis*, **2006**;42:1-7.
119. **Chen PJ, Kao JH, Lai MY, Chen DS.** Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology*, **2003**;124:327-334.
120. **Liu S, Zhang H, Gu C, Yin J, He Y ve ark.** Association between hepatitis B virus mutations and risk of hepatocellular carcinoma: A meta analysis. *J Natl Cancer Inst*, **2009**;101: 1066-1082

ÖZGEÇMİŞ

15.03.1985 tarihinde İstanbul ilinde doğdu. Liseyi İstanbul'da tamamladıktan sonra 2002 yılında Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2008 yılında mezun oldu. 2008 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrencisi olarak öğrenimine devam etmektedir.