

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

**KRONİK HEPATİT B'Lİ HASTALARIN ADEFOVİR
TEDAVİSİ SIRASINDA HBV POLİMERAZ GENİNDE
GELİŞEN VE ADEFOVİRE KARŞI DİRENÇ
OLUŞUMUNA SEBEP OLAN MUTASYONLARIN DİZİ
ANALİZİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Fatma Ebru BEKİROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN

MERSİN - 2007

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

**KRONİK HEPATİT B’Lİ HASTALARIN ADEFOVİR
TEDAVİSİ SIRASINDA HBV POLİMERAZ GENİNDE
GELİŞEN VE ADEFOVİRE KARŞI DİRENÇ
OLUŞUMUNA SEBEP OLAN MUTASYONLARIN DİZİ
ANALİZİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Fatma Ebru BEKİROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
“BAP-SBE FM (FEB) 2007-1” nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:


MERSİN - 2007

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan "**Kronik Hepatit B'li Hastaların Adefovir Tedavisi Sırasında HBV Polimeraz Geninde Gelişen ve Adefovire Karşı Direnç Oluşumuna Sebep Olan Mutasyonların Dizi Analizi İle Araştırılması**" başlıklı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

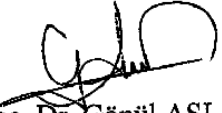
18.12.2007


Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı/Danışman


Prof. Dr. Güröl EMEKDAŞ

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi


Doç. Dr. Gönül ASLAN

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve 2007/..... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Ülku ÇÖMELEKOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren her konuda yardımlarını ve desteğini gördüğüm Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ başta olmak üzere değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Gönül ASLAN, Sayın Doç. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU, Sayın Yrd. Doç. Dr. Feza OTAĞ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan Doktora Öğrencisi Seda TEZCAN ve Doktora Öğrencisi Mahmut ÜLGER başta olmak üzere Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan Yüksek Lisans Öğrencisi Serpil POLAT'a ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da beni maddi ve manevi açıdan sürekli olarak destekleyen aileme ve nişanlıma sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hepatit B Virusunun Tarihçesi, Genom Yapısı ve Replikasyonu, Genel Durumu, Tedavi ve Direnç Mutasyonları.....	3
2.1.1. Tarihçe.....	3
2.1.2. Hepatit B Virusu	4
2.1.2.1. Virusun Yapısı	4
2.1.2.2. Genomun Yapısı	5
2.1.2.3. Virusun Replikasyonu	7
2.1.2.4. Subtip ve Genotipler	10
2.1.3. Patogenez	12
2.1.3.1. Hepatit B İnfeksiyonunda İmmun Yanıttan Kaçma Mekanizmaları	13
2.1.4. Mutasyon Türleri	13
2.1.5. Hepatit B Virus Mutantları	14
2.1.5.1. Prekor/Kor Geni Mutasyonları	15
2.1.5.2. S Geni Mutasyonları.....	17
2.1.5.3. P Geni Mutasyonları	20
2.1.5.4. X Geni Mutasyonları	21
2.1.6. Virusun Stabilitesi	22
2.1.7. Epidemiyoloji	23

2.1.7.1. Bulaşma Yolları	23
2.1.7.2. Dünyada HBV İnfeksiyonu	24
2.1.7.3. Türkiye’de HBV İnfeksiyonu	24
2.1.8. Klinik Belirti ve Bulgular	25
2.1.8.1. Akut İnfeksiyon	25
2.1.8.2. Kronik İnfeksiyon	25
2.1.8.3. Hepatosellüler Karsinoma (HSK).....	26
2.1.9. Tedavi	27
2.1.9.1. Akut İnfeksiyonun Tedavisi	27
2.1.9.2. Akut Fulminan Hepatit B Tedavisi.....	27
2.1.9.3. Kronik Hepatit B Tedavisi	27
2.1.9.3.1. İnterferon Alfa Tedavisi	28
2.1.9.3.2. Kronik Hepatit B’de Kullanılan İnterferon Dışındaki Tedavi Seçenekleri.....	29
2.1.9.3.3. Diğer Tedaviler.....	36
2.1.9.3.4. Diğer Antiviral İlaçlar.....	38
2.1.10. Korunma ve Kontrol	39
2.1.11. Tanı	40
2.1.11.1. Serolojik Testler	40
2.1.12. Direkt Tanı	43
2.1.12.1. Viral Nükleik Asitlerinin Gösterilmesi.....	44
2.1.12.2. Antiviral Direnç Monitorizasyonu	44
2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Tekniği.....	47
2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bileşenleri.....	49
2.2.2. Semi-Nested PZR	53
2.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Analizi.....	55
2.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi.....	55
2.4. DNA Dizi Analizi.....	55
2.4.1. Dideoksi Zincir Sonlanması Yöntemi.....	56
2.4.2. Sekans Reaksiyonu.....	57
2.4.3. Gümüş Boyama DNA Dizi Analizi.....	58
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	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.....	63
3.3. Yöntemler.....	64
3.3.1. Moleküler Analiz.....	64
3.3.1.1. HBV DNA Örneklerinin Hazırlanması.....	64
3.3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	65
3.3.1.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi.....	68
3.3.1.4. Polimeraz Gen Bölgesinin Tespiti.....	69
3.3.1.5. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	69
3.3.2. Sekans Reaksiyonu.....	69
3.3.2.1. Dizi Analizinde Kullanılacak Olan Sekans Camların Hazırlanması.....	71
3.3.2.2. Jel Solüsyonunun Hazırlanması ve Cam Kasete Dökülmesi.....	72
3.3.2.3. Elektroforez.....	73
3.3.2.4. Sekans Jelinin Gümüş Boyanması.....	73
3.3.2.5. Görüntüleme.....	75
3.3.2.6. Değerlendirme.....	75
4. BULGULAR.....	76
4.1. Moleküler Analiz Sonuçları.....	76
4.1.1. PZR Aşaması.....	76
4.1.2. Gümüş Boyama DNA Dizi Analizi Sonuçları.....	77
5. TARTIŞMA.....	81
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	86
7. KAYNAKLAR.....	87
ÖZGEÇMİŞ.....	92

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.: Elektron mikroskopunda HBV'nin Dane parçacığı, tübüler ve küresel farklı HBsAg içeren diğer iki parçacığının görülmesi.....	4
Şekil 2.2.: İnfeksiyöz Dane parçacığının yapısı.....	5
Şekil 2.3.: HBV'nin genetik haritası.....	6
Şekil 2.4.: HBV'nin replikasyonu.....	8
Şekil 2.5.: HBeAg (+) ve HBeAg (-) HBV'de Prekor/Kor ürünlerinin translasyonu....	15
Şekil 2.6.: Aşıdan sonra HBsAg'nin "a" determinantında bildirilen bazı mutasyonlar..	19
Şekil 2.7.: KHB'nin seyrinde farklı klinik durumlara progresyonun tahmin edilen yıllık yüzde oranları.....	26
Şekil 2.8.: HBV polimerazındaki LAM mutasyon alanları	32
Şekil 2.9.: HBV polimerazındaki ADV mutasyon alanları	35
Şekil 2.10.: Akut hepatiti izleyerek kronikleşen HBV enfeksiyonunda serolojik göstergeler	43
Şekil 2.11.: PZR aşamaları	48
Şekil 2.12.: Zincir uzaması	48
Şekil 2.13.: PZR döngüleri	49
Şekil 2.14.: Nested ve Semi-Nested PZR	54
Şekil 2.15.: DNA dizi analizi ile DNA nükleotid dizilerinin ortaya çıkarılması	56
Şekil 4.1.: Semineded PZR yöntemi ile belirlenen direnç ile ilişkili polimeraz gen bölgelerinin %1,5'lik agaroz jel elektroforezi ile gösterilmeleri.....	76
Şekil 4.2.: Amonyum-asetat yöntemi ile saflaştırılmış polimeraz gen bölgelerinin PZR ürünlerinin %1,5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	77
Şekil 4.3.: ADV direnci ile ilişkili K241E mutasyonu.....	80
Şekil 4.4.: ADV direnci ile ilişkili N236T mutasyonu.....	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.: HBV genotip ve alt tiplerinin coğrafik dağılımları.....	11
Çizelge 2.2.: RNA kodon tablosu.....	22
Çizelge 2.3.: LAM direncine sebep olan başlıca mutasyonlar.....	31
Çizelge 2.4.: HBV Polimeraz rt gen bölgesinde LAM'a direnç mutasyonları.....	31
Çizelge 2.5.: HBV Polimeraz rt gen bölgesinde ADV direnç mutasyonları.....	36
Çizelge 2.6.: HBV Polimeraz rt gen bölgesinde entekavir direnç mutasyonları.....	37
Çizelge 2.7.: Hepatitli Hastalarda HBV serolojik göstergelerinin yorumu.....	43
Çizelge 3.1.: ADV direncinden sorumlu polimeraz gen bölgelerine spesifik primer dizileri.....	66
Çizelge 3.2.: Polimeraz gen bölgesinin 1 inci tur PZR karışımı.....	66
Çizelge 3.3.: Polimeraz gen bölgesinin 2 nci tur PZR karışımı.....	67
Çizelge 3.4.: ADV direncinden sorumlu polimeraz gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları (1 inci ve 2 nci tur).....	67
Çizelge 3.5.: Sekans reaksiyon karışımı.....	70
Çizelge 3.6.: ADV direncinden sorumlu gen bölgesinin dizi analizinde kullanılan reaksiyon koşulları.....	70
Çizelge 4.1.: Gümüş boyama DNA dizi analizi ile elde edilen sonuçlar.....	78
Çizelge 4.2.: Gümüş boyama DNA dizi analizi ile ADV direnci ile ilişkili tespit edilen mutasyonlar.....	79

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADV	Adefovir Dipivoksil
AKY	Akut Karaciğer Yetmezliği
ALT	Aspartat Aminotransferaz
AST	Alanin Aminotransferaz
cccDNA	Covalently Closed Circular DNA
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	deoksiribonükleotid Trifosfat
Et-Br	Etidyum Bromid
FAM	Famsiklovir
HBcAg	Hepatit B Core Antijen
HBeAg	Hepatit B Envelope Antijen
HBIG	Hepatit B Hiperimmünglobulin
HBsAg	Hepatit B Surface Antijen
HBV	Hepatit B Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSK	Hepatosellüler Karsinoma
IFN	İnterferon
KHB	Kronik Hepatit B
LAM	Lamivudin
mRNA	Messenger RNA
OLT	Ortotopik Karaciğer Transplantasyonu
ORF	Open Reading Frame
RNA	Ribonükleik Asit
RT	Reverse Transcriptase
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ÖZET

Kronik Hepatit B'li Hastaların Adefovir Tedavisi Sırasında HBV Polimeraz Geninde Gelişen ve Adefovire Karşı Direnç Oluşumuna Sebep Olan Mutasyonların Dizi Analizi İle Araştırılması

Son zamanlarda lamivudin (LAM), famsiklovir (FAM) ve adefovir (ADV) gibi nükleosid analoglarının geliştirilmesi ile Kronik hepatit B (KHB) infeksiyonunun tedavisinde önemli antiviral etkinlik ve tolerans sağlanmış olmasına rağmen bu bileşikler ile uygulanan kısa süreli tedavi viral temizlenmenin sağlanabilmesi için yetersiz kalmaktadır. Tedavinin etkinliğinin artırılması için uzun süreli (4-5) yıl tedaviler önerilmektedir. Bu ise dirençli mutantların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. LAM dirençli olan hastalarda ise ADV iyi bir alternatif olarak önerilmekteyken son zamanlarda yapılan çalışmalar ADV'ye dirençli virus izolatlarının da ortaya çıktığını rapor etmektedir. Planladığımız bu çalışmadaki amacımız, KHB infeksiyonlu hastaların antiviral tedavi sırasında, virusun polimeraz geninin D domaininde meydana gelen mutasyonların dizi analizi metodu ile araştırılması ve muhtemel direnç gelişimlerinin tespit edilerek yeni tedavi stratejilerinin oluşturulmasına ve daha etkili antiviral tedavi etkinliğinin sağlanmasına katkıda bulunulmasıdır. Çalışmaya HBV ile infekte 61 hasta dahil edilmiştir. Hastaların serum örneklerinden viral DNA ekstrakte edildi. Polimeraz geninin C ve D domainlerini kodlayan bölgeleri semi-nested PCR ile amplifiye edilerek saflaştırıldı, daha sonra ise gümüş boyama tabanlı DNA dizi analizi metodu ile analiz edildi. Elde edilen diziler, gen bankası veri tabanlarından temin edilen dizi kayıtları ile karşılaştırılarak, mutasyonların varlığı yönünden araştırıldı. Çalışılan toplam 61 örneğin 5 (%8.19)'ünde ADV direncinden sorumlu mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu mutasyonların %4.9'u K241E, %3.2'si ise N236T şeklindedir. Adefovir direnci ile ilişkili olduğu net olarak bilinen bu mutasyonlara ilaveten adefovir direnci ile muhtemel ilişkisi olabileceği ima edilen P237T (1 hasta, %1.6), P237H(1 hasta, %1.6), N238A (1 hasta, %1.6), N238R (2 hasta, %3.2), Y245H (2 hasta, %3.2) ve I233V (1 hasta, %1.6) mutasyon paternleri de çalışma grubumuzda tesbit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B virusu, Adefovir, direnç, dizi analizi, polimeraz gen

ABSTRACT

Characterization with Sequence Analyses of Mutation Developing within HBV Polymerase Gene and Associated with Resistance to Adefovir During the Adefovir Treatment of Patients with Chronic Hepatitis B virus

Recently, although antiviral activity has been considerably obtain from treatment of chronic hepatitis B (CHB) infection with developing to nucleoside analogs as lamivudine (LAM), famciclovir (FAM) and adefovir (ADV), short term therapy with this compounds is being insufficient for viral clearance. Long term therapy (4-5 years) is recommended for the increase of treatment activity. This is also cause to appear of resistant mutant strains. ADV is recommended as suitable alternative in LAM resistant patients, but recently investigations suggest that came out of resistant strains to ADV. In this study, we aimed to analyzing of mutations by sequencing method within D domain of polymerase gene during the treatment of patients with CHB infection and detecting to most likely resistance development. Sixty-one patients with HBV were included in this study. Viral DNA extraction was performed form serum or blood samples of patients. Polymerase gene region is coding the C and D domain was amplified with semi-nested PCR method and following by purified and then these products were analyzed by Silver sequence DNA sequence analysis method. After the analysis, obtained sequences were investigated to aspect of presence of mutation as compared with GeneBank sequence database. We detected to nucleotide substitution which can be responsible to ADV resistance in 5 (8.19%) of 61 samples. This mutation patterns were as K241E in 3 patients (4.9%) and N236T in 2 patients (3.2%). In addition to these mutation patterns which are known as clearly associated to ADV resistance, we were detected to certain mutation patterns which are implicated of likely associated to ADV resistance in our study groups. These mutations are P237T (in 1 patient , 1.6 %), P237H (in 1 patient, 1.6%), N238A (in 1 patient, 1.6%), N238R (in 2 patients, 3.2%), Y245H (in 2 patients, 3.2%) and I233V (in 1 patient, 1.6%).

Key Words: Hepatitis B virus, Adefovir, resistance, sequence analysis, polymerase gene

1. GİRİŞ

Hepatit B virus (HBV) infeksiyonu ülkemizde karaciğer hastalıklarının en önemli nedenlerinden biridir. HBV'ye bağlı gelişen akut hepatit, kronik hepatit, karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinoma (HSK) gibi tablolar, medikal-cerrahi tedavileri ve ciddi komplikasyonları ile tıbbın birçok alanını ilgilendiren ve sağlık sorunları arasında önemli yer tutan bir hastalık grubunu oluşturmaktadır. HBV infeksiyonu ülkemizde ortalama %6 (%4.4-12.5) taşıyıcılık oranı ile yaklaşık 4 milyon insanımızı ilgilendirmekte, muhtemelen yüz binleri bulan kronik hepatit ve karaciğer sirozu vakaları ile maddi ve manevi yönleri olan ciddi bir sorun oluşturmaktadır (1).

Kronik Hepatit B (KHB)'li hastalara uygulanan antiviral tedavi seçeneklerinden biri olan lamivudin'in (LAM); virolojik, biyokimyasal ve histolojik olarak etkili olduğu gösterilmiştir. Uzun dönem LAM tedavisiyle ilgili önemli bir sorun HBV polimeraz geninde mutasyonlara bağlı antiviral direnç gelişimidir. LAM'a dirençli HBV gelişmesi, LAM'a klinik ve virolojik cevabı azaltmaktadır. Bu nedenle LAM'a dirençli KHB'li hastalarda genellikle adefovir dipivoksil (ADV)'e geçilmesi önerilmektedir.

ADV, LAM'a dirençli ve mutant HBV infeksiyonları da dahil olmak üzere, hepatit B viral replikasyonu olan yetişkinlerde KHB tedavisinde kullanılan bir adenin nükleotid analogudur (2). ADV'nin invitro olarak hepadnaviruslar, retroviruslar ve herpes virüslerine karşı güçlü antiviral etkili olduğu gösterilmiştir (3). KHB tedavisinin gidişinde ADV'ye direnç gelişimi LAM'la karşılaştırıldığında sıklığı daha azdır ve daha geç oluşmaktadır (4). ADV'ye direnç oranları genel olarak 48 inci haftada %0, 96 ncı haftada %2 ve 144 üncü haftada %7 bulunmuştur. Homojen popülasyonda HBeAg (-) olan hastaları içeren bir başka çalışmada retrospektif olarak adefovire direnç oranları 2, 3, ve 4 üncü yıllarda sırasıyla %5, %11 ve %18 olarak bulunmuştur (3).

Aktif bağışık cevap varlığına rağmen virusta meydana gelen genetik değişiklikler mutant suşun hayatietini devam ettirmesine imkan sağlamakta; bu durum tanıda karışıklıklara; aşı çalışmalarında ise başarısızlıklara yol açmaktadır. Bu nedenlerle HBV mutantlarının önemi her geçen gün biraz daha artmaktadır.

Çalışmamızdaki amaç, KHB infeksiyonu tanısı ile Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde ADV ile tedavi edilen hastaların, tedavi sırasında virusun polimeraz geninin D domaininde N236T ve K241E mutasyonunun dizi analizi metodu

ile araştırılması ve muhtemel direnç gelişimlerinin tespit edilerek yeni tedavi stratejilerinin oluşturulmasına ve daha etkili antiviral tedavi etkinliğinin sağlanmasına katkıda bulunmaktır. Literatüre baktığımızda ülkemizde de bu amaçla yapılmış veya yapılmakta olan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma literatüre katkısı yanında üniversitemiz araştırma hastanesinde tedavi görmekte olan KHB'li hastaların tedavisine de katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatit B Virusunun Tarihçesi, Genom Yapısı ve Replikasyonu, Genel Durumu, Tedavi ve Direnç Mutasyonları

2.1.1. Tarihçe

İlk kez Hipokrat'ın viral hepatitleri tanımladığı bilinmesine rağmen, kayıtlara geçişi 1883 yılında Bremen'deki tersane işçileri arasında çiçek aşısını takiben oluşması sonucu olmuştur. 1943'te Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.)'nde bulaşıcı hepatit 'infeksiyöz hepatit' olarak isimlendirilmiş, İngiltere Sağlık Bakanlığı aynı yıl kan, plazma, serum naklinden sonra gelişen sarılıkları 'homolog serum sarılığı' adı altında toplamıştır. Antik çağlardan beri bilinen sarılıkta salgın hastalığa virusun neden olabileceğini 1908'de Mc Donald düşünmüş, 1912' de Cockayne epidemik formunu tanımlamış ve "infeksiyöz hepatit" demiştir. 1947'de McCullum infeksiyöz hepatit için, hepatit A; serum hepatiti için, hepatit B deyimlerini kullanmıştır. Viral hepatitlerde karaciğer hasarını belirlemede aminotransferazlar (AST, ALT) 1950'lerden beri kullanılmaktadır (5). Blumberg'in Avustralya'lı yerli bir hastanın kanında Avustralya antijenini bulmasıyla hepatit serolojisinde yeni bir çığır açılmış ve 1965 teki bu buluşlarıyla araştırmacılar Nobel ödülü kazanmışlardır (6). HBV'yi açıklama çabaları sonuç verdi ve 1970'te Dane parçacığı, 1971'de kor antijen, 1973'te deoksiribonükleik asit polimeraz (DNA polimeraz) ve 1974'te virusun özgül deoksiribonükleik asit (DNA)' sı tanımlandı. 1979'da ise DNA'sı kopyalanarak tam nükleotid dizisi çıkarıldı. DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle çoğaltılması bu alanda Nobel ödülü kazandıran başka bir buluştur. Bu buluşlarla son 35 yıl içinde HBV'nin moleküler biyolojisi, epidemiyolojisi, patogenezi, tanı ve tedavisi ile korunma yönünde çok önemli gelişmeler yaşanmıştır (5).

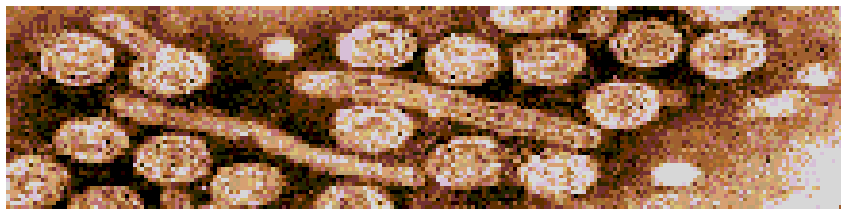
2.1.2. Hepatit B Virusu

2.1.2.1. Virusun Yapısı

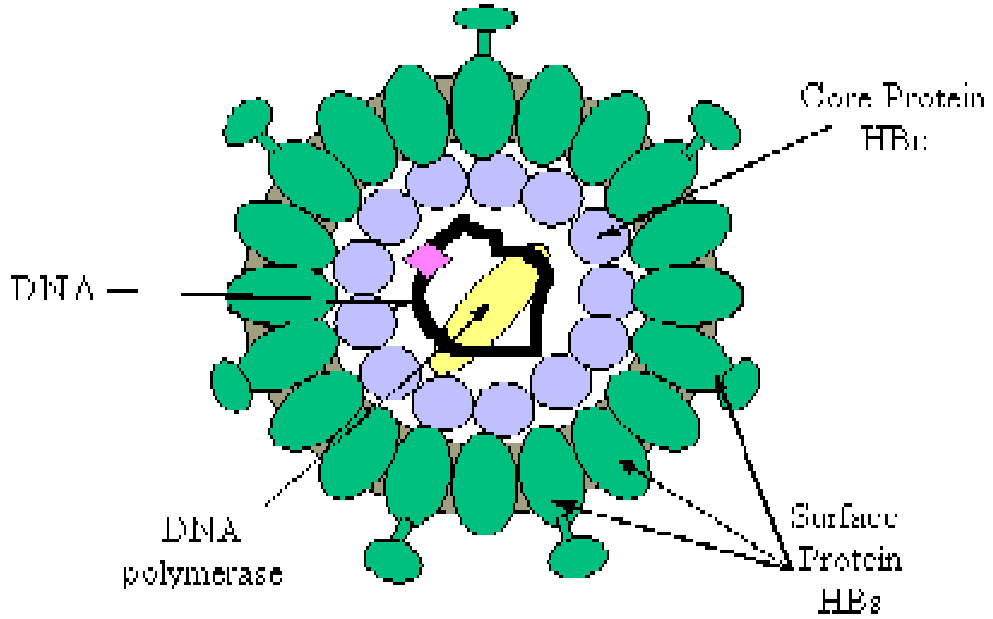
Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirus genusunda yer alan HBV, ailenin diğer üyeleri olan kuş ve memeli virusları gibi dar bir konak spektrumu ve doku tropizmine sahiptir. Aynı ailede yer alan ördek HBV (DHBV) ve kunduz HBV (WHBV) ile %70'e varan dizi benzerlikleri vardır.

HBV 42 nm çapında, sferik bir biçimde ve zarflı bir virustur. Hepatositlerde replike olur ve gelişen infeksiyon sonucu karaciğer fonksiyon bozukluğuna yol açar. Kısmen çift sarmallı olan 3.2 kb uzunluğunda, sirküler DNA genomu içerir. Konak hücre yüzeyinden kazanılmış olan lipid zarf üzerinde üç formda viral yüzey antijeni (HBsAg) bulunur: büyük (L), orta (M) ve küçük (S) yüzey antijenleri. Virusun kapsidi 27 nm çapındadır; çekirdek antijeni (HBcAg), infektivite antijeni (HBeAg) ve viral genom ile polimeraz enzimini içerir.

HBV ile infekte hastaların kanında elektron mikroskobu ile üç ayrı viral partikül gösterilmiştir. 42-47 nm çapında olan partiküller (Dane partikülü) tam HBV virionu olup infeksiyözdür. 17-25 nm çapındaki sferik yapılar ile 17-25 nm eninde ve birkaç yüz nm boyundaki filamentöz partiküller infeksiyöz değildirler (Şekil 2.1. ve 2.2.). Bu partiküllere karşı nötralizan antikorlar sentezlenmektedir (1, 7).



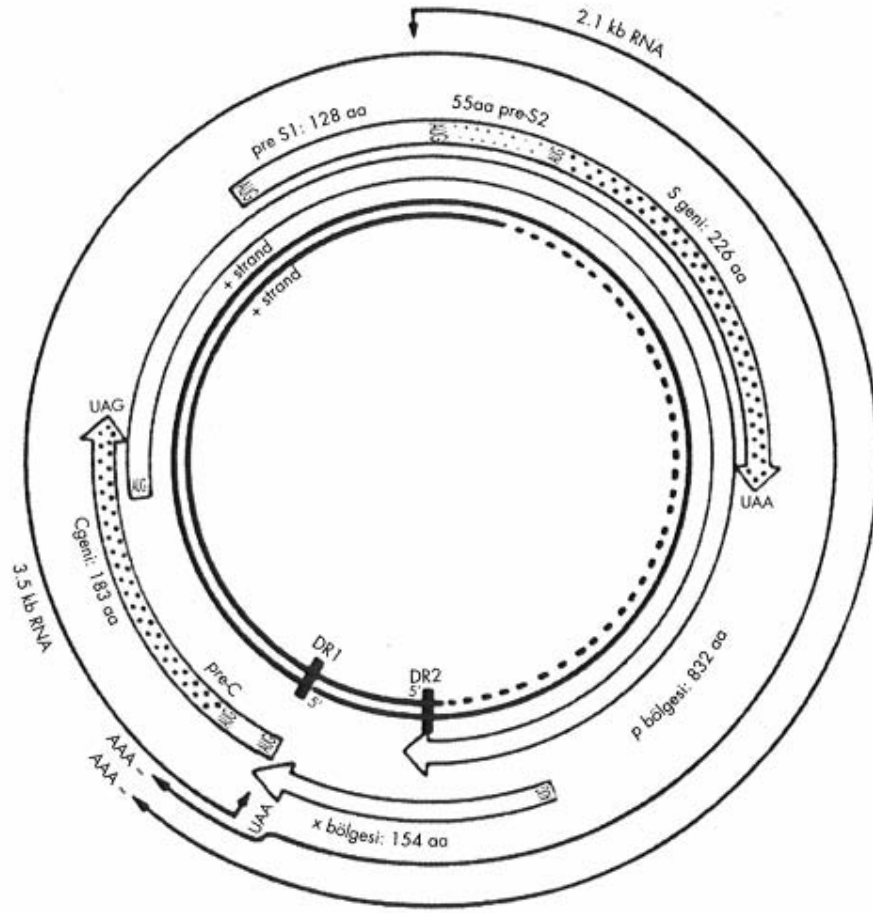
Şekil 2.1.: Elektron mikroskobunda HBV'nin Dane parçacığı, tübüler ve küresel farklı HBsAg içeren diğer iki parçacığının görülmesi (5).



Şekil 2.2.: İnfeksiyöz Dane parçacığının yapısı (5).

2.1.2.2. Genomun Yapısı

Hayvan virusları içinde en küçük genoma sahip HBV'nin genomu 3200 baz çifti (bp) içermektedir (Şekil 2.3.). Sirküler yapıdaki bu genom kısmen çift sarmallıdır. Negatif polariteli iplikçik tam bir halka oluşturur, pozitif polariteli iplikçik ise daha kısadır ve değişken uzunlukta bulunur. Negatif ve pozitif iplikçiklerin 5' ucundaki hidrojen bağları onları bir arada tutar. Her iki iplikçik üzerinde "Direct repeats 1" (DR1) ve "Direct repeats 2" (DR2) olarak tanımlanan 10-12 nükleotidlik benzer diziler bulunur. Negatif iplikçik'in 5' ucunda kovalent olarak bağlanmış viral polimeraz ve pozitif iplikçik'in 5' ucunda kovalent olarak bağlanmış oligonükleotid formda ribonükleik asit (RNA) bulunur. Viral genomun bu yapısı gevşek sirküler DNA (relaxed circular-reDNA) olarak adlandırılır (1).



Şekil 2.3.: HBV'nin genetik haritası (1).

HBV, proteinleri sentezlerken aynı genomik dizileri, kayan çerçeveler esasına göre farklı açık okuma çerçeveleri (Open Reading Frame-ORF) 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 (1).

Genom içerisinde bu proteinleri kodlayan genler şunlardır:

S Geni: Büyük (39 kD), orta (31 kD) ve küçük (24 kD) yüzey proteinlerini kodlar. S geni pre-S1, pre-S2 ve S bölgelerini içerir. HBsAg kodlar. Bu gende meydana gelen mutasyonlar sonucunda aşı ile elde edilmiş immün cevaba duyarsız varyantlar karşımıza çıkmaktadır.

C Geni: Pre-kor (preC) ve kor (C) bölgeleri bulunur. İki ayrı protein sentezletir. Bunlar 21 kD'luk çekirdek proteini (HBcAg) ve 30 aminoasitlik preC ürününü taşıyan

16 kD'luk infektivite proteinini (HBeAg) kodlar. Bu gende meydana gelen mutasyonlar sonucunda HBeAg sentez blokajı ve HBeAg (-) kronik HB enfeksiyonları karşımıza çıkmaktadır.

P Geni: DNA polimeraz, revers transkriptaz (rt) ve ribonükleaz (RNaz H) aktivitesine sahip olan viral polimeraz enzimini kodlar. Bu gende meydana gelen mutasyonlar sonucunda genel anlamda tedaviye ve antiviral ilaçlara karşı direnç gelişmektedir.

X Geni: X proteinini kodlar. HBxAg ile ilişkilidir viral transkripsiyonu transaktive eden faktör olup HSK'dan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu gende meydana gelen mutasyonlar sonucunda HBV protein sekresyonlarının baskılanması etkilenir.

Bu gen bölgelerinden viral komponentlerin sentezi, dört ayrı mRNA aracılığıyla olur. Bunlar:

1- 3.5 kb'lık mRNA: Negatif polariteli iplikçikten sentezlenir, hem genom replikasyonu için kalıp görevi görür hem de prekor/kor ve polimeraz proteinlerini sentezletir.

2. 2.4 kb'lık mRNA: Üç ayrı başlangıç kodonunu içerir. Amino terminalindeki başlangıç kodonunda başlayan sentez ile preS1, preS2 ve S proteinlerini içeren L yüzey proteinini oluşturur. M yüzey proteini ise ikinci okuma kodonundan başlayarak sentezlenir, preS2 ve S proteinlerini içerir. S proteini en küçük protein olup üçüncü başlangıç kodonundan başlayarak sentezlenir.

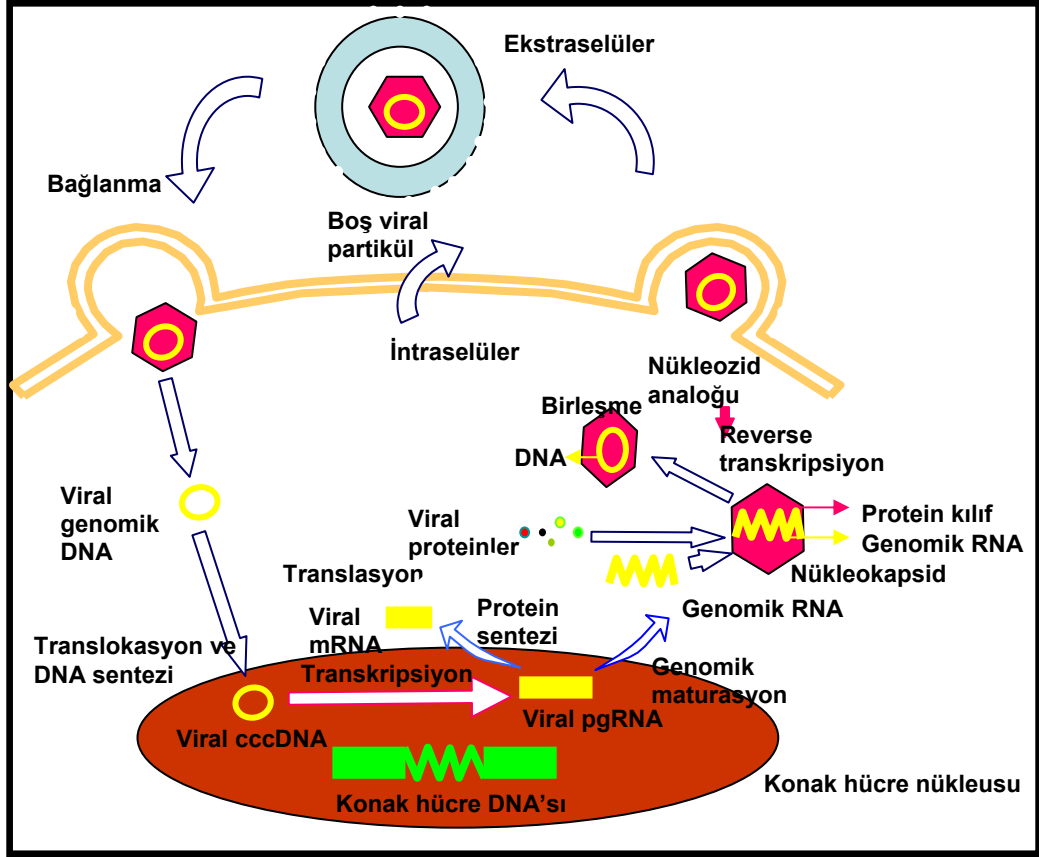
3- 2.1 kb'lık mRNA: preS2 ve S proteinlerini sentezletir.

4- 0.7 kb'lık mRNA: X proteinini sentezletir (1, 7, 8).

2.1.2.3. Virusun Replikasyonu

HBV'nin plazma yarı ömrü 24 saat olup günlük virion üretimi 10^{11} kadardır. Prodüktif infeksiyon çok kısıtlı hücrede gerçekleşir, HBV'nin tek kanıtlanmış infeksiyon bölgesi hepatositlerdir. Safra kanalı epitelyum hücreleri, böbrek ve lenfoid dokular da replikasyon bölgesi olabilir fakat hepatosit dışındaki replikasyon bölgelerinin viral patogenezdaki rolü henüz tartışmalıdır. Lenfositlerdeki replikasyon, viral persistans için ikincil bir rezervuar olabilir (8).

Viral replikasyon; pregenomik RNA (pgRNA) aracısını kullanarak revers transkripsiyonla rcDNA sentezlenmesi basamaklarını içerir (1) (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4.: HBV'nin replikasyonu (9).

Virusun hücre içine girmesi ve çekirdekte çift iplikçikli DNA'nın tamamlanması: Viral tutunma ve hücre içine giriş için hepatosit reseptörü ve virusun preS proteini etkileşir. PreS1 proteininin 3–77 nci aminoasitleri viral infektivite ile ilişkilidir. PreS2, ayrıca albumine bağlanır ve hepatosite bağlanmada albumini aracı olarak kullanır.

Viral tutunmayı takiben membran füzyonu ile nükleokapsid sitoplazmaya girer, pasif difüzyon veya tübüler taşıyım ile çekirdeğe taşınır.

Viral replikasyonun başında polimeraz enzimi rcDNA'sının tamamlanmasında rol oynar. Negatif ipçiğin 5' ucuna tutunmuş olan viral polimeraz, pozitif ipçiğin 5' ucuna tutunmuş olan kısa RNA dizisinden başlayarak pozitif ipçiği tamamlar. Oluşan kovalent bağlarla kapanmış sirküler DNA (covalently closed circular DNA-cccDNA)

viral pgRNA için kalıp görevi gördüğünden infeksiyonun başladığını gösterir. Virus infeksiyonundan 24 saat sonra karaciğerde cccDNA gösterilmiştir (1, 7, 8).

Pregenomik ve subgenomik RNA'ların sentezi: Çekirdekte hücresel RNA polimeraz II enzimi kullanılarak cccDNA'dan, mRNA'lar sentezlenir. "Kor promoter" bölgesi viral replikasyonun merkezidir ve negatif iplikçikten pgRNA olarak adlandırılan 3,5 kb'lik en büyük RNA'yı sentezletir. Sentezlenen mRNA'lar sitoplazmaya taşınarak translasyona uğrar ve viral proteinler sentezlenir (1, 7, 8).

Viral kapsidin sentezi ve genomun replikasyonu: pgRNA önce 200–300 molekül çekirdek proteini sentezletir, sonra polimeraz sentezine izin verir, sentezlenen polimeraz kendi mRNA'sının 5' ucuna bağlanarak revers transkripsiyonu başlatır ve aynı anda çekirdek içine yerleşir. Polimerazın sentezlenmesi pgRNA sentezlenmesini durdurur. pgRNA'nın 5' ucundaki enkapsidasyon dizisi (e-dizisi) adı verilen nükleotid dizileri, viral polimeraz enzimini bağlar ve viral kapsidin yapımı başlar. Çekirdek proteinleri ikişer ikişer bir araya gelir, disülfid bağları ile stabilize olur ve bu birimlerden 120 tanesi bir araya gelerek ikozahedral kapsidi oluşturur. Enkapsidasyon dizisi taşıyan pgRNA'lar kapsid içine yerleşir ve pgRNA'dan revers transkripsiyon ile negatif DNA ipçığının sentezi, viral çekirdek içinde, sitoplazmada gerçekleşir. Negatif DNA sentezlendikten sonra viral polimerazın RNazH aktivitesi ile pgRNA yıkılır ve DNA polimeraz aktivitesi ile 5' ucundaki RNA primeri kullanılarak pozitif iplikçik sentezlenir. Pozitif iplikçik sentezi için negatif ipçığın 5' ucundaki DR1 bölgesindeki primer, DR2 bölgesine taşınır ve pozitif iplikçik sentezi buradan başlar. Her iki ipçığın 5' uçları bu yüzden farklıdır. Pozitif ipçığın sentezi tamamlanmaz ve eksik kalır. Her iki iplikçik 5' ucundan bağlanarak rcDNA sentezi tamamlanmış olur (7, 8).

Diğer proteinlerin sentezi: Zarf ya da yüzey proteinleri, 2.1 ve 2.4 kb'lık subgenomik mRNA'lardan sentezlenirler. Yüzey proteinleri, nükleokapsidin zarfını kazanması için gereklidir. Her üç yüzey proteini de glikozillenmiştir ve Dane partikülünde yer alırlar. Büyük ve orta yüzey proteinleri Dane partikülünde eşit miktarda bulunur ve tüm yüzey proteinlerinin %30'unu oluştururlar. Küçük yüzey proteini ise Dane partikülünden 100 kat daha fazla sentezlenir ve infekte hücreden salınır. İnfekte kişilerde kana salınan ve fazla bulunan sferik ve filamentöz partiküller antikorlarla kompleksler oluşturur ve hastalık sırasında görülen immün kompleks sendromlarına yol açarlar. Büyük hücre proteini ise hücreden salınmaz ve aşırı sentezlendiğinde karaciğerde "buzlu cam hücreleri" görüntüsünü oluştururlar. HBV replikasyonu sırasında endoplazmik retikulum (ER) zarına transmembranöz olarak

yerleşen büyük yüzey proteininin iç kısımda kalan dizileri, virusun infekte edeceği hücre için reseptör görevini üstlenir (8).

İnfektivite proteini (HBeAg): Kor proteinini sentezleten başlangıç kodonundan daha önce yer alan diğer bir başlangıç kodonundan başlayarak preC+C proteini sentezlenir. ER’de konak proteazları proteinin karboksi terminalini ayırır ve HBeAg oluşur. HBeAg’nin tam fonksiyonu bilinmemektedir ve replikasyon için gerekli değildir. HBcAg ile çapraz immün reaktivitesi nedeni ile konak immün yanıtını, virusla infekte hücrelerden uzak tuttuğu düşünülmektedir. HBeAg sentezleyemeyen mutant viruslarla oluşan infeksiyonlarda daha ağır hepatik hasar görülmesi de bu şekilde açıklanabilir. HBeAg’nin fazla miktarda olması, aktif viral replikasyonu gösterir (1, 8).

X proteini: Doğal infeksiyondaki rolü tam olarak bilinmemesine karşın, virus replikasyonu için gereklidir. Viral genom transkripsiyonu için gerekli olan bu protein, aynı zamanda kronik infeksiyonda HSK gelişmesinden de sorumlu tutulmaktadır (1).

Zarfin kazanılması ve hücreden salınma: Viral çekirdek ER’den geçerken zarf ve yüzey proteinlerini kazanır. Zarfın kazanılması için büyük yüzey proteini gereklidir. L proteini ER zarfına yerleşir, zarfın iç kısmında kalan bölümleri çekirdek proteinleri ile bağlanarak tomurcuklanır. Her üç yüzey proteinini de içeren zarflı viruslar Golgi kompleksine taşınır. Burada S proteininin asparagin rezidüsü glikozillenir ve olgun virionlar veziküler transport ile hücre yüzeyine taşınarak salınırlar (10).

2.1.2.4. Subtip ve Genotipler

S proteininin tüm HBV kökenlerinde ortak olan “a” determinantından başka iki determinanti daha saptanmıştır. Bunlardan biri 122 nci aminoasitte olup “d” ya da “y” özgülüğünde, diğeri 160 ıncı aminoasitte ve “w” ya da “r” özgülüğündedir. Bu üç determinantın kombinasyonu ile adw, ayw, adr, ayr olmak üzere 4 ana serotip oluşur.

“w” determinantının 4 antijenik çeşitliliği ile de subtipler 8’e ulaşmıştır. Daha sonra “q” determinantının bulunmasıyla subtipler 9’a ulaşmıştır: Bunlar ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+, adrq- subtipleridir.

Monoklonal antikorlarla serolojik olarak ayırt edilebilen bu subtiplerin saptanması infeksiyon kaynağının belirlenmesi açısından önem taşır. Tüm HBV serotiplerinde ortak olan immünodominant “a” determinanti nedeni ile farklı serotiplerle reinfeksiyon nadirdir.

HBV S proteini determinantlarına göre ayrılan serotiplerinin yanı sıra, A'dan F'ye kadar gruplandırılmış 6 genotipi vardır. HBV serotipleri ve genotipleri arasında bir ilişki bulunmamaktadır. Genotip A, Kuzeybatı Avrupa ve A.B.D.'nde, genotip D Afrika, Akdeniz bölgesi ve Batı Asya'da, B ve C ise Doğu Asya'da saptanmıştır. F genotipi Güney Amerika'da saptanmış nadir bir genotiptir. G genotipi 2000 yılında tanımlanmıştır (1, 3).

Türkiye'de 54 KHB hastasının genotip tayininin yapıldığı bir çalışmada hastaların hepsinde D genotipi bulunmuştur. Ülkemizde görülen alt tip ise ayw olarak saptanmıştır (3) (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1.: HBV genotip ve alt tiplerinin coğrafik dağılımları (3).

Tip	Alt tip	Coğrafik Dağılım
A	adw, adw2, ayw1	A.B.D., Kuzey Avrupa, Orta Afrika
B	adw2, ayw1	Çin, Endonezya, Vietnam, Tayvan
C	adr, ayr	Akdeniz, Orta Doğu, Hindistan
D	ayw2, ayw3	Çin, Kore, Japonya, Vietnam
E	ayw4	Batı Afrika
F	adw4	Polonezya adaları, Güney Amerika
G	adw2	Avrupa, A.B.D. (nadir)

HBV genotiplerinin coğrafi dağılım dışında virulans farklılıklarının olduğu da düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, A genotipinin daha ağır infeksiyonlara neden olabileceği bildirilmiştir. B genotipinin 50 yaş altında HSK gelişimi ile C genotipinin daha ağır karaciğer hasarı ile ilişkisi bulunmuştur (7, 8, 11). Spontan HBeAg serokonversiyonunun B genotipinde, C genotipinden daha erken olduğu bulunmuştur (12, 13).

İnterferon (IFN) ve LAM'la daha önce yapılan bazı çalışmalarda genotip farklılığının tedaviye yanıtı etkilediği saptanmıştır. IFN alfa tedavisinin spesifik genotiplerden A'da D'den ve B'de C'den daha etkili olduğu gösterilmiştir (12, 13). LAM'ın, genotip A ve genotip D'de HBV'ye karşı daha az antiviral etkinliği olduğu bildirilmiştir (3, 14).

2.1.3. Patogenez

HBV infeksiyonunda karaciğer hasarının oluşmasında viral faktörlerden çok konak immün yanıtının rolü vardır. Yüksek düzeyde viral replikasyon gösteren fakat normal karaciğer enzim düzeyi ve histopatolojisine sahip olan kronik taşıyıcılar, virusun direkt sitopatik etkisi olmadığını göstermektedir. Ayrıca hücre kültürlerinde üretilen virusun, hücre canlılığı üzerine etkisi görülmemiştir. Yapılan araştırmalar virusun temizlenmesi ve karaciğer hasarının spesifik immün yanıtlara bağlı olduğunu göstermiştir. Akut infeksiyonda birçok viral antijene karşı MHC (CD4+ T ve CD8+ T) hücre yanıtları görülmektedir. CD4+ T hücre yanıtları özellikle kor ve polimeraz proteinlerine, daha az olarak da yüzey proteinlerine karşı gelişir. Virusun temizlenemediği kronik infeksiyonlarda CD4+ ve CD8+ T hücre yanıtları belirgin olarak azalmıştır, buna karşılık hem akut hem de kronik infeksiyonlarda humoral yanıtlar görülmektedir. Özellikle Tümör Nekrozis Faktör alfa (TNF- α) ve İnterferon-gamma (IFN- γ), HBV'nin temizlenmesinde etkili olmaktadır. Bu sitokinler iki ayrı yolu aktive ederek nükleokapsidlerin ve viral nükleik asidin yıkılmasını sağlamaktadırlar. Akut infeksiyonda, virüsü temizlemek için immün sistemin birçok kola aktive olduğu görülmektedir. Transaminazların yükseldiği dönemde, HBV proteinlerine karşı antikor sentezlenmeye başlanmış olmaktadır. Bunlar içinde en kritik olanı anti-HBs'dir. Sınırlı akut infeksiyon sırasında HBcAg, HBeAg ve HBsAg'ye karşı güçlü CD4+ T hücre yanıtları gelişmektedir (1, 7).

İyileşen akut HBV infeksiyonunda CD4+ T hücrelerinde Tip 1 sitokin yanıtı izlenmekte buna karşın kronik infeksiyonlarda Tip 2 sitokin yanıtı oluşmaktadır. Kor, zarf ve polimeraz proteinlerinin birçok epitopuna karşı olan bu CTL yanıtı, virusun temizlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Fakat karaciğer gibi solid organlarda bu yanıtlardan çok, sitokinler virusun temizlenmesini sağlamaktadır. TNF- α , HBV mRNA'sının yıkımını hızlandırır, ayrıca "kor promoter" TNF- α , IFN- γ ve IFN- α 'ya duyarlıdır ve bu sitokinlerin varlığında inhibe olmaktadır. HBV spesifik CTL'ler karaciğerdeki doku hasarından da sorumludur, CTL infekte hepatositi tanıyınca apoptotik sinyal gönderir ve hepatositin ölümüne neden olur. Biyopsi örneklerinde apoptotik hepatositler asidofilik "Councilman cisimcikleri" olarak görülür. CTL'ler sitokinler aracılığıyla bölgeye makrofaj ve Natural Killer (NK) hücrelerini çağırır. Fazla HBsAg eksprese eden olgularda bunun sonucunda fulminan hepatit gelişmektedir (1, 15).

2.1.3.1. HBV İnfeksiyonunda İmmun Yanıttan Kaçma Mekanizmaları

Gizli bölgeler ve antijenik özelliğin kaybı: HBV karaciğerin sıkışık parankiminde CTL saldırısından kaçabilir, ayrıca virusun prekor/kor genlerinde oluşan mutasyonlarla HBeAg sentezi durmakta ve virusa karşı oluşan immün yanıtlar oldukça zayıflamaktadır.

Antikorlardan kaçma: Yüzey antijenlerinde “a” determinantlarında meydana gelen mutasyonlar, bu bölgeye karşı oluşmuş antikorların nötralizan etkisinden kaçabilmektedirler.

Antijen işlenmesi ve T lenfosit sunumun etkilenmesi: Viral antijenlerde değişikliğe yol açan mutasyonlar, bu antijenlerin MHC antijenlerine bağlanmasını ve T hücre resptörü (TCR) ile bağlanma özgülüğünü etkiler. HBc proteininde meydana gelen bazı mutasyonların, T hücre tanınmasını engellediği ve hatta farklı bağlanma bölgeleri nedeniyle değişik T hücre klonlarını aktive ederek immün yanıtı antagonize ettiği gösterilmiştir.

Aktive T hücre yanıtlarını değiştirilmesi: Virus yükünün çok fazla olduğu durumlarda, uzun süreli maksimal T hücre uyarısı, T hücrelerinde yanıtızsızlığa veya apoptozis sinyaline neden olabilir. Bu durumda, subdominant epitoplarda uyarılan T hücreleri enfeksiyonu kontrol etmeye çalışır. Fakat bu yanıt yeterli olmadığından kronik enfeksiyon meydana gelir.

İmmun yanıtı değiştiren viral proteinler: HBcAg, IFN- β transkripsiyonunu inhibe etmektedir (1, 16).

2.1.4. Mutasyon Türleri

1- Nokta mutasyonları: Bir nükleotidin yerine diğer bir nükleotid geçmektedir.

a) Transiyon: Bir pürin yerine diğer pürinin veya pirimidin yerine pirimidinin geçtiği en sık rastlanan mutasyonlardır.

b) Transversiyon: Pürinin pirimidin ile değiştiği veya tersinin görüldüğü nokta mutasyonlarıdır.

2- Yeniden düzenlenme mutasyonları (rearrangements): Büyük bölgeleri ilgilendirir. İnsersiyon veya delesyon şeklinde olabilir. Translokasyonlar ve inversiyon'lar da bu grupta incelenir.

3- *Frameshift mutasyonlar*: Tek bir nükleotidin insersiyon veya delesyonu ile okuma alanında değişiklik meydana gelmesidir (17).

2.1.5. Hepatit B Virus Mutantları

Kısmen çift sarmallı bir DNA virusu olan HBV, yaşam siklusu sırasında pregenomik RNA'dan revers transkripsiyonla rc-DNA'ya dönüşür. Her ne kadar hızlı replikasyon yeteneğine sahip bir virus olarak bilinse de; reverse transkriptaz enziminin ilk okuma yeteneğindeki zayıflık nedeni ile, bu aşamada nükleotid yerleşiminde yanlışlıklar meydana gelmekte ve sonuçta genom yapısında moleküler düzeyde küçük mutasyonel değişimler ortaya çıkmaktadır.

Klinik seyir, tedavi ve korunma açısından önemli sorunlar yaratan bu duruma tahmin edilenden daha sık rastlanmaktadır. Deneysel olarak HBV'nin mutasyon hızı her infeksiyon yılında 10.000 bp için 1 nükleotid olarak hesaplanmıştır. İnfekte bireylerde her yıl HBV'nin tek bir lokusunda $1.4-3.2 \times 10^{-5}$ mutasyon olabileceği hesaplanmıştır. HBV uzun yıllar kronik olarak kaldığından, mutant kökenler zaman içinde birikmekte ve popülasyona hakim olmaktadır. Bunun yanında antiviral tedavi verilmesi “wild type” virusa göre, replikasyon üstünlüğü olan mutant virusların seleksiyonu daha hızlı olmaktadır (1).

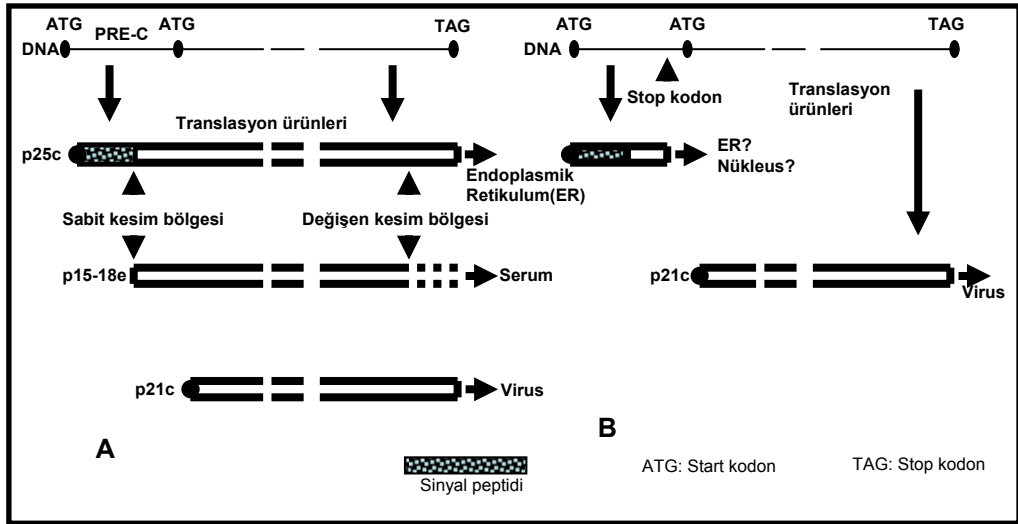
HBV ile infekte olgulardan elde edilen değişik suşlar üzerinde yürütülen çalışmalar; genom üzerindeki herhangi bir yerde (S, pre C/C, X, P, promoter ve enhancer) ortaya çıkabilen bu mutasyonların;

- a- Tek bir taban bazınının değişimi (nokta mutasyonu)
 - b- Bir veya daha fazla sayıda nükleotidin silinmesi
 - c- Aynı sekansın düz veya ters biçimde tekrar edilmesi
 - d- Nükleotid sekanslarının yeniden düzenlenmesi
- gibi farklı genetik mekanizmalarla oluştuğunu göstermiştir (18).

Aktif bağışık cevap varlığına rağmen virusta meydana gelen genetik değişiklikler mutant suşun hayatiyetini devam ettirmesine imkan sağlamakta; bu durum tanıda karışıklıklara; aşı çalışmalarında ise başarısızlıklara yol açmaktadır. Bu nedenlerle HBV mutantlarının önemi her geçen gün biraz daha artmaktadır.

2.1.5.1. Prekor/Kor Geni Mutasyonları

Prekor bölgesinde görülen en önemli mutasyon HBeAg'nin üretilmemesi ile karakterize olan stop kodon oluşumudur. Normalde prekor bölgesinde stop kodon bulunmaz ve prekor bölgesinin başlangıç kodonundan başlayan sentez işlemi kor bölgesinin start kodonu ile devam eder. Eğer prekor bölgesinin 1896 ncı nükleotidindeki guaninin (G) yerine adenin (A) gelirse triptofan kodonu da denilen kodon 28 (TGG), stop kodon (TAG) haline gelir ve HBeAg'nin prokürsör proteini (p25) oluşamaz. Söz konusu nokta mutasyonu kor bölgesinin start kodonundan önce meydana geldiğinden ve HBeAg ile HBcAg farklı mRNA moleküllerinden sentezlendiğinden HBeAg üretilemez ancak HBeAg'nin sentezi devam eder (18) (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5.: HBeAg (+) ve HBeAg (-) HBV'de Prekor/Kor ürünlerinin translasyonu (18).

HBV replikasyonu için HBeAg translasyonu gerekli değildir. Yapısal gen bölgesi olmayan prekor alanında ortaya çıkan mutasyonlar viral replikasyonu etkilemez aksine replikasyon yeteneğine sahip HBeAg (-) mutantların ortaya çıkmasına neden olur. Aynı gen bölgesi tarafından sentezlendikleri için HBeAg ile HBcAg arasında yüksek oranda homoloji vardır ve ortak immünolojik determinantlara sahiptirler. Her iki molekülde sitotoksik cevapta hedef molekül özelliğindedir. HBeAg sentezleyemeyen mutant suş muhtemelen konağın sitotoksik cevabından kaçarak hayatiyetini sürdürür;

üstünde HBeAg bulunan hepatositler anti-HBe'nin de etkinliği ile bir süre sonra lizise uğrar ve sonuçta HBeAg(-) mutant suş dominant hale gelir. Ancak akut HBV infeksiyonunun doğal seyri sırasında bu mutantların dominant hale gelmesi olağan değildir. HBeAg(+) virus, genellikle infeksiyonun erken dönemlerinde bulunur.

Prekor mutantlarının varlığı asemptomatik HBV taşıyıcılarında, kronik HBV'li olgularda, ciddi karaciğer hastalığı olanlarda ve fulminant hepatitli hastalarda gösterilmiştir. Yapılan birçok araştırmada kronik HBV'nin seyri sırasında ortaya çıkan HBeAg(-) vireminin hepatosellüler hasarı arttırdığı ileri sürülmüş ve prekor/kor mutantlarının fulminant hepatit ile hızlı progresyon gösteren kronik hepatit oluşumunda rol oynayabileceğine işaret edilmiştir.

Kor promoter/enhancer II alanındaki (nt. 1634–1782), nokta mutasyonları kısa delesyonlar veya insertiyonlar sonucunda pre-mRNA transkripsiyonunda azalma, C-mRNA'da artış meydana gelmekte; HBeAg sentezi iptal olurken kor ve pol proteinlerinin üretimi artmakta ve sonuçta viral partiküller daha fazla oluşmaktadır. Bu bölgede en sık tanımlanan nokta mutasyonları AT'den zengin ilk bölgeyi (nt.1758-1762) etkileyen A1762T ve G1764A mutasyonlarıdır (18).

Bhat ve arkadaşları (18), 1990 yılında HIV ile infekte homoseksüel bir hastanın, HBsAg ve HBeAg (+), anti-HBc seronegatif olduğunu tespit etmişler, HBV DNA üzerinde yaptıkları incelemeler sonucunda prekor bölgesinde 36 bp'lik yer değiştirme yanında prekor ve kor genlerinde iki nokta mutasyonu bulunan yeni bir varyant tanımlamışlardır. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar ile kor-kor promoter bölgelerinde çeşitli değişiklikler bulunan yeni mutantların varlığı gösterilmiş ve kodon 84–101 arasındaki mutasyonların ciddi karaciğer hasarı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (19, 20).

Kor bölgesi ile ilgili mutasyonlar sıklıkla immünolojik olarak seçime uğradığı düşünülen T helper ve B hücre epitoplarında ortaya çıkar. Ancak CD8+CTL epitopunda da (aa18-27) mutasyonlar tanımlanmıştır. Kor bölgesinin T helper epitopu içinde yer alan aminoasit 12 pozisyonundaki treonin (Thr)'in serin (Ser) ile yer değiştirmesi, HBV'nun CD4+T hücre cevabından kaçmasını sağlamaktadır. Thr/Ser mutasyonunun sadece Akdeniz ülkelerinde görülmesi, bu tip mutasyonun daha çok konağa ait faktörlere bağlı olarak meydana geldiğini düşündürmektedir (18).

Kor promoter mutasyonları, prekor mutasyonları ile birlikte veya bunlar olmadan da ortaya çıkabilir. HBV DNA üzerindeki kor promoter, X geninin 3' terminalinde yer alır ve 3.5 kb'lık mRNA'nın (pregenom-kor/polimeraz mRNA)

transkripsiyonunu kontrol eder. Bu mRNA pregenom gibi davranarak kor proteini ve DNA polimeraz-rt'nin sentezinde rol oynar. Kor promoter aynı zamanda HBeAg prokürsörünü kodlayan ve biraz daha uzun olan 3.5 kb'luk mRNA (prekor mRNA)'nın transkripsiyonunu da kontrol eder (18).

Bu nedenle kor promoter'da ortaya çıkan mutasyonlar hem RNA (pregenom-kor/polimeraz mRNA veya prekor mRNA) hem de bunların gen ürünlerinin ekspresyonunu etkiler. Oysa spesifik mutasyonlarda sadece bir tip mRNA'nın transkripsiyonu etkileneceğinden ya tek başına HBeAg'nin üretimi durur ya da kor proteinleri ile DNA polimerazın üretimi bloke olur. HBV kor promoter'undaki iki komşu mutasyonun (nükleotid 1768'de C yerine T ve nükleotid 1770'de T yerine A geçmesi) pregenomik RNA transkripsiyonunda minör artış (yaklaşık 2-3 kat) ve bu transkripsiyondan bağımsız olarak viral enkapsidasyonda majör artışla (on katdan daha fazla) sonuçlandığı ve ortaya çıkan mutantın fulminant hepatit ile yakından ilişkisi olduğu bildirilmiştir (19).

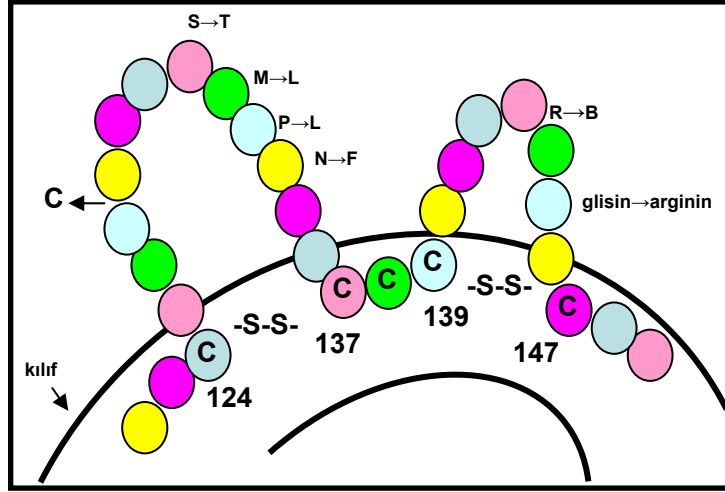
2.1.5.2. S Geni Mutasyonları

HBV kılıf varyantları ile ilgili olarak tanımlanan ilk önemli mutasyon; allellerdeki subtip determinant çiftlerinde (d/y veya w/r) saptanmıştır. Yapılan incelemeler bu immünolojik farklılığın esas olarak nükleotid 519 ve nükleotid 633'deki değişiklikten kaynaklandığını ortaya koymuştur. Sentez sırasında nükleotid 519'daki değişime bağlı olarak HBsAg'nin 122 nci aminoasidinde bulunan lizinin (Lys) arginin (Arg) ile yer değiştirmesi durumunda "d" determinanti "y" determinantına dönüşmekte; aynı şekilde nükleotid 633'ün sorumlu olduğu 160 ıncı aminoasitteki lizinin yerine arginin geçmesi "w" determinantının "r" ye dönmesine sebep olmaktadır. Her ne kadar klasik HBsAg subtiplerinde (adw, adr, ayw, ayr gibi) "a" determinanti ortak olmak şartıyla en az iki farklı determinant daha bulunursa da nadiren bu determinantlardan biri kaybolabilmektedir. Örneğin "adw" subtipinde 160 ıncı aminoasitte yer alan lizin "w" özgülüğü sağlamaktadır. Ancak bunun yerine asparagin (Asn) gelmesi ile bu özgülük kaybolmakta, sonuçta "ad" subtipi ortaya çıkmaktadır. Bu duruma bir diğer örnek "adr" subtipindeki "d" determinantının kaybolması ile oluşan "ar" subtipidir. Aminoasit 122 pozisyonundaki lizinin yitirilmesi ile iki değişik "ar" subtipi meydana gelmektedir.

Bunlardan ilkinde 144 üncü aminoasitteki aspartik asit, glutamik asitle diğesinde 145 inci aminoasitteki glisin (Gly) alanin (Ala) ile yer değiştirmiştir (18).

HBsAg fenotipleri arasında farklı coğrafi dağılımlar görölse de subtip değişikliğinin infeksiyonun doğası üzerinde herhangi bir etkisi yoktur. Tüm subtiplerde "a" determinantı ortak olduğundan ve bu bölgeye karşı oluşan antikorlar HBV'nun hepatositlere bağlanmasını engellediğinden; ister aşı, isterse doğal infeksiyonun geçirilmesi ile herhangi bir subtipten karşı gelişmiş olan humoral bağışık yanıt tüm serotiplere karşı koruyuculuk sağlar. Fakat "a" determinantındaki değişiklik hallerinde klasik HBsAg subtiplerine karşı meydana gelen antikorların koruyucu özelliği kalmaz. Konağın humoral immünitesinden kaçış mutasyonları genellikle sitotoksik lenfosit aktivitesinin olmadığı ancak yüksek antikor seviyeleri ile baskı altında tutulan, ileri derecedeki antijenik bölgelerde görölür. HBV kılıfı üzerinde bu duruma en uygun bölge 124-147 nci aminoasitler arasında yer alan "a" determinantıdır. Yapısında yedi adet sistein (Cys) bulunan ve sisteinler arası intramoleküler disülfid bağları sayesinde virion dışına doğru çıkıntı yapmış iki kıvrım halindeki bu bölgenin dominant humoral bir epitopta bulunması gereken tüm özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. "a" determinantlarının tam bir antijenik yapı gösterebilmesi için 142 nci pozisyonda prolin bulunması gerekmektedir (şekil 2.6.).

Aşı ile ilişkili ilk kaçak mutant 1988 yılında İtalya'da görölmüştür. HBeAg (+) anneden doğduğu için pasif ve aktif immünizasyon uygulanan bir bebeğin yeterli düzeyde anti-HBs'ye sahip olduğu halde bir süre sonra HBsAg ve HBeAg (+) hale geldiği ve kronik hepatit geliştiği saptanmıştır. Anne ve çocuktan elde edilen HBsAg epitopları ile "monoklonal anti-a" antikorları karşılaştırıldığında çocuktan alınan HBsAg epitoplarının anti-a'ya annesinininkinden daha az bağlandığı saptanmıştır. Yapılan sekans analizleri sonucunda anneye ait "a" determinantının 145 inci pozisyonunda glisin bulunduğu halde çocuğununda arginin bulunduğu ortaya konmuştur. Normalde 587 nci nükleotidde bulunan taban bazı guanin (G)'dir ancak mutant suşlarda guanin, adenin (A) ile yer değiştirmekte, sonuçta GGA (glisin) yerine AGA (arginin) sentezlenmektedir. Bu durumda klasik HBsAg subtipleri ile hazırlanan aşıların koruyuculuğu yeterli olmamaktadır (18).



Şekil 2.6.: Aşıdan sonra HBsAg'nin "a" determinantında bildirilen bazı mutasyonlar (Sistein molekülleri arasındaki disülfid köprüleri ile çift loop konformasyonu gösteren "a" determinantı HBsAg'nin 124-147 nci aminoasitleri arasında bulunur) (18).

Korunma amacıyla "monoklonal anti-a" veya "poliklonal anti-HBs" verilen karaciğer transplanthlı bazı hastalar bir süre sonra aktif viral replikasyon göstergesi olan HBV DNA açısından tekrar pozitif hale gelmiş; yapılan incelemeler sonunda bu olgularda 145 inci aminoasitte glisin-arginin mutasyonu ve S proteininin diğer pozisyonlarında (137, 142, 144, 146) da mutasyonel değişiklikler olduğu saptanmıştır.

Kılıf geni ile ilgili mutasyonlar, daha az sıklıkta, pre-S1 ve pre-S2 bölgelerinde de (bir sekansın silinmesi, yer değiştirmesi veya yeniden düzenlenmesi şeklinde) ortaya çıkabilmektedir. Anti-HBs ve HBsAg'nin birlikte pozitif olduğu kronik hepatitli bir hastada pre-S2 bölgesinin 9-22 nci aminoasitleri arasında 14 aminoasitlik kısmın silindiği ve "a" determinantının ilk kıvrımında üç, ikinci kıvrımında ise bir aminoasidin yer değiştirdiği bir mutant tanımlanmıştır (7, 18).

HBV yüzey geni mutantları çok çeşitli olup infeksiyöz ve patojendir. HBsAg'nin "a" determinantındaki mutasyonların immünoproflaksi uygulanan taşıyıcılarda ortaya çıktığına işaret edilmiş ve aşılamanın güçlü bir humoral yanıt oluşturmasına karşın T hücre sitotoksik yanıtı oluşturmadığı; oysa HBV ile doğal infeksiyon sonucunda gelişen humoral bağışıklığın CTL yanıtı ile birlikte olduğuna dikkat çekilmiş, bu tip mutantların aşı ile indüklendiği ileri sürülmüş ve bunlara "aşı ile indüklene kaçak mutantlar" adı verilmiştir. Ancak "a" determinant mutantlarına aşısız taşıyıcılarda da rastlanmıştır (21).

2.1.5.3. P Geni Mutasyonları

Son yıllarda diğer viral hastalıkların tedavisi için geliştirilmiş olan gansiklovir, LAM ve famsiklovir (FAM) gibi pek çok antiviral ilaç, günümüzde HBV replikasyonunu inhibe etmek amacıyla da kullanılmaktadır. Bu ajanlar her ne kadar HBV replikasyonunu baskılamakta oldukça etkili iseler de uzun süreli kullanımlarından sonra ilaca dirençli HBV suşları ortaya çıkmaktadır. Şu ana kadar ilaca bağlı en iyi tanımlanmış HBV mutantları LAM'a dirençli olanlardır ve bunlar HIV suşları ile aynı mutasyona sahiptirler (18).

LAM ile tedavi sırasında P geninde pek çok mutasyon gösterilmiş ve bunlardan üç tanesinin ciddi LAM direncine neden oldukları saptanmıştır. Polimeraz enziminin C katlantısındaki tirozin (Y), methionin (M), aspartat (D) ve aspartat (D) aminoasitlerinden YMDD motifi, methioninin izolösine veya valine değişmesi (rtM204I veya rtM204V), B katlantısındaki lösinin methionine değişmesi (rtL180M), valinin lösinine değişmesi (rtV173L), lamuvidin direncinden sorumlu tutulmaktadır (22) (Çizelge 2.2.).

YMDD mutantları 6 aydan kısa süreli veya hiç tedavi almayanlarda gösterilememiştir. Tedavi süresi uzadıkça mutant viruslar seçilmekte ve popülasyona hakim duruma geçmektedirler. Diğer iki P geni mutasyonu tek başlarına görülmemekte, YMDD mutasyonundan sonra gelişmektedirler.

YMDD mutasyonları S genini de etkilemekte ve 529 uncu pozisyondaki alaninin threonine değişmesi, S geninde stop kodon oluşturmakta ve HBsAg sekresyonunun durmasına neden olmaktadır. Gene (rtV173L) mutasyonu da S geni 164 üncü kodonunda değişikliğe neden olarak HBsAg'ye karşı immün yanıtı etkilemektedir (1) (Çizelge 2.2.).

YMDD direnci LAM'ın yanında, FAM ve lobukavir gibi diğer rt enzim inhibitörlerine de direnç gelişmesine neden olur. FAM, YMDD mutasyonundan ziyade rt'nin B domaininde, rtV173L ve rtL180M pozisyonundaki mutasyonlara neden olmaktadır. Bu tip B domain yer değiştirmeleri, LAM tedavisini takiben YI/VDD ile ilgili olarak da tanımlanmıştır. Söz konusu mutant viral suşlar immünsuprese hastaların serumlarında daha yüksek titrelere ulaşmaktadır (22).

2.1.5.4. X Geni Mutasyonları

X gen bölgesi virusun replikasyonu ve ekspresyonu için çok önemlidir. Çünkü X proteini HBV genlerini transaktive etmekte ve kor promoter, enhancer II, DR1 ile DR2 bu bölgede yer almaktadır. Dolayısıyla burada ortaya çıkan mutasyonlar söz konusu yapıları da etkilemektedir (18):

a- HBxAg regülatör bir protein olup HBV genleri yanında farklı hücrel gen promoterlarının da transaktivite edebilme kapasitesindedir. Bu nedenle X-ORF'de meydana gelen nokta mutasyonları ve delesyonlar beklenenden daha az viral gen ekspresyonu ve replikasyonuna sahip bir fenotip oluşturur. Sonuçta HBV'na ilişkin serolojik göstergelerin çoğu veya tümü (-) bulunur.

b- X bölgesindeki mutasyonlar; replikasyon sırasında uzun ve kısa DNA iplikçiklerinin sentezinde önemli rol oynayan DR sekanslarının biri veya her ikisinde birden delesyonla sonuçlanabilir.

c- X-ORF'nin 3' delesyonları kor promoter'ı elimine eder. Ancak bu durumda kor polipeptidi; X promoter ve virus enhancer'in üst kısımlarında yapılmaya devam edebilir.

d- Normalde pre-C sekansındaki delesyonlar viral replikasyonu etkilemez. Fakat X bölgesindeki delesyon, pre-C bölgesi girişine kadar uzanır ise viral polimerazın pregenomik bağlanma alanları ve pregenomik paketlenme sinyalini etkileyebilir.

e- X bölgesinin orta kısmından yukarıya doğru uzanan delesyonlar polimeraz ORF'nin 3' ucunu da içine alır ve polimerazın kısmi delesyonu atenüasyona katkıda bulunur (18).

X geninde meydana gelen değişik mutasyonların fonksiyonel önemi tam olarak açıklığa kavuşmamış olmakla beraber bu tip varyantların infektiviteleri zayıf, replikasyon seviyeleri düşüktür. Kronik HBV enfeksiyonlu, HSK'lı, fulminant hepatitli ve sirozun son döneminde bulunan hastalarda X geni üzerindeki 130 uncu (AAG→ATG, lizin→methionin) ve 131 inci (GTC→ATC, valin→izolösin) kodonlarda nokta mutasyonları bildirilmiştir. Her iki mutasyonda transaktivasyon için gerekli olan ve genomun 132-139 uncu kodonları arasında yer alan enhancer II-kor promoter bölgesine lokalizedir. Nükleotid 1655'deki C'nin T ile yer değiştirdiği bir nokta mutasyonu da tanımlanmıştır. Nükleotid 1770-1777 arasındaki 8 nükleotidlik delesyonunun DNA ekspresyon ve replikasyonunu baskıladığı ve sonuçta HBsAg'nin (-) hale geldiği bildirilmiştir (Çizelge 2.2.).

HBx mutantları beklenen serolojik profilden sapmalar gösteren hastalar, anti-HBc (-) yüksek düzeyde viremik hepatitliler, renal diyalize giren bireyler ve çok kan transfüzyonu yapılan hastalarda da gösterilmiştir. Serolojik olarak sessiz nonB-nonC hepatitli olgulardan bu tip mutantların sorumlu olabileceği tahmin edilmektedir (18).

Çizelge 2.2.: RNA kodon tablosu (Bu tablo 64 kodonu ve her kodonun kodladığı aminoasitleri göstermektedir. Kodonların DNA'daki yönü: 5'→3' şeklindedir.) (23).

2. baz					
		U	C	A	G
1.baz	U	Fenilalanin (Phe/F) UUU, UUC Lösin(Leu/L) UUA, UUG	Serin (Ser/S) UCU, UCC, UCA, UCG	Tirozin (Tyr/Y) UAU, UAC UAA Ochre (<i>Stop</i>) UAG Amber (<i>Stop</i>)	Sistein (Cys/C) UGU, UGC Opal (<i>Stop</i>) UGA Triptofan (Trp/W) UGG
	C	Lösin (Leu/L) CUU, CUC, CUA, CUG	Prolin (Pro/P) CCU, CCC, CCA, CCG	Histidin (His/H) CAU, CAC Glutamin (Gln/Q) CAA, CAG	Arginin (Arg/R) CGU, CGC, CGA, CGG
	A	İzolösin (Ile/I) AUU, AUC, AUA Metiyonin, <i>Start</i> (Met/M)AUG	Treonin (Thr/T) ACU, ACC, ACA, ACG	Asparagin (Asn/N) AAU, AAC Lizin (Lys/K) AAA, AAG	Serin (Ser/S) AGU, AGC Arginin (Arg/R) AGA, AGG
	G	Valin (Val/V) GUU, GUC, GUA, GUG	Alanin (Ala/A) GCU, GCC, GCA, GCG	Aspartik asit (Asp/D) GAU, GAC Glutamik asit (Glu/E) GAA, GAG	Glisin (Gly/G) GGU, GGC, GGA GGG

2.1.6. Virusun Stabilitesi

HBV'nin inkübasyon süresi 6–25 hafta arasındadır (fiziksel ve histolojik belirtiler çıkmadan önce). HBV, serum içerisinde 30–32 °C'de saklandığında en az 6 ay, -20 °C'de ise 15 yıl infektivitesini kaybetmemektedir.

Çok yoğun olmayan virus eter ve asit (pH:2,4) etkisinde 6 saatte, 98 °C'de 1 dakikada veya 60°C'de 10 saatte infektivitesini yitirmektedir. Serum içerisindeki virusun infektivitesi doğrudan kaynatmakla 2 dakikada, 121 °C ve 0,5 atmosfer basınç altında 20 dakikada, 160°C'de kuru sıcak hava ile 1 saatte kaybolmaktadır.

500 ppm klor soluyonunda 10 dakikada, %0.1-2 sıvı gluteraldehid, %70'lik izopropil alkol, %80'lik etil alkolde 2 dakikada inaktive olduğu gösterilmiştir.

HBsAg içeren kan, plazma ve diğer kan ürünlerinin ultraviyole ışınlarına maruz bırakılmasının infektivite ve antijenik yapı üzerine etkisi yoktur. Kurutulmuş virus 25 derecede saklanınca bir hafta canlılığını korur (1).

2.1.7. Epidemiyoloji

2.1.7.1. Bulaşma Yolları

HBV temel olarak parenteral yolla, infekte kan ve sıvılarla perkutan ve mukozal temas, infekte kişiyle cinsel ilişki ve perinatal yolla bulaşmaktadır.

Perkutan (parenteral yol): HBV'nin bulaşmasında en önemli kaynak; enfekte bireylerin kanı ve vücut sıvılarıdır. İnfekte kan ve kan ürünleri nakli, damar içi uyuşturucu kullananlarda ortak enjektör kullanımı ve diğer ortak kullanılan kesici-delici aletler aracılığı ile bulaşma virusun en önemli bulaşma yoludur.

Cinsel yolla bulaşma: Taşıyıcıların cinsel salgılarında HBV bulunmakta ve cinsel eşlerinin mukozal giriş kapılarından girerek enfeksiyona neden olmaktadır. Özellikle yüksek ve orta endemisite bölgelerinde başlıca bulaşma yollarından biridir. Homoseksüeller en riskli gruplardan birini oluşturur.

Taşıyıcı anneden bebeğe bulaşma: Transplasental (in utero), perinatal veya postnatal anne sütü ile bulaşma olabilir. En sık doğum sırasında infekte kan ve salgılar aracılığıyla bulaşma olmaktadır. HBeAg (+) olan annelerden bulaşma daha yüksek orandadır.

Horizontal bulaşma: HBV'nün parenteral, perinatal ya da cinsel temasın gösterilemediği durumlarda görülür. Özellikle endemisitesi yüksek ve orta bölgelerde etkin bulaşma yollarından biridir. Kalabalık topluluklar halinde kötü hijyen ve düşük sosyoekonomik durumda yaşayanlar, mental özürülüler bu yolun risk grubunu oluştururlar. Bu bulaşma yolunun nedeninin kan, tükürük ve seröz sıvıların defektli ciltle teması sonucu olduğu kabul edilmektedir (1, 7).

Ülkemizde HBV'nün bulaşmasında dört bulaşma yolunun da etkin olduğu düşünülmektedir. Çocuklarla ilgili HBV bulaşma yollarına ilişkin ayrıntılı çalışmalar

yoktur. Erişkinlerde yapılan çalışmalarda ise HBV infeksiyonu olan olguların yaklaşık yarısında bulaşma yolu saptanamamıştır. Bu sonuç horizontal bulaşma yolunun, düşük sosyoekonomik düzey ve kalabalık yaşam koşullarına bağlı olarak ülkemizde etkin bir yol olduğunu göstermektedir.

2.1.7.2. Dünyada HBV İnfeksiyonu

Dünya nüfusunun yaklaşık %5'inde kronik HBV infeksiyonu vardır (300 milyon kişi). Her yıl yaklaşık 500 bin ile 1 milyon kişi HBV ile ilgili nedenlerden ölmektedir. HBV infeksiyonunun görülme sıklığı ve yaygın bulaşma şekli dünyanın farklı bölgelerinde değişiklikler göstermektedir. Buna göre dünya ülkeleri 3 gruba ayrılır:

1- Yüksek endemisite bölgeleri: Toplumda HBsAg pozitifliği %8'in üzerindedir. Dünya nüfusunun %45'i bu bölgelerde yaşar. Japonya ve Hindistan dışında kalan birçok Asya ülkesi, Amazon bölgesi, Pasifik adaları, Avustralya ve Yeni Zelanda yerlileri bu grupta yer alır. Bu ülkelerde hayat boyu HBV ile karşılaşma riski %60'tan fazladır.

2- Orta endemisite bölgeleri: HBsAg pozitifliği %2-7 arasında olup, Dünya nüfusunun %43'ü bu bölgelerde yaşar. Bu bölgelerde hayat boyu HBV ile karşılaşma riski %20-60 olup, infeksiyon tüm yaş gruplarında görülür. Kuzey Afrika ülkeleri, Ortadoğu ülkeleri, Türkiye'ninde içinde bulunduğu Akdeniz havzası, Doğu Avrupa ve Rusya orta endemisite ülkeleri arasında yer alır.

3- Düşük endemisite bölgeleri: Toplumdaki HBsAg pozitifliği %2'nin altındadır ve Dünya nüfusunun %12'si bu bölgelerde yaşar. A.B.D., Kuzey ve Batı Avrupa ülkeleri ve Avustralya düşük endemisite ülkeleridir. Bu ülkelerde hayat boyunca HBV infeksiyonuyla karşılaşma riski %20'den azdır. İnfeksiyonların çoğu erişkinlerde ve risk gruplarında görülür. Seksüel temas en önemli bulaşma yoludur. A.B.D.'nde kronik HBV prevalansı % 0.35, HBV ile karşılaşma oranı % 5'tir (1, 7).

2.1.7.3. Türkiye'de HBV İnfeksiyonu

Orta endemisite bölgesinde yer alan ülkemizde HBsAg pozitifliği %1-14.3 arasında bildirilmiştir. İstanbul ve İzmir gibi batı illerimizde %3-4.5 gibi daha düşük

oranda HBsAg pozitifliği gösterilirken Diyarbakır, Elazığ, Van gibi Güneydoğu ve Doğu Anadolu illerinden %8-14.3 gibi yüksek oranlar bildirilmiştir (1).

2.1.8. Klinik Belirti ve Bulgular

2.1.8.1 Akut İnfeksiyon

İnkubasyon dönemi alınan virus miktarı ve kişinin immünite durumuna bağlı olarak 45-180 gün olarak belirlenmiştir. Akut infeksiyon, asemptomatik infeksiyon, sarılıklı kolestatik hepatit nadiren de fulminan hepatit olarak farklı klinik tablolarda görülebilir. Virusun alınmasından 6 hafta sonra HBsAg ve diğer aktif viral replikasyon göstergelerinin pozitifleşmesiyle birlikte biyokimyasal testlerde bozulma ve klinik belirtiler ortaya çıkar (7).

2.1.8.2. Kronik İnfeksiyon

Akut infeksiyonu takiben, HBsAg pozitifliğinin 6 ayı geçmesi durumunda kronik HBV infeksiyonundan kuşulanılmalıdır. Böyle olgularda anti-HBs saptanamaz. HBV infeksiyonunun kronikleşmesi ile yaş ve immün sistemin durumu arasında sıkı bir ilişki vardır. Doğum sırasında infeksiyonu alan bebeklerde kronikleşme %80–90 oranındadır, 6 yaş altında olanlarda %30, erişkenlerde ise %5-10 civarındadır. Kronik infeksiyon riski, hemodiyaliz hastaları, organ transplantasyon alıcıları ve kemoterapi hastalarında yüksek olarak bulunmuştur.

Olguların çoğunda infeksiyon asemptomatiktir. Transaminazlar normal, karaciğer biyopsisinde normal histolojik yapı ya da portal alanda minimal mononükleer hücre infiltrasyonu görülebilir. Bu olgulara *kronik persistan hepatit* denir.

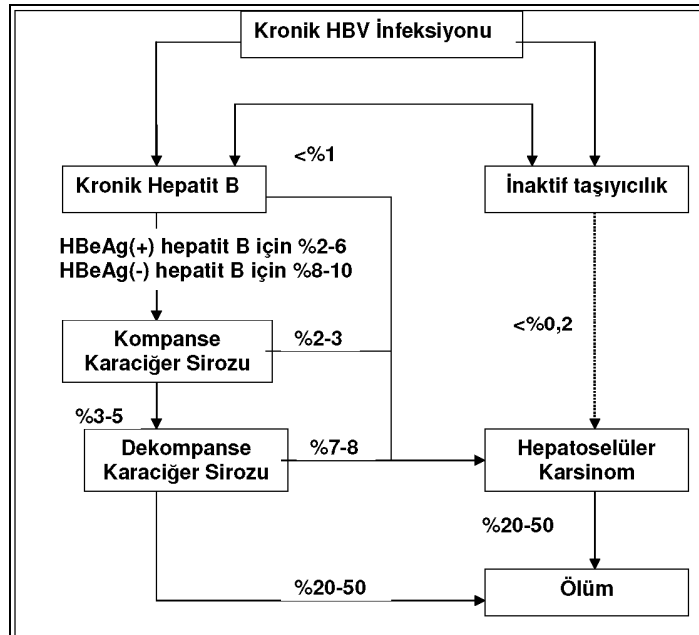
Olguların %25’inde ise orta-belirgin derecede karaciğer enzimlerinde yükselme ve biyopside “piecemeal” nekrozu, lobuler inflamasyon ve asidofilik “Councilman inklüzyon cisimcikler” görülür, böyle olgular da *kronik aktif hepatit* olarak adlandırılır. Kronik aktif hepatitte kliniğin ağırlığına göre değişen sürelerle, karaciğer sirozuna

ilerleme görülebilir. Siroz gelişiminden sonra 5 yıllık sağkalım oranı %50 olarak bildirilmektedir. Prognoz karaciğer hasarının derecesi ile ilişkilidir.

Olguların %50'sinde aktif viral replikasyon vardır ve serum aminotransferazları yüksektir, bunların %15-20'sinde 5 yıl içinde siroz görülür. Olguların her yıl %7-20'sinde HBeAg spontan olarak kaybolur ve bu karaciğer hastalığının alevlenmesi ile beraberdir. HBsAg yıllık %1-2 oranında spontan olarak kaybolur fakat bu hastalar, ömürlerinin sonuna kadar infekte kalırlar(1, 7, 8).

2.1.8.3. Hepatosellüler Karsinoma (HSK)

Dünyada her yıl 500.000 kişi HSK nedeniyle ölmektedir. HBV enfeksiyonu HSK gelişmesinde en önemli risk faktörü olarak kabul edilmektedir. HBV ile infekte kişilerde hayat boyu HSK gelişme riski %10-25 olup, enfeksiyonun başlamasından yaklaşık 30-50 yıl sonra gelişir. Hastada siroz gelişmişse HSK riski daha da artar (1, 8, 24, 25) (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7.: KHB'nin seyirinde farklı klinik durumlara progresyonun tahmin edilen yıllık yüzde oranları (3).

2.1.9. Tedavi

2.1.9.1. Akut İnfeksiyonun Tedavisi

Destek tedavisi uygulanır, özgül bir tedavisi yoktur. Hastanın karaciğer yetmezliği yönünden yakından takip edilmesi gerekir. Diyet kısıtlamasına gerek yoktur. Klinik ve biyokimyasal iyileşme sağlanana kadar alkol alımı, başta analjezik, trankilizan ve sedatifler olmak üzere hepatotoksik ilaç kullanımı yasaklanmalıdır (1, 26).

2.1.9.2. Akut Fulminan Hepatit B Tedavisi

Akut karaciğer yetmezliği (AKY) olan hastaların çoğunda, karaciğer transplantasyonu yapılmazsa ölüm meydana gelir. Bu hastalar yoğun bakım ünitesinde takip edilmelidir.

İnfeksiyon tedavisi: İnfeksiyon sık görülmekte olup AKY olgularının %11’inde ölüm nedeni sepsistir. İlk hafta gram pozitifler ağırlıklı olarak bakteriyel infeksiyonlar, iki hafta sonra fungal infeksiyonlar gelişir. Bu nedenle kültürler ve mikrobiyolojik incelemeler için uygun materyaller alındıktan sonra ampirik olarak uygun antibiyotikler/antifungaller başlanmalı ve kültür sonuçlarına göre antimikrobiyal tedavi tekrar gözden geçirilmelidir.

Antiviral tedavi: LAM ve ADV, HBV replikasyonunu inhibe ederek serum HBV düzeylerinde hızlı bir şekilde azalmaya neden olur. IFN alfa immünostimulan etkisi nedeni ile fulminan hepatit B infeksiyonunda tehlikeli olabilir (1, 26).

2.1.9.3. Kronik Hepatit B Tedavisi

Akut HBV infeksiyonundan sonra HBsAg’nin 6 aydan daha uzun süre pozitif olduğu hastalar tanı yönünden ikiye ayrılır:

1- Serum HBV-DNA düzeyi 10^5 kopya/ml’den fazla, AST-ALT seviyeleri devamlı veya aralıklı olarak yüksek ve karaciğer biyopsileri kronik hepatiti gösteren (nekroinflamatuvar skor \geq 4) hastalar “*KHB*” olarak tanımlanır.

2- Serum HBV-DNA düzeyi 10^5 kopya/ml'den az, AST-ALT seviyeleri devamlı olarak normal, HBeAg (-), anti-HBe pozitif, karaciğer biyopsilerinde belirgin hepatit olmayan (nekroinflamatuvar skor<4) hastalar "inaktif HBsAg taşıyıcısı" olarak tanımlanır.

KHB'nin siroz, HSK ve ölüme progresyonunu önlemek için etkili bir şekilde tedavi edilmesi gereklidir. KHB'si olan hastalarda tedavinin hedefleri kalıcı HBV-DNA baskılanması, serum ALT seviyesinin normalleşmesi ve karaciğer nekroinflamasyonunda iyileşme sağlanmasıdır. Uzun dönemde amaçlar ise sirozun, son dönem karaciğer hastalığının ve HSK gelişiminin önlenmesi, yaşam kalitesinde iyileşme ve daha sonra survinin uzatılmasıdır.

Oluşacak komplikasyonların tedavileri de göz önüne alındığında KHB'nin tedavisi maliyet-etkin olarak bulunmuştur. KHB'nin tedavisinde kullanılacak ilacın uygun risk-yarar profili olmalı, kalıcı etkinlik sağlamalı, sınırlı toksisitesi olmalı ve hiç veya minimal viral direnç gelişimi olmalıdır. KHB tedavisi için Türkiye'de onaylanmış olan ilaçlar IFN alfa, LAM ve ADV'dir (3, 25, 27).

2.1.9.3.1. İnterferon Alfa Tedavisi

IFN alfa KHB tedavisinde yıllardır kullanılmaktadır. HBV infeksiyonunun kronikleşmesinde sebebi ve özelliği tam olarak anlaşılamamış bir immün yetersizlik halinin olduğu kabul edilmektedir (28). Çeşitli çalışmalarda gösterilen yetersiz immün yanıt göstergelerinden birisi de yetersiz IFN üretimidir. KHB'li hastalara verilecek olan IFN ile bu eksiklik kısmen yerine konur.

IFN, HBV infeksiyonunda 2 mekanizmayla antiviral etkide bulunur.

1. Direkt antiviral etkiyle viral DNA sentezini inhibe eder ve 2-5 oligoadenil sentetaz, protein kinaz ve ribonükleaz gibi antiviral enzimleri aktive eder.
2. IFN immünomodulator özelliği ile immün sistem üzerinde MHC sınıf I antijen ekspresyonunda artma, doğal öldürücü hücre aktivitesinde artış, antijen sunan hücrelerin aktivitesinde artış, doğal IFN salgısında artma gibi etkileri sonucu HBV ile infekte hepatosite karşı hücrel immün yanıtı artırır.

Bunca olumlu etkilerine rağmen KHB tedavisinde IFN deneyimleri tedavi için uygun görülen hastaların ancak %30-35'inde tam bir cevap elde edilebildiğini

göstermektedir (29). Ancak tedaviden sonra hastaların yaklaşık olarak %50'sinde nüks görülmektedir.

IFN alfa tedavisi dekompanse sirozu olan hastalarda ciddi infeksiyon ve hepatit alevlenmesi riski nedeniyle güvenli değildir. Ayrıca immünespresif hastalarda da kontrendikedir. IFN alfa ile tedavi parenteral uygulamayı gerektirir ve tedavi esnasında istenmeyen yan etkiler oldukça sıktır. Grip benzeri şikâyetler, iştahsızlık, bulantı, myalji, artralji, emosyonel değişiklik, depresyon gibi yan etkilere neden olabilir. Bu yan etkiler olursa doz ayarlaması veya tedavinin kesilmesi gerekebilir (1, 3).

2.1.9.3.2. Kronik Hepatit B'de Kullanılan İnterferon Dışındaki Tedavi Seçenekleri

Nükleozid analogları: LAM, FAM, adenin arabinosid, gansiklovir, pensiklovir, ADV, lobukavir, entekavir, emtrisitabin, vs.

İmmunomodulator ilaçlar: Kortikosteroidler (prednizon, prednizolon), diğer IFN'ler, levamisole, koloni stimüle edici faktör, interlökinler(IL-2, IL-10, IL-12), HBV aşılıarı (regüler aşılıar, moleküler olarak modifiye edilmiş CTL uyarıcı aşılıar).

Moleküler biyolojik yöntemler: DNA aşılıarı, antisens oligonükleotidler, ribozimler, DNA ribonükleazlar, dominant (-) mutantlar, ilaçların karaciğere hedeflenmesi ile yapılan tedaviler (27).

• Nükleozid Analogları

Nükleozid analogları, nükleozidlerle yapısal benzerlik gösteren ve DNA sentezini bozan moleküllerdir. Nükleozid analoglarının olası etki mekanizmaları şunlardır (27):

1. DNA polimerazın nükleozid bağlanma bölgesine bağlanıp fonksiyonunu inhibe edebilirler.
2. DNA yapısına girip fonksiyon dışı DNA yapabilirler.
3. Nükleozidlerle kompetisyona girebilirler.
4. DNA sentezine girip sentezi bloke edebilirler.
5. DNA polimerazın diğer enzimatik bölgelerinin fonksiyonunu bozabilirler.

- **Lamivudin Tedavisi**

Bir sitozin analogu olan LAM hepadnavirus DNA sentezini sonlandırarak virus replikasyonunu inhibe eder. LAM, KHB tedavisinde kullanım için A.B.D.'nde 1998 yılında onay almıştır. KHB'li hastaların tedavisinde LAM'ın güvenli, etkili ve iyi tolere edilebildiği kanıtlanmıştır. Nadiren ilaca bağlı pankreatit, laktik asidoz görülebilir. LAM oral olarak 100mg/gün dozunda kullanılır. LAM'la tedavi süresi belli değildir.

Erişkin ve pediatrik hastalarda yapılan plasebo kontrollü klinik çalışmaların sonucuna göre 52 hafta LAM tedavisiyle HBV replikasyonunda azalma, ALT seviyelerinde normalleşme, HBeAg serokonversiyonu gelişimi ve karaciğer histolojisinde düzelme anlamlı olarak elde edilmiştir (3).

- **Lamivudin Direnci**

Uzun süre LAM alan hastalarda viral izolatların incelenmesi sonucu dirence neden olan bazı mutasyonlar tespit edilmiştir.

HBV polimeraz enzimi A'dan E'ye isimlendirilen 5 farklı domainden oluşmaktadır. Bu domainlerden A, C ve D nükleotid trifosfatların bağlandığı ve katalizlendiği bölgelerdir. B ve E ise şablon RNA ve primerin karşılıklı getirilmesi ve aktif enzimatik bölgenin bu alana yanaşmasını sağlayan bölgelerdir (Şekil 2.8.). YMDD (triozin, metionin, aspartat, aspartat) aminoasitlerinden meydana gelen motif nükleozidlerin bağlanma bölgesi olup polimeraz enziminin katalitik fonksiyon gösteren C domainine yerleşmiştir. Bu motifteki mutasyonlar LAM direnci ile yakından ilişkilidir. LAM direnci ilacın uzun süre kullanımından sonra kendini göstermektedir. Başlangıçta transplantasyon hastalarında tanımlanmış olmasına rağmen zamanla immün kompetan hastalarda da varlığı gösterilmiştir (27).

Başlıca gelişen mutasyon, HBV polimeraz geninin YMDD motifinde metioninin, valin veya izolösin ile yer değiştirmesi (rtM204V/I mutasyonu) sonucu olur (30). Bu mutasyonun prevalansının 24 üncü haftada %10, 52 nci haftada %24 ve 5 inci yılda %65 olmak üzere LAM tedavi süresi ile arttığı gösterilmiştir (27). 2 yıldan fazla tedavi edilen HBeAg (-) hastalarda da dirençli mutantların gelişimi %57-64 oranında bildirilmektedir (31).

LAM direnci ile ilgili mutasyonlar başlıca 3 grupta incelenmektedir ve polimeraz enziminin B ve C domainlerine yerleşmişlerdir (Çizelge 2.3. ve Çizelge 2.4.).

Çizelge 2.3.: LAM direncine sebep olan başlıca mutasyonlar (27).

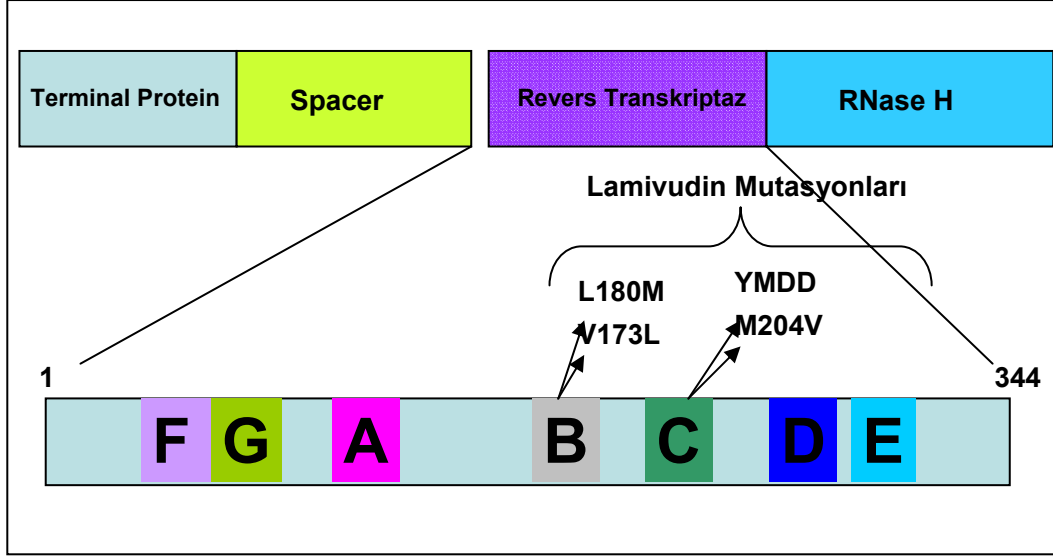
	Kodon Dizisi	Polimeraz Domain'i
Grup 1	rtL180M / rtM204V	B + C
Grup 2	rtM204I	C
Grup 3	rtF179L ± rtM204V	B ± C

Çizelge 2.4.: HBV Polimeraz rt gen bölgesinde LAM'a direnç mutasyonları (32).

HBV Polimeraz rt Gen Bölgesinde LAM'a Direnç Mutasyonları	
Mutasyon Adı	Nükleotid ve aminoasit değişimi
M204V/I (YMDD motif)	ATG-GTG (Metionin-Valin) YVDD ATG-ATT (Metionin-Isolesin) YIDD
I169T	ATT-ACT (Isolesin-Threonin)
V207L/M	GTG-ATG (Valin-Metionin) GTG-CTG (Valin-Losin)
V214A	GTA-GCA (Valin-Alanin)
Q215S	CAG-TCG (Glutamin-Serin)
V173L	GTG-CTG (Valin-Losin)
L180M	CTG-ATG (Losin-Metionin)

LAM direnci gelişmesi ile ilgili risk faktörleri; (3).

- 1- Başlangıçta yüksek HBV-DNA düzeyi olması
- 2- Başlangıçta ALT'nin çok yüksek olması
- 3- Vücut kitle indeksinin fazla olması
- 4- Daha önce FAM tedavisi almış olmak
- 5- Başlangıç virolojik yanıtın yetersiz olması



Şekil 2.8.: HBV polimerazındaki LAM mutasyon alanları (33).

LAM direncine sebep olan mutasyonların hemen hemen tamamı YMDD motifine yerleşmiştir. Metionin yerine valin (YVDD) veya izolosin (YIDD) gelmektedir. Bu değişikliklerin diğer nükleozid analoglarına da direnç anlamına gelmediği tekrar vurgulanmalıdır. Örneğin ADV ve labukavire her iki mutasyonda hassastır.

LAM direnci HBV-DNA'nın tekrar pozitifleşmesi ve genellikle ALT yükselmesiyle karakterizedir. Kronik B hepatitli LAM kullanan hastalarda 6 ncı aydan itibaren genotipik direnç görülür. Direnç oranı farklı çalışmalarda farklı bildirilmiştir. Örneğin bir yıllık tedavi sonunda Asya çalışmasında %14, A.B.D. çalışmasında %32 direnç bildirilmiştir. Asya çalışmasında 2 yıllık takibi tamamlayan hastalarda toplam direnç oranı %40 olarak saptanmıştır (2 yıl tedaviye girmiş olan hastaların %31'i 2 ncı yılda direnç geliştirmiş). Aynı hastaların 4 yıllık takiplerinde direnç oranının %66'ya çıktığı bildirilmektedir (27).

Virus ne kadar çok replike olursa direnç sorunu o kadar büyük olmaktadır, bu nedenle transplantasyon hastalarında direnç daha büyük bir problemdir. Prekor varyant ile infekte hastalarda direnç Wild tiple infekte olanlarla aynı oranda görülmektedir (27).

LAM direnci hepatit progresyonuyla karaciğer sirozuna, siroz hastalarında dekompanse siroza, HSK gelişmesine ve karaciğer transplantasyonu gereksinimine neden olabilir (34). Dekompanse sirozu veya karaciğer transplantasyonu sonrası rekürren hepatit B'si olan hastalarda YMDD mutant HBV gelişmesi yüksek

insidanslıdır ve klinik olarak progresif karaciğer hastalığı şeklinde sonuçlanır (35). Bu nedenle LAM'a dirençli hastalar için güvenli, etkili, alternatif veya ek antiviral tedavilere ihtiyaç vardır (3).

- **Adefovir Dipivoksil Tedavisi**

ADV, LAM'a dirençli ve mutant HBV infeksiyonları da dahil olmak üzere, hepatit B viral replikasyonu olan yetişkinlerde KHB tedavisinde kullanılan bir adenin nükleotid analogudur (2). ADV, (9-(2-bis[pivaloyloxymethyl] phosphonyl methoxyethyl)adenine) (PMEA) dAMP'nin asiklik analogudur. ADV, KHB'nin tedavisi için A.B.D.'de Eylül 2002'de, Avrupa'da Mart 2003'de ve Türkiye'de Ekim 2003'de onay almıştır.

ADV'nin invitro olarak hepadnaviruslar, retroviruslar ve herpes viruslara karşı güçlü etkili olduğu gösterilmiştir (3). ADV'nin invitro olarak bilinen tüm LAM, emtrisitabin, FAM ve HBIG'ye dirençli HBV'lerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir (36).

ADV, adefovirin oral alınabilen bir ön ilacıdır. Oral olarak iyi emilmediği için 2 adet pivalic asit grubuyla esterleştirilmiş ve oral olarak iyi emilebilen bir prodrug haline getirilmiştir (bis-POM PMEa) (adefovir dipivoxil). İnsan hepatoma hücrelerinde HBV için EC50 değeri 0.05 mol/L iken aynı hücreler için CC50 değeri 15 mol/L'dir. Selektivite indeksinin 300 olması ilacın emniyetini göstermektedir.

ADV'nin difosfat formu dAMP'nin DNA yapısına girmesini kompetitif inhibisyonla önler ve DNA sentezinde zincir sonlanması yapar. Antiviral etkisine ilave olarak ADV, NK hücreleri aktive eder ve muhtemelen endojen IFN'ler aracılığı ile immün cevabı kuvvetlendirir (27).

Oral olarak alınan ADV, gastrointestinal kanalda absorpsiyon süresince ve sonrasında hızlı bir şekilde spesifik olmayan esterazlarla enzimatik hidrolize uğrar ve ADV oluşur. ADV hücre içine taşınarak burada 2 fosforilasyon reaksiyonu ile aktif molekül olan ADV difosfata çevrilir. KHB'li veya sağlıklı kişilerde ADV 10mg tek doz oral alındıktan sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ortalama 0.76–1.75 saat sonra ulaşır. ADV'nin oral biyoyararlanımının iyi olduğu gösterilmiştir (yaklaşık %60) ve plazma farmakokinetiği yemeklerle etkilenmez. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda ADV'nin barsaklar, böbrek ve karaciğer gibi çoğu dokuda yüksek konsantrasyonda dağıldığı gösterilmiştir.

ADV böbreklerden glomeruler filtrasyon ve aktif tubuler sekresyonla değişmeden elimine edilir. ADV eliminasyon öncesi metabolize olmaz. Çalışmalarda ADV'ye bağlı renal toksik etkiler insanlarda verilmesi önerilen günlük 10mg tedavi dozunun yaklaşık 3-8 kat fazlası verildiğinde görülmüştür ve en önemli doz kısıtlayıcı toksisitesidir. Bu renal tubuler nefropatinin insidans ve şiddeti tedavi dozu ve süresiyle ilişkilidir. ADV eliminasyonunun böbrek dışı yolu bildirilmemiştir. Hemodiyaliz hastaları veya kreatinin klirensi <50ml/dk olan hastalarda doz ayarlaması gereklidir. Bununla beraber orta veya şiddetli karaciğer yetmezliği olanlarda ADV'nin farmakokinetiği ile ilgili belirgin değişiklik görülmemiştir. ADV yaklaşık olarak 12-36 saat olan uzun bir hücre içi yarı ömre sahiptir ve günde bir kez verilebilir.

Geniş plasebo kontrollü klinik çalışmalarda ADV'nin hem HBeAg (+) hem de HBeAg (-) KHB'li hastalarda biyokimyasal, virolojik ve histolojik iyileşme sağladığı gösterilmiştir. Aynı zamanda 48 haftaya varan tedavilerde bu ilaca karşı direnç gelişimi bildirilmemiştir.

ADV ile 3 yıla varan uzun dönem tedavinin sonuçlarında yanıtlarda virolojik, biyokimyasal ve histolojik cevabın stabil olduğu gösterilmiştir. 15 ülkenin 86 bölgesinden toplam 695 hastanın bulunduğu ADV'nin faz III klinik çalışmasındaki sonuçlara göre; KHB'li hastalarda 10 mg ADV tedavisi hastalarda HBV genotipi, HBeAg durumu (pozitif veya negatif) veya ırktan bağımsız olarak benzer antiviral etki göstermiştir. Bu çalışmada 96 ncı haftaya kadar hiçbir hastada ADV'ye direnç görülmezken, 96 ncı haftadan sonra sadece bir hastada ADV'ye direnç saptanmıştır (3). Bu hasta LAM tedavisine klinik ve virolojik yanıt vermiştir.

Kompanse KHB'li HBeAg negatif 185 hastanın 2:1 oranında randomize edildiği çok merkezli, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada 48 haftalık tedavi sonrası ADV tedavisi alan grupta anlamlı olarak histolojik, virolojik ve biyokimyasal iyileşme olduğu görülmüştür. Yan etki profili plaseboya benzer olarak bulunmuştur. ADV'ye dirençli HBV polimeraz mutasyonu görülmemiştir.

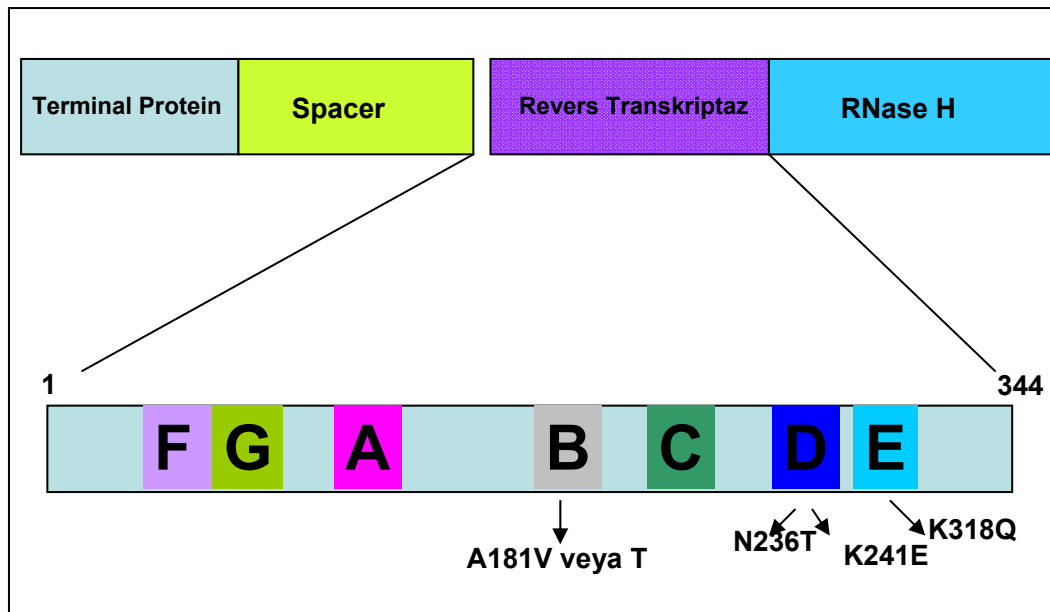
Yapılan klinik çalışmalar sonucu LAM'a dirençli KHB'li hastalarda da ADV'nin etkili olduğu kanıtlanmıştır (3). LAM'a dirençli hastalarda devam eden LAM tedavisine ADV eklenmesiyle veya ADV'nin tek başına verilmesiyle hastalarda virolojik ve biyokimyasal iyileşme olduğu gözlenmiştir (37).

LAM'a dirençli KHB enfeksiyonu olan 135 hastanın alındığı plasebo kontrollü bir başka çalışmada devam eden LAM tedavisine ADV eklenmesiyle 52 haftalık tedaviyle anlamlı olarak klinik, biyokimyasal ve virolojik fayda elde edilmiştir (3).

KHB'si, kompanse karaciğer hastalığı ve LAM direnci olan HBeAg (+) 59 hastayla yapılan bir çalışmada hastalar; devam eden LAM tedavisine ADV eklenmesi, LAM +plasebo ve ADV +plasebo şeklinde randomize edilmişlerdir. 48 haftalık tedavi sonrası LAM + ADV grubu ile ADV monoterapisi alan grupta başlangıca göre ortalama serum HBV-DNA seviyelerindeki azalma, ALT normalleşme oranları ve HBeAg kaybı benzer bulunmuştur. LAM monoterapisi alan grupta serum HBV-DNA düzeyleri aynı kalmış ve çalışma boyunca anlamlı biyokimyasal ve serolojik değişiklik görülmemiştir. Yapılan bazı çalışmalar sonucu LAM'a dirençli KHB'li hastalarda tek başına ADV'yle tedavinin yeterli olduğu, YMDD mutasyonu olan hastalarda uzun dönemde LAM tedavisine devam etmenin bir avantajı olmadığı ileri sürülmüştür (3).

KHB tedavisinin gidişinde ADV'ye direnç gelişimi LAM'la karşılaştırıldığında sıklığı daha azdır ve daha geç oluşur (4). KHB'li 39 hastada 60 haftalık ADV tedavisi sonrası direnç gelişiminin değerlendirildiği bir çalışmada bu sürenin sonunda hiçbir hastada direnç gelişimi görülmemiştir (2).

ADV'ye karşı oluşan direnç mutasyonları sıklıkla HBV polimeraz rt gen bölgesinin B, D ve E domainlerinde karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.9.) (33). A181V/T, N236T, K241E, K318Q kodonlarında ki aminoasitlerin yer değiştirmesiyle meydana gelen direnç mutasyonları en sık karşılaşılan mutasyonlardır (Çizelge 2.5.) (32).



Şekil 2.9.: HBV polimerazındaki ADV mutasyon alanları (33).

ADV aynı zamanda LAM'a dirençli KHB'li karaciğer transplantasyonu sonrası hastalarda, dekompanse karaciğer hastalığı olanlarda ve HIV ile birlikte infekte olan hastalarda da etkili bulunmuştur (2, 3).

Çizelge 2.5. HBV Polimeraz rt gen bölgesinde ADV direnç mutasyonları (32).

HBV Polimeraz rt Gen Bölgesinde ADV Direnç Mutasyonları	
Mutasyon Adı	Nükleotid ve aminoasit değişimi
A181T/V	GCT-ACT (Alanin-Threonin) GCT-GTT (Alanin-Valin)
N236T/N238D	AAC-ACC (Asparagin-Threonin) AAC-GAC (Asparagin-Aspartik asit)

ADV'e direnç oranları genel olarak 48 inci haftada %0, 96 ncı haftada %2 ve 144 üncü haftada %7 bulunmuştur. Homojen popülasyonda hastaları [HBeAg (-)] içeren başka bir çalışmada retrospektif olarak ADV'e direnç oranları 2, 3, ve 4 üncü yıllarda sırasıyla %5, %11 ve %18 olarak bulunmuştur. 5 inci yılda yapılan bir analize göre direnç oranı %28 saptanmıştır. Verilere göre ADV'e direnç gelişimi geç olur ve LAM'dan çok daha azdır. ADV ile ideal tedavi süresi bilinmemektedir (3).

2.1.9.3.3. Diğer Tedaviler

- **Entekavir**

Oral alınan bir siklopentil guanozin analogudur. KHB tedavisinde kullanım için Mart 2005'de A.B.D.'nde onay almıştır. HBeAg (+) ve HBeAg (-) KHB'li hastalarda entekavir monoterapisi ile (0,5 mg/gün, 52 hafta) HBV-DNA'da ortalama 5-7 log₁₀ azalma elde edilmiştir. Bu değerler daha önce LAM ve ADV ile bildirilenden daha fazladır (LAM ile 4-5log₁₀ ve ADV ile 3-4 log₁₀). HBeAg (+) KHB'li hastalarda HBeAg serokonversiyonu entekavirle %21 bulunurken LAM ile %18 bulunmuştur.

LAM'a dirençli KHB'li hastalarda entekavir tedavisi (1 mg/gün, 52 hafta) HBV-DNA'da azalma, ALT normalleşmesi ve histolojik iyileşme açısından LAM

tedavisinden daha etkili bulunmuştur (3). LAM'a dirençli KHB'li hastalarda ADV'yle entekavirin karşılaştırılmasının direkt olarak yapıldığı bir çalışma henüz yoktur.

Lamuvidine dirençli hastalarda entekavir tedavisiyle 1 inci yılın sonunda entekavire direnç %7 olarak bildirilmiştir. Yapılan sınırlı çalışmalara göre entekavire dirençli hastalar ADV'ye duyarlı gibi gözükmemektedir (38). Entekavirle ilgili uzun dönem tedavi sonuçları henüz belli değildir.

HBV polimeraz gen bölgesinin T184S, S202I/G, M250L/V kodonlarındaki aminoasitlerin yer değiştirmesiyle meydana gelen entecavir direnç mutasyonları en sık karşılaşılan mutasyonlardır (Çizelge 2.6.) (32).

Çizelge 2.6.: HBV Polimeraz rt gen bölgesinde entecavir direnç mutasyonları (32).

HBV Polimeraz rt Gen Bölgesinde Entecavir Direnç Mutasyonları	
Mutasyon Adı	Nükleotid ve aminoasit değişimi
T184S	ACT-TCT (Threonin-Serin)
S202I/G	AGT-GGT (Serin-Glisin) AGT-ATT (Serin-Isolosin)
M250L/V	ATG-CTG (Metionin-Losin) ATG-GTG (Metionin-Valin)

- **Peginterferon alfa 2a (Peg IFN)**

KHB tedavisi için A.B.D., Avrupa ve Türkiye'de onay almıştır. Polietilen glikolün proteine bağlanmasıyla (pegilasyon) subkutan enjeksiyonu takiben IFN'nin absorpsiyon oranı azalır, hücresel ve renal klirensi azalır, yarı ömrü uzar. Standart IFN'den farklı olarak haftada bir kez uygulama kolaylığı vardır. Peg IFN alfa 2a'nın KHB tedavisinde haftada 1 kez 180 mikrogram, 48 hafta verilmesi önerilmektedir.

HBeAg (+) ve HBeAg (-) KHB'li hastalarda yapılan 2 çalışmada 48 hafta verilen Peg IFN alfa 2a (180 mikrogram/hafta), LAM (100mg/gün) ve Peg IFN alfa 2a + LAM tedavileri karşılaştırılmıştır. Tedavi sonrası 24 hafta takip edilen hastalarda HBeAg serokonversiyonu peg IFN alfa 2a grubunda %32 bulunurken LAM grubunda %19 bulunmuştur. HBeAg (-) hastalarda HBV-DNA'da kalıcı düşme ve ALT normalleşmesi peg IFN alfa 2a grubunda LAM grubundan daha fazla görülmüştür (%43'e %29 ve %59'a %44). LAM'la kombinasyon tedavisi, peg IFN alfa 2a

monoterapisiyle karşılaştırıldığında kalıcı cevap oranını arttıramamıştır. HBeAg serokonversiyon oranı peg IFN alfa 2a tedavisinde, standart IFN tedavisinden daha yüksek bulunmamıştır (3, 25).

- **Emtrisitabin**

Yapısal olarak LAM'a benzer bir nükleotid analogudur. HBV ve HIV'e karşı antivirial etkisi vardır. KHB'si olan 98 hastalık [77'si HBeAg (+)] bir faz II çalışmada hastalar emtrisitabinin farklı dozlarına randomize edilmişler ve 48 haftalık tedavi sonrası tüm gruplarda HBV-DNA'da azalma görülürken viral supresyon en fazla 200mg/gün dozunda görülmüştür. KHB'li 248 hastanın [%63'ü HBeAg (+)] emtrisitabin 200mg/gün ve plaseboya randomize edildiği bir çalışmada 48 haftalık tedavi sonunda ALT normalleşmesi ve ölçülemeyecek serum HBV-DNA'sı emtrisitabin alan grupta daha anlamlı olarak bulunmuştur (%65'e %25 ve %56'ya %7). Çalışmaya göre HBeAg serokonversiyonu HBeAg (+) hastaların %12'sinde görülmüş ve plasebodan farklı bulunmamıştır. Emtrisitabin alan hastaların %13'ünde YMDD mutasyonu gelişmiştir. Emtrisitabin ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (3, 25).

- **Famsiklovir**

Pensiklovirin oral ön ilacıdır. Bir asiklik deoksiguanozin analogudur. FAM (günde 3 kez 500mg dozunda verilmesiyle) iyi tolere edilerek, HBV replikasyonunu inhibe etmiştir. Fakat bu etkisi genellikle geçicidir. FAM'a karşı gelişen bazı ilaç dirençleri aynı zamanda LAM'a da dirençlidir. İlaçla ilgili çalışmalarda olumlu sonuçlar ne yazık ki alınamamıştır(3, 25).

2.1.9.3.4. Diğer Antivirial İlaçlar

Clevudin, telbuvidin, valtorsitabin nükelozid analoglarıdır. HBV replikasyonuna karşı etkilidirler (3). Tenofovir, HIV infeksiyonu tedavisinde kullanılan bir nükleotid analogudur. Birkaç pilot çalışmada LAM'a dirençli HBV'de etkili olduğu gösterilmiştir (39). Alamifovir, pradefovir, remofovir çalışmaları devam eden diğer antivirial ilaçlardır.

KHB tedavisinde LAM direnci ülkemiz için de oldukça önemli bir sorundur. LAM'a dirençli KHB'li hastalarda ek veya alternatif tedavilerin verilmemesi durumunda hastalığın siroza, son dönem karaciğer yetmezliği ve HSK gelişmesine neden olacağı bir gerçektir. LAM'a dirençli KHB'li hastalara verilebilecek tedaviler günümüzde oldukça sınırlıdır. Bu hasta grubuna verilebilecek, etkinliği kanıtlanmış tedavilerden birisi de yakın zaman önce ülkemizde de kullanımı onaylanan ADV tedavisidir.

2.1.10. Korunma ve Kontrol

Hastalıktan korunmada özgül korunma ve bulaşmanın azaltılmasına yönelik önlemler etkili olmaktadır. Özgül korunmada pasif ve aktif immünizasyon uygulanabilir (26).

1. *Pasif immünizasyon:* Pasif olarak aktarılan Anti-HBs antikorlarının akut hepatit B gelişmesini önlemesi gereğine dayanarak HBV ile temastan sonra kısa süre içinde yüksek titrede Anti-HBs içeren HBIG uygulanması infeksiyondan korunmada etkili olmaktadır. HBV ile karşılaşma sonrasında HBV aşısı ile birlikte uygulanan HBIG, HBsAg (+) annelerin bebeklerinin korunmasında, HBsAg (+) kan veya vücut sıvılarıyla perkutan veya mukozal temasluların korunmasında ve HBsAg (+) kişi ile cinsel temasluların korunmasında etkili olmaktadır. HBIG karaciğer nakli sonrasında HBV infeksiyonu rekürrensini önlemek için uzun süre uygulanmaktadır (7).

2. *Aktif immünizasyon:* Güvenilir ve etkili HBV aşuları 1981 yılından beri ticari olarak bulunmaktadır. İlk geliştirilen aşular HBV taşıyıcılarının plazma örneklerinden saflaştırılmış HBsAg içermekteydi. Daha sonra gen teknolojisi kullanılarak, HBsAg kodlayan genin maya veya memeli hücrelerine transfeksiyonu yoluyla elde edilen saflaştırılmış HBsAg rekombinant aşular geliştirildi. HBV aşısının etkinliği Anti-HBs gelişmesi ile izlenebilmektedir.

Temas öncesi aktif bağışıklamada hepatit B aşısı tüm yenidoğan ve infantlara, daha önce aşılanmamış çocuk ve adölesanlara, yüksek risk grubunda olan erişkinlere önerilir. Aşılamada 0, 1, 6 ncı aylarda uygulanan üç dozlu şema genellikle kullanılmaktadır. Sağlıklı çocuklarda rekombinant aşının üç doz kas içi uygulanması sonucu %95-99'unda koruyucu düzeyde antikor oluşur. Anti-HBs düzeyi aşından sonra 6 ay içinde ölçülen en yüksek antikor düzeyi ile ilişkilidir. Anti -HBs yaklaşık 5 yıl sonra

koruyucu düzeyin altına inmiş olsa bile, aşılama sonrası immünolojik bellek geliştiğinden HBV ile karşılaşıldığında anamnestic yanıt verilmektedir eğer bu dönemde tek doz aşı yapılırsa bu yanıt daha da artmaktadır, rapel doza gerek yoktur (5).

Ülkemizde ulusal hepatit B aşılması ilk kez 1998 yılının ağustos ayından itibaren sıfır yaş grubunda rutin aşılama programına alınmıştır. T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından ithal edilen maya türevi bir aşı olan ve Güney Kore’de üretilen aşı (Euvax-B, LG Chemical Ltd.) kullanılmıştır.

2003 yılından itibaren yürürlüğe giren ve halen uygulanmakta olan “Aşı Takvimi Değişikliği” genelgesinde ise ülkemizde gebelere rutin izlemleri sırasında Hepatit B taşıyıcılığı yönünden taramanın yeterince yapılamadığını ifade etmektedir. Bu nedenle bebeğe erken ulaşmak açısından aşının 3, 4, 9 uncu ay değil, bundan böyle 0, 2, 9 uncu aylarda uygulanacağı, doğumda tespit edilemeyen bebeklere ilk karşılaşmada 1. doz, en az bir ay sonra 2 inci doz, ikinci dozdan 5 ay sonra 3 üncü doz hepatit B aşısı uygulanacağı bildirilmiştir (40).

2.1.11. Tanı

2.1.11.1. Serolojik Testler

- **HBsAg**

İnfekte kişilerin %95’inin serumunda beliren ilk markerdir. Çok duyarlı testlerle, temastan sonra en erken 1-2 hafta, en geç 12 hafta içinde saptanabilir. Özellikle fulminant hepatitlerde HBsAg (-) olanların prognozunun daha iyi olabileceği bildirilmiştir. HBsAg’nin serumda en az altı ay varlığını sürdürmesi kronik HBV enfeksiyonunun göstergesidir (Çizelge 2.7.). Genel bir kural olarak HBsAg kaybolan ve klinik hepatiti düzelen hastalarda karaciğer hasarı ve virus persistansı söz konusu değildir. Aşılamadan sonra çocuklarda geçici HBsAg pozitifliği saptanabilir (Şekil 2.10.) (5).

- **HBeAg**

Serumda bulunması viral parçacıkların, DNA polimerazın, HBV DNA'nın varlığını, hepatit B'nin aktif olarak çoğaldığını gösterir (Çizelge 2.7.). Kısa ömürlü olup HBsAg ile hemen hemen aynı dönemde ortaya çıkar ve daha önce kaybolur (Şekil 2.10.). 10 haftadan uzun süreli kalması enfeksiyonun kronikleşeceğini, negatifleşmesi ise özellikle Anti-HBe'nin ortaya çıkması ile birlikte ise iyileşmeye doğru gidişi gösterir. Fakat mutant HBV türleri hiç HBeAg üretmeyebilirler ve Anti-HBe varlığında da replikasyona devam edebilirler, bu durumda serum HBV DNA'sı ölçülebilir düzeydedir. Bu mutant virusların kanıtı için virus genotipinin moleküler analizi yapılmalıdır (5).

- **HBV DNA**

İnfeksiyonun başlangıcında serumda saptanabilen ilk belirleyicilerdendir (Şekil 2.10.). Hassas testler kullanılarak enfeksiyonun ilk haftasında tespit edilebilir fakat PZR yöntemi pahalı ve yapması zor olduğundan sıklıkla kullanılmaz. Viral replikasyonun, bulaştırıcılığın, aktif karaciğer hastalığının en hassas ve direkt belirleyicisidir. Genellikle araştırmalar için, KHB enfeksiyonunun ilerlemesini izlemek için, HBsAg ve Anti-HBe (+) fakat HBeAg saptanamayan hastalarda HBV'nin olası varlığını gösterebilmek için kullanılır (5).

- **Hepatit B DNA polimeraz**

Hepatit B enfeksiyonunun başında ilk bir haftada, HBV DNA ile aynı zamanda serumda saptanabilir. Standart test olarak kullanılmaz. Hastalığın gelişim sürecini takipte, tedavi uygunluğunu belirlemede ve araştırma amaçlı kullanılabilir (5).

- **AntiHBc IgM**

Akut enfeksiyonun göstergesidir. Pencere döneminde tek pozitif göstergedir (Çizelge 2.7.). 3-12 ayda serumdan kaybolur, kronik enfeksiyonların akut alevlenmesinde tekrar pozitif saptanabilir (1).

- **AntiHBc IgG ve Total anti-HBc**

AntiHBc IgG, antiHBc IgM'den sonra pozitifleşir ve ömür boyu pozitif kalır. Kişinin HBV enfeksiyonu ile karşılaştığının göstergesidir. Uzamış pencere dönemi, HBsAg'nin saptanamayacak düzeyde düşük olduğu kronik enfeksiyonlarda ya da serolojik çapraz reaksiyonlara bağlı durumlarda tek başına pozitif saptanabilir (41). Çok eskiden geçirilmiş ve anti-HBs'nin saptanamayacak kadar düşük olduğu durumlarda da anti-HBc IgG tek başına pozitif olarak saptanır.

- **Anti-HBe**

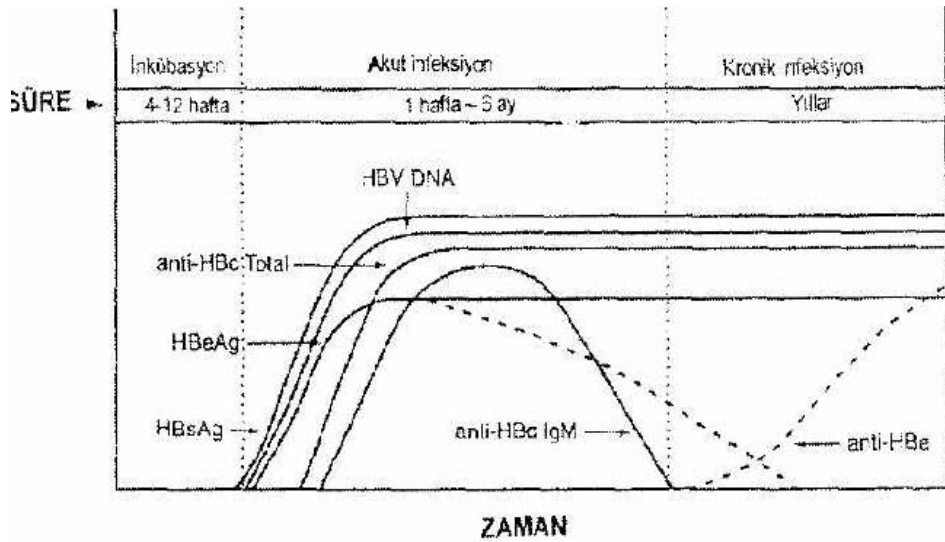
HBeAg'nin kaybolmasından birkaç hafta sonra, HBsAg negatifleşmeden AntiHBs oluşmadan ortaya çıkar (Şekil 2.10.). Akut hepatitli hastalarda düzelmeyi, kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda ise virus replikasyonunun ortadan kalktığını düşündürür (prekor mutantlar hariç) (Çizelge 2.7.). 1-1,5 yıl pozitif kalabilir ve bulaştırıcılığın düşük olduğunu gösterir. Uzakdoğuda HBeAg (+) emziren annenin bebeklerinde bir yaşına kadar % 90'nın üstünde taşıyıcılık belirlenmesine rağmen Anti-HBe oluşmuş annelerin bebeklerinde bu oran % 10-% 30'dur (5).

- **Anti-HBs**

Ortaya çıkan son antikordur ve hepatit B'yi etkisizleştirebilir. Serumda saptanması vücudun enfeksiyonla başedebildiğini gösterir. HBs Ag kaybolduktan sonra ve genellikle başlangıçtan üç ay sonra ortaya çıkar. Çoğu kişide hayatboyu kalıcıdır. Tek başına Anti-HBs pozitifliği aşılınmayı, Anti-HBc ile pozitifliği ise doğal bağışıklığı gösterir (Çizelge 2.7.) (5, 42).

Çizelge 2.7.: Hepatitli hastalarda HBV serolojik göstergelerinin yorumu (43).

HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc	Yorum
+	-	-	Akut HBV enfeksiyonunun erken dönemi. Nonspesifik reaksiyon ekarte edilmeli.
+	+/-	-	Akut veya kronik HBV enfeksiyonu. Anti-HBc IgM ile ayırıcı tanıya gidilir.
-	+	+	Geçirilmiş enfeksiyon. HBV'ye bağışıkdır.
-	-	+	Çok önce geçirilmiş enfeksiyon, düşük düzeyde HBV taşıyıcılığı, pencere dönemi, yalancı pozitiflik, nonspesifik reaksiyon olabilir. Anti-HBc IgM ileri tetkiki istenir. HBV aşısına ikincil yanıt aranır. Anti-HBe(+)liği ile birlikte olması yol göstericidir
-	-	-	Başka etyoloji aranır.
-	+	-	Aşı ile kazanılmış immünite



Şekil 2.10.: Akut hepatiti izleyerek kronikleşen HBV enfeksiyonunda serolojik göstergeler (1).

2.1.12. Direkt Tanı

Günümüzde HBV ile olan laboratuvar çalışmalarında moleküler biyolojik teknikler kullanılarak HBV DNA araştırılması gittikçe yaygınlaşmaktadır. Seronegatif kişilerden bulaşan hepatit B enfeksiyonlarında tek göstergenin DNA olduğunun kanıtlanması, ayrıca HBsAg (-) olup, transaminazları yüksek bulunan donörlerin

%9'unda HBV DNA saptanması DNA incelemelerinin önemini artırmıştır. HBV DNA dot-blot hibridizasyon, southern-blot hibridizasyon, PZR tekniği ile saptanabilir. PZR tekniği ortamda eser miktarda bulunan DNA/RNA'yı, hibridizasyon ile saptanabilir düzeye çıkarmak şeklinde tanımlanır. Geliştirilen PZR tekniği ile düşük titrede viremi olan hastalarda virus genomunun kodlanması, dizi analizleri ve HBV DNA'nın gösterilmesi mümkün kılınmıştır. Bu uygulama; dot-blot yönteminden en az 10^4 kez daha duyarlıdır. Serolojik göstergelerin mutant infeksiyonu düşündürdüğü, örneğin HBeAg ve antikorumun saptanamadığı veya Anti-HBe pozitifliğine rağmen replikasyonun devam ettiği, aşılama ile gelişen Anti-HBs pozitifliğine rağmen aktif replikasyon olduğu durumlarda da serumda HBV DNA yüksek bulunur (5).

2.1.12.1. Viral Nükleik Asitlerin Gösterilmesi

İnsitu hibridizasyon: Biyopsi örneklerinde uygulanır.

İnsitu PZR: Kopya sayısının az olduğu karaciğer biyopsi örneklerinde kullanılır.

Serum örneklerinde sıvı hibridizasyon: Tüm HBV genomuna komplementer DNA veya RNA probları kullanılarak serumda bulunan viral nükleik asitler saptanmakta ve miktarı belirlenebilmektedir. Saptanan HBV DNA aktif viral replikasyonunun göstergesidir (7).

Serum örneklerinde PZR: Bu yöntemle serumdaki HBV DNA'nın, amplifiye edilerek saptanması mümkündür. Bu testler serumda 10 kopya/ml gibi az bir virus miktarını bile saptayacak kadar yüksek duyarlılıktadır (7).

Mutant virus infeksiyonlarında tanı: Bunlarda prekor/kor mutasyonu nedeni ile HBeAg sentezlenmeyebilir veya anti-HBe (+) olmasına rağmen viral replikasyon vardır. Yüzey proteini mutantlarında ise aşılama ile gelişen anti-HBs varlığında bile aktif viral replikasyon vardır. Bunlarda HBV DNA pozitif saptanır (1, 16).

2.1.12.2 Antiviral Direnç Monitorizasyonu

Antiviral direnç, antiviral ilaçlara duyarlılığın azalmasıdır ve bunun in vitro testlerle ölçülmesi mümkündür. Antiviral direnç testleri, moleküler tekniklerin ve hücre

kültürlerinin gelişmesi ile önem kazanmıştır. Bu moleküler teknikler, temelde nükleik asitlerin in vitro çoğaltılmasına dayanır ve üç ana grupta toplanır.

1. Hedef çoğaltma: bunun üç örneği, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR); transkripsiyona dayalı teknikler (TDT), yani nükleik asit temelli amplifikasyon ("nucleic acid sequence based amplification", NASBA) ile "self-sustained sequence replication" (3 SR) ve "Standard displacement amplification" (SDA)'dır.
2. Prob çoğaltma: Bu amaçla "Q β replicase" ve ligaz zincir reaksiyonu (LZR) kullanılır.
3. Sinyal çoğaltma: Bu da birleşik prob ve dallanmış prob ("branched DNA", bDNA) olarak uygulanır.

Son zamanlarda bu teknikler daha da geliştirilmiş olup çeşitli modifikasyonları kullanıma girmiştir. Bu testler ile virus genomunda amino asit ve kodon değişikliği, yabanıl ("wild") tiple karşılaştırılarak ilaç direncinin boyutu, aynı grup ilaçlarda çapraz direnç ve in vitro- in vivo uyum olup olmadığı araştırılır. Antiviral duyarlılık testleri iki gruptur: fenotipik testler ve genotipik testler (44).

- **Fenotipik Testler**

Hastadaki tüm virus popülasyonunda antiviral ilacın inhibitör etkisini ölçen in vitro testlerdir. İlacın inhibitör konsantrasyonu IC₅₀ veya IC₉₀ (virus topluluğunun %50 veya %90'ını inhibe eden ilaç konsantrasyonu) ile ifade edilir. Antiviral ilaçlara çoklu dirençlerin klinik sonuçlarını göstermek için uygundur; fakat pahalı, zor, virusun üretilmesini gerektiren zaman alıcı testlerdir (44). Bu testler şunlardır:

1. Plak redüksiyon deneyi ("plaque reduction assay", PRA)
2. Boya tutulumu deneyi ("dye uptake", DU)
3. DNA hibridizasyonu
4. Enzim immunoassay (EIA)
5. "yield" redüksiyon deneyi ("yield reduction assay", YRA)
6. Periferik kan mononükleer hücre kültürleri ("peripheral blood mononuclear cells cultures", PBMC)
7. "flow" sitometri
8. Plak otoradyografi

- **Genotipik Yöntemler**

İlaç dirençlerinin geleneksel yöntemlerle saptanması, izolasyonda olduğu gibi zahmetli ve zaman alıcıdır. Moleküler yöntemlerle, dirençten sorumlu mutasyonların gösterilmesi direnci kanıtlarken, dirençli olduğu saptanan fakat mutasyonların gösterilemediği olgular, dirençte başka gen bölgesi mutasyonları veya başka mekanizmalar olabileceğini düşündürmektedir.

Direncin belirlenmesinde DNA dizi analizi, restriksiyon enzimi uzunluk polimorfizmi (RFLP), nokta mutasyonu, PZR ürünlerinde ters hibridizasyon ("line probe assay", LİPA), "specific molecular beacons" gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Moleküler direnç testleri; hızlı sonuç vermesi, kültür gereksiniminin minimal olması ya da olmaması nedeniyle avantajlı yöntemlerdir. Dirence neden olan mutasyonların çoğunun tespit edilmiş olması bu yöntemlerin esasını oluşturur. In-house ya da ticari testler uygulanabilir. Ancak bu yöntemlerin pahalı olmaları, dirençli organizma proporsiyonunu belirleyememesi ve sessiz mutasyonları (klinikte dirence neden olmayan) belirlemesi en önemli dezavantajlarından (45).

DNA dizi analizi ile ilaç direncine neden olan mutasyon, delesyon ve insersiyonların saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. İlaç direncinden sorumlu bütün moleküler mekanizmaların bilinmemesi, zor ve yüksek maliyeti kullanımını kısıtlamaktadır (45).

RFLP yöntemi; restriksiyon enzimleri (RE), çok özgül olarak DNA'yı belirli bölgelerden keserek genellikle 1000-20.000 baz çiftlik parçalar oluşturan enzimlerdir. Sıklıkla kullanılan RE arasında EcoRI, HindIII sayılabilir. DNA'nın bu enzimlerden bir veya birkaçı ile kesime uğratıldıktan sonra, agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve sonra etidyum bromür ile boyanan jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliği (46).

LİPA yönteminde ise problemler üzerinde normal ve mutant gen bölgelerine özgül diziler bulunmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldıktan sonra dirençten sorumlu gen bölgelerine ait DNA molekülleri bu problemler ile hibridizasyona sokulur. Dirençli kökenler mutant dizileri taşıyan problemlere, duyarlı kökenler ise normal dizileri içeren problemlere bağlanarak ilaç direnci saptanabilir (46).

2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Tekniği

PZR, 1985 yılında ilk kez Kary Mullis tarafından amplifikasyona dayanan sistem olarak keşfedildi (47). Günümüzde ise moleküler biyolojinin temel uygulama tekniklerinden birisidir.

PZR, nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir tüp test sistemidir. Hedef DNA/Ribonükleik asit (RNA)'in selektif olarak çoğaltılmasına imkan verir. İn vivo şartlarda bölünen bir hücrede DNA'nın replikasyonu çeşitli enzimler tarafından düzenlenen ve genomun kopyalanması ile sonuçlanan bir işlemdir. Bir test tüpü içerisinde gerçekleştirilen PZR'de in vivo çoğalma örnek olarak alınmıştır. Yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir (46).

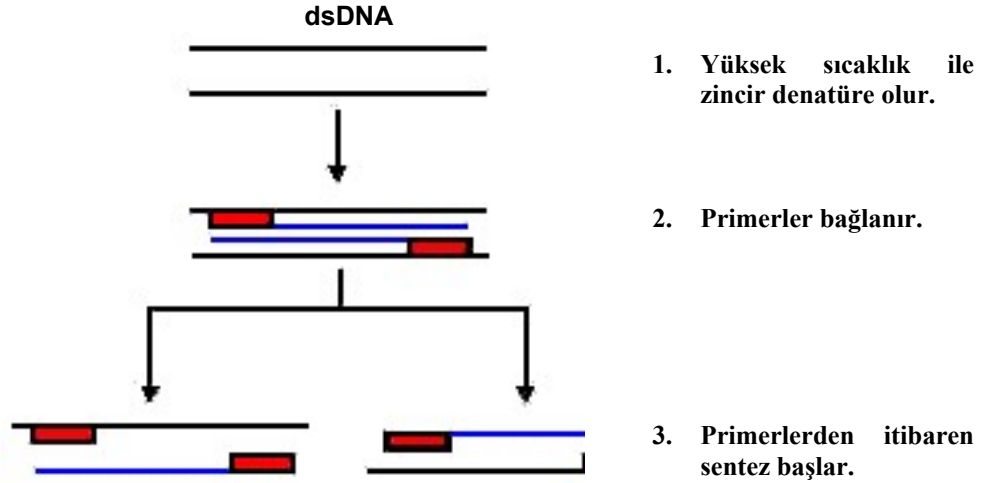
Amplifikasyon bazlı teknikler; birinci reaksiyonda üretilen bütün nükleik asitlerin bir sonraki reaksiyon için kalıp görevi gördüğü, birbirini izleyen siklus serisi içinde tekrarladıkları için "zincir reaksiyonu" (chain reaction) olarak adlandırılmıştır (47).

PZR dizisi bilinen iki bölge arasında uzanan DNA parçasını çoğaltmak için kullanılır. İki tane oligonükleotid, DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri sentetik tepkimenin primerleri olarak kullanılır. Bu oligonükleotidler farklı dizilere sahip olup, kalıp DNA'nın karşılıklı dizilerinde bağlanırlar. Kalıp DNA ilk önce primerlerin varlığında denatüre edilir. Reaksiyon karışımı daha sonra, kalıp dizilere, primerlerin bağlanması için gereken sıcaklığa düşürülür. Bağlanmış olan primerler, uygun sıcaklığa çıkartılarak DNA polimeraz ile uzatılması sağlanır (48). Kısaca PZR, temel olarak tekrarlayan 3 aşamalı bir yol izler (Şekil 2.11.). Bunlar; (49):

Çift iplikli DNA (dsDNA)'nın ısı (90-95°C) ile tek iplikli DNA (ssDNA)'ya denatürasyonu

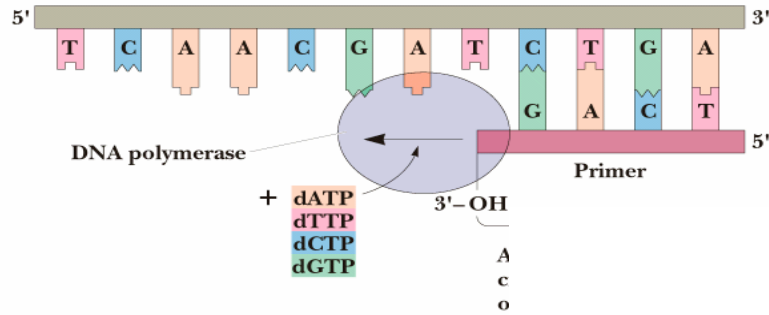
Ortamın 40-60°C'ye soğutulmasıyla primerlerin (spesifik sentetik oligonükleotidler) ssDNA'ya bağlanması (annealing)

Sıcaklığın 70-75°C'ye yükseltilmesiyle ssDNA kalıplarına bağlanmış olan primerlerden doğru 5'-3' yönünde zincir uzamasının (elongasyon) gerçekleşmesidir.



Şekil 2.11.: PZR aşamaları (50).

Zincir uzaması aşamasında kalıp DNA'ya bağlanmış primerlerin 3'-OH gruplarına kalıp DNA'daki bazlara uygun olarak deoksi-nükleotid-trifosfatlar (dNTP) bağlanarak zincirin uzaması sağlanır. Bu işlem ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi olan *Taq* polimeraz ile katalize edilir (Şekil 2.12.) (49).

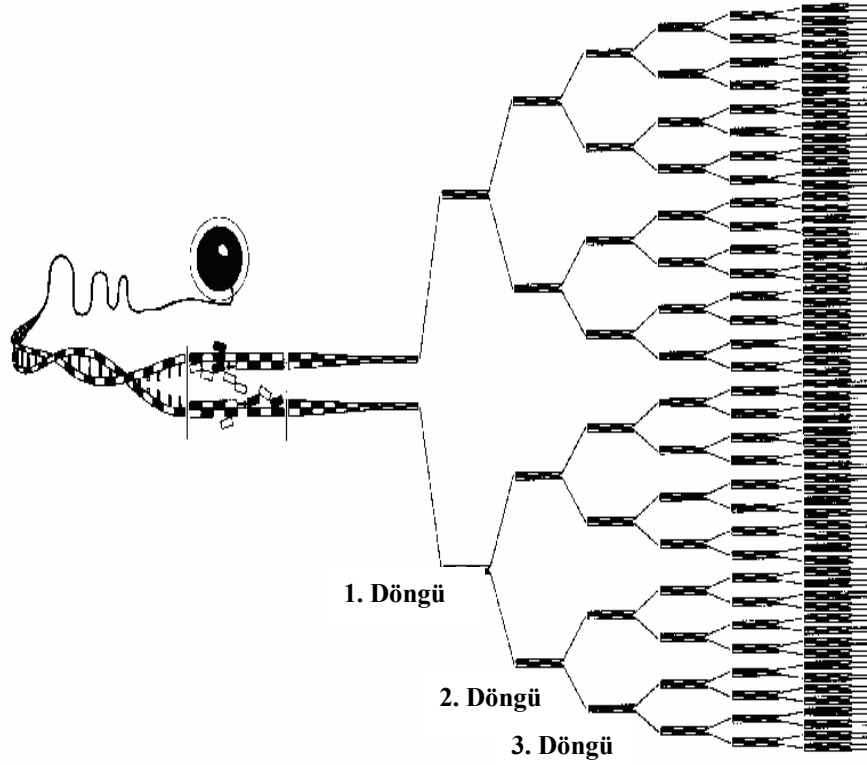


Şekil 2.12.: Zincir uzaması (49).

Uzamayı takiben orijinal DNA segmenti; yeni komplementer DNA'lar (cDNA) ve bunu takiben yeni kalıp DNA'lar oluşturur. Böylece her PZR siklusunda mevcut spesifik DNA miktarı iki katına çıkmaktadır (49).

Uygun şartlarda meydana gelen, denatürasyon, bağlanma ve uzama ile meydana gelen ilk basamak amplifikasyon işlemi ile DNA sentezi gerçekleşir. Daha sonra bu işlem birçok kez tekrarlanır (48). Eğer bu üç siklus tekrarlatılırsa yani yeni zincirleme

reaksiyon başlatılırsa, her siklusta bir öncekinin iki katı DNA molekülü (sadece primerler arasında kalan bölge) elde edilir. Bu düzen dahilinde yapılan yaklaşık 20-35 siklusun tamamlanmasıyla hedef nükleik asitin miktarı görünür bir şekilde milyon-trilyon kez (10^9 - 10^{12}) artmaktadır (Şekil 2.13.) (47).



Şekil 2.13.: PZR döngüleri (45).

Reaksiyon ortamındaki tüm bileşenlerin (tampon, nükleotidler, primerler, DNA ve enzim) termostabil olmaları nedeniyle, her siklus için sadece belirtilen sıcaklık değişikliklerinin yapılması yeterlidir. Bu işlem programlanabilir bir cihaz (thermal cycler, ısı döngü cihazı) ile otomatik olarak yapılmaktadır (47).

2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bileşenleri

Standart bir PZR reaksiyonu genellikle 50-100 μ L'lik bir hacimde, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1,5 mM $MgCl_2$, 100 μ g/mL jelatin, 0,25 μ M primer çifti, 200 μ M dNTP (herbir dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1-2,5 U *Taq* polimeraz ve örnek DNA'nın varlığında gerçekleştirilir. Reaksiyon termal döngülerin programlandığı

ve uygulandığı bir ısı döngü cihazında gerçekleştirilir. Genel olarak 94°C’de 20 saniyelik denatürasyon, 55°C’de 20 saniyelik bağlanma ve 72°C’de 30 saniyelik uzamadan oluşan 30 sikluluk bir döngü programı farklı uzunluklardaki birçok hedef dizilerin amplifikasyonu için kullanılabilir (49).

PZR’nin bileşenleri

Enzim

Deoksiribonükleotid Trifosfatlar (dNTP)

PZR Tampon İçeriği

Oligonükleotidler (Primer)

Hedef Diziler

Sıcaklıklar ve Döngü Parametreleri

- **Enzim**

Oldukça yaygın kullanılan DNA polimeraz, *Thermus aquaticus* (*T. aquaticus*)’dan izole edilen *Taq* polimerazdır. *T. aquaticus*’un avantajı, yüksek sıcaklığa dayanıklı olmasıdır. Ancak diğer termostabil DNA polimerazlar da kullanılmaktadır. *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* ve *Thermococcus litoralis*’ten elde edilen DNA polimerazlar gibi alternatif termostabil enzimler de kullanılabilir. *Taq* polimerazın aktivitesi kabaca 65-72°C arasında iki katına çıktığı için çalışmadaki ısı da önemlidir. *Taq* polimeraz aktivitesi 10 mM Tris’de 8.2-9.0 pH aralığında (25°C’de ölçülen) optimaldir ancak daha düşük veya yüksek pH aralığında aktivitesi azalmaktadır (51).

PZR protokollerinde kullanılan enzimlerin konsantrasyonu önemli derecede değişkendir. Günümüzde en sıklıkta tercih edilen *Taq* polimeraz çoğunlukla reaksiyonlarda 1-2,5 U/100 µl konsantrasyonlarda kullanılır. Enzim konsantrasyonu çok yüksek olduğunda non-spesifik bağlanma, düşük olduğunda ise zayıf amplifikasyon etkisi olur (52).

- **Deoksiribonükleotid Trifosfatlar (dNTPs)**

dNTP’lerin optimal konsantrasyonu her reaksiyon için ayrı ayrı hesaplanmalı ve Magnezyum⁺² (Mg⁺²) konsantrasyonu ile uyumlu olarak kullanılmalıdır. Genelde dNTP

konsantrasyonu 20 ile 200 mM arasındadır. Yüksek konsantrasyonlar düşük reaksiyon spesifitesi ve yüksek maliyet ile sonuçlanırken, düşük konsantrasyonlar normale göre daha az ürün eldesi ile sonuçlanır (52).

dNTP'lerin her biri liyofilize veya nötralize sulu solüsyonlar olarak elde edilebilir. -20°C'de her biri birkaç ay stabildir fakat liyofilize olanların kullanmadan önce KOH ile nötralize edilmeleri gerekebilir. dNTP'ler son konsantrasyonları 100 mM olacak şekilde hazırlandıkları zaman, küçük hacimlerde (herbir 20 mM dNTP'den 50 µl) paylaştırılabilirler ve birkaç ay -20°C'de 100 katlı konsantrasyon şeklinde saklanabilirler (51).

- **PZR Tampon İçeriği (Reaksiyon Buffer)**

Çeşitli reaksiyon tamponu formülasyonları bildirilmiştir. Fakat 1988'de Saiki ve arkadaşlarının tanımladığına benzer bir görüş birliği ortaya çıkmaya başlamıştır. Buna göre bir PZR tamponu; final konsantrasyonunda, 10 mM Tris (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, %0,01 jelatin, %0,01 NP₀₄ ve %0,01 Tween 20 içerir. Non-iyonik deterjanlar yerine %0,1'lik Triton X-100 kullanılabilir. Tuz konsantrasyonu değiştirilebilir (KCl'yi azaltmak veya ortadan kaldırmak için) ve yükseltilmiş Mg⁺² konsantrasyonu ile primerlerin daha iyi çalıştığı gözlenir. Ayrıca dNTP'ler ile Mg⁺² arasında dayanıklı etkileşimler de gözlenir. Bunun sonucunda dNTP'lerin yüksek konsantrasyonu Mg⁺²'ye bağlanır ve mevcut Mg⁺² konsantrasyonunu azaltır. Bu yüzden eğer dNTP'ler yüksek konsantrasyonda kullanılıyorsa, Mg⁺² konsantrasyonunu artırmak gerekebilir (51).

PZR reaksiyon tamponundaki değişiklikler efektif bir amplifikasyonu önemli ölçüde etkilemektedir. Özellikle MgCl₂ konsantrasyonu amplifikasyonun gerçekleşmesinde ve spesifitesinde oldukça önemlidir. Genellikle her bir dNTP'nin 200 mM konsantrasyonunda bulunduğu bir reaksiyonda, 1,5 mM MgCl₂ optimal olarak kullanılabilir. Bununla beraber bazı reaksiyonlarda, farklı Mg⁺² miktarı da gerekebilir. Reaksiyona katılan Mg⁺², önemli bir enzim kofaktörü olup, sentez olayını katalize etmenin yanında, hedef dizine primerlerin bağlanmasında da ayarlayıcı rolü olan bir elemandır. Konsantrasyondaki artış başlangıçta primer bağlantısının zayıf olmasına ve yanlış eşleşmelere neden olabilmektedir. Diğer taraftan yine yüksek Mg⁺² konsantrasyonu, zayıf reaksiyon spesifitesine, düşük Mg⁺² konsantrasyonu ise zayıf reaksiyon etkinliğine neden olabilmektedir. Reaksiyonda kullanılacak Mg⁺² konsantrasyonu, nükleotid konsantrasyonu gibi hesaplanmalıdır (49).

- **Oligonükleotid Primerler**

Oligonükleotidler genellikle 18-30 baz arasında sentezlenir ama daha az karmaşık olan DNA'ların (plazmidler veya daha önceden amplifiye edilen DNA'lar) amplifikasyonu için daha kısa primerler kullanılabilir (51).

Bir PZR'de başarılı bir amplifikasyon için önemli değişkenlerden biri olan primerlerin doğru tasarlanmasıdır. İyi tasarlanmış primerler arka plan ve özgül olmayan ürünlerin oluşmasını engellemeye yardımcı olur (48). Primer dizilerinin G+C içeriği, amplifiye edilecek bölgenin G+C içeriğine yakın olmalıdır. Özellikle 3' ucunda sekonder yapılar taşıyan dizilerden kaçınılmalıdır. Primerler birbirleriyle komplementer oluşturacak nitelikte olmamalıdır. 24-30 bazlık uzun primerler 60°C ve üzerindeki bağlanma sıcaklığında oldukça iyi çalışmaktadır (51).

Düşük konsantrasyonda primer kullanımı az miktarda reaksiyon ürünü elde edilmesine, yüksek konsantrasyonlarda kullanım ise düşük spesifiteye neden olur ki bu durum jelde çok farklı ampikonların tespiti ile mümkündür. Ancak yüksek primer konsantrasyonları, primer-dimer artefaktlarının oluşmasına da neden olmaktadır. Primerlerin genellikle 0,1-0,5 µM arasındaki derişimi en elverişli olanıdır (48). Sık aralıklarla tekrarlayan dondurup-çözdürme olmaksızın hazırlanan primerler -20°C'de amonyumlu sıvılarda uygun bir şekilde saklanabilirler (51).

- **Hedef Diziler**

Birçok farklı kaynak DNA'nın başarılı amplifikasyonu için materyal sağlayabilir. Bunun için DNA'nın amplifiye edilecek kısmının bozulmamış olması gereklidir. Bunun anlamı da parçalanmış DNA kaynağından amplifiye edilen kısımların daha kısa olacağıdır. Reaksiyon inhibitörlerinin (deterjan, EDTA, fenol kalıntısı) olmadığından da emin olmak önemlidir (51).

- **Sıcaklık ve Döngü Parametreleri**

PZR reaksiyonu için gereken 3 sıcaklık aşaması ve farklı sayılardaki döngüler günümüzde birçok üretici firma tarafından üretilen ısı döngü (thermal cycler) cihazları ile gerçekleştirilmektedir (49).

PZR sırasında çift zincirli DNA molekülünün, tek zincirli hale gelmesi için denatürasyon işleminin etkili bir şekilde yapılması gerekir. Genellikle başlangıçta örneğin 94°C civarında 5 dakika boyunca ısıtılması başarılı bir denatürasyon için yeterlidir. Başarılı bir PZR'de primerlerin, hedef diziye bağlanabilmesi için moleküler etkileşimlerin optimize edilmesi gerekmektedir. Bu da kritik bağlanma sıcaklığına bağlıdır (52).

Denatürasyondan sonra ortam sıcaklığı 40-60°C'ye düşürüldüğü zaman reaksiyon karışımındaki primerler komplementer oldukları kalıp DNA dizilerine bağlanırlar (49). Genelde yüksek bağlanma sıcaklığı, primerlerin hedef diziye daha spesifik bağlanmasında ve hedef dizinin çoğaltılmasında (amplifikasyon) oldukça önemlidir. Düşük sıcaklık ise, hedef dizi ile primer dizisi arasında daha fazla uygunsuzluğa neden olabilir ve hedeflenen dizi dışındaki dizilerin non-spesifik olarak çoğaltılmasına neden olabilir. Pratikte 55°C'de gerçekleştirilen bağlanma başarılı bir PZR için uygundur. Optimal bağlanma sıcaklığı, genelde MgCl₂ konsantrasyonu ile optimize edilir (52).

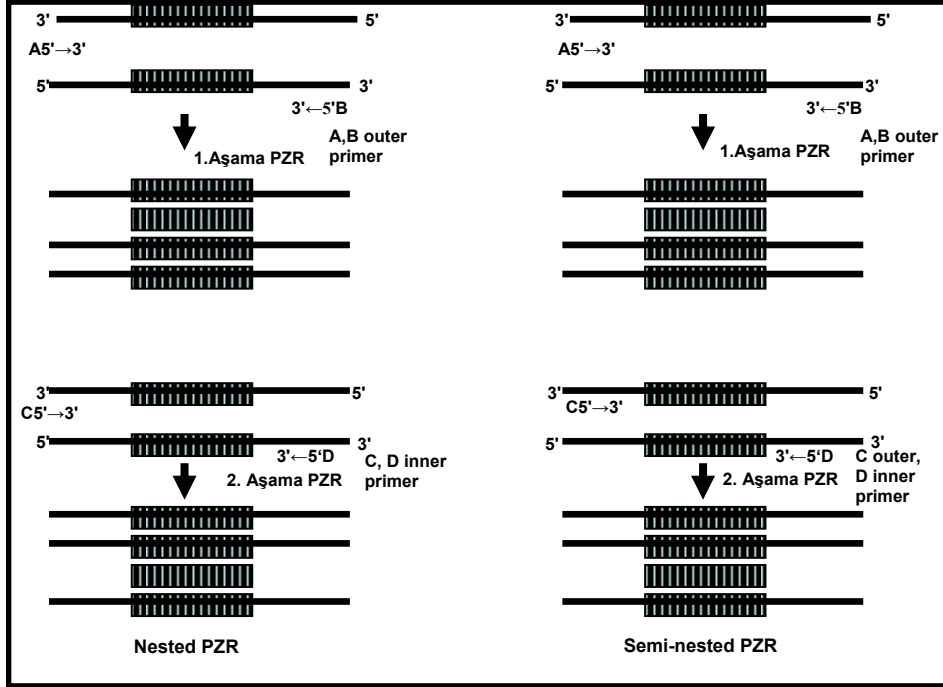
Bağlanmayı takiben ortam sıcaklığı 70-75°C'ye çıkarıldığında, primerlerin 3' ucundan itibaren kalıp DNA'nın kopyasını teşkil edecek şekilde zincir uzamaları (elongasyon) başlar (49). Uzama zamanı hedef dizini derişimine, uzunluğuna ve ısıya bağlıdır. Kalıp DNA zinciri üzerindeki primerlerin uzaması için kabul edilen en uygun ısı derecesi 72°C'dir. 1 dakikalık uzama zamanı genellikle uzunluğu 2 kb'a kadar olan ürünler için yeterli olmaktadır (48).

Optimal siklus sayısı 25-30 arasındadır. Nadiren 35 siklus uygulanabilir. Bununla beraber, 35'den yüksek (53) siklus sayısı uygulandığında genelde ortamdaki PZR karışımını oluşturan maddelerin azalması ile birbirleriyle olan kritik dengelerin bozulmasından kaynaklanan non-spesifik ürünlerin sentezlenmesi söz konusu olabilmektedir (49).

2.2.2. Semi-Nested PZR

İki aşamalı amplifikasyondur. İlk aşamada iki adet "outer" primer kullanılarak hedef molekül üzerinde uzunca bir bölgenin amplifikasyonu yapılmaktadır (15-30 siklus). Sonra bu amplifikasyon tüpünden alınan örnekteki DNA'nın daha kısa bir bölümü "inner" primerlerle çoğaltılmaktadır (15-30 siklus). İkinci aşamada kullanılan

primerlerden biri içerden (inner) başlarken diğeri "outer" primerle aynı yerden başlamaktadır (Şekil 2.14.).



Şekil 2.14.: Nested ve Semi-Nested PZR (46).

Örnekte tek bir hedef DNA molekülü bulunsa bile, iki aşamalı olarak yapılan amplifikasyonlarla çok sayıda DNA elde etmek mümkün olmaktadır. Böylece amplifikasyon sonucu oluşan fazla miktardaki hedef molekül (herhangi bir yalancı negatiflik olmadan) kolayca gözlenebilmektedir. Bu yöntemler ile pozitif sonuç alma olasılığı arttığı için testin duyarlılığı da artmaktadır. Duyarlılığın çok yüksek olmasına bağlı olarak gözlenebilen önemli bir dezavantaj; birinci amplifikasyondan sonra tüpteki DNA ikinci amplifikasyon tüpüne aktarılırken, ürün çok az miktarda dahi çevreye saçılırsa sonraki denemelerde hava yolu ile kontaminasyona yol açabilmektedir (46, 54).

2.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Analizi

2.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Hedef bölgenin amplifikasyonundan sonra, elde edilen ürünlerin bir şekilde belirlenmesi ve analizlerinin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla uygulanan en basit konvansiyonel yöntem agaroz jel elektroforezidir (49). Agaroz, deniz yosunlarından elde edilmiş lineer bir polimerdir. Ticari olarak elde edilen agaroz tamamen saf değildir. Polisakkarit, tuz ve proteinler ile kontamine haldedir. Bu kontaminasyonun miktarı DNA'nın jelde göçünü etkileyebilmektedir. Bu yüzden firmalar agarozun kimyasal olarak formüle edilmiş formunu satmaktadırlar (48).

Elde edilen PZR ürünlerinin fragment büyüklükleri, çalışmanın en başında bellidir. Seçilen veya dizayn edilen primerlerin hedefledikleri bölge ya literatür bilgileri ile bilinir veya ilgili mikroorganizmanın gen haritasına bakılarak bu büyüklük hesaplanır. PZR'da elde edilecek olan fragment büyüklüklerinde aynı olması gerekir. Bunun tespiti, elektriksel bir ortamda molekül ağırlığına göre ayrımının sağlandığı elektroforez metodlarıyla gerçekleştirilir. DNA negatif elektrik ile yüklü olduğundan dolayı pozitif kutba doğru göç eder. Agaroz jeli, porlu bir yapıya sahip olduğundan, elektriksel ortamda göç eden DNA fragmentlerini büyüklüklerine göre birbirinden ayırır. Jel, ya elektroforezden önce veya elektroforezden sonra Et-Br gibi bir DNA boyası ile boyanır. Bu boya 312 nm dalga boyundaki UV ışığı ile fluoresan vermektedir (49).

Bu sebeple, Et-Br ile boyanmış jel UV transilüminatöründe görüntülenir ve fotoğrafı çekilerek incelenir. İstenen büyüklükteki DNA fragmentlerinin tespit edildiği örnekler “pozitif” kabul edilir. Fragment büyüklüğü hesaplamalarında, ticari olarak temin edilebilen standard DNA molekül ağırlığı kullanılmaktadır (49).

2.4. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi ya da “DNA Sequencing” bir DNA örneğinin tüm nükleotid dizilerinin belirlenmesi anlamına gelmektedir. DNA çift polimerdir ve G, C ile ve A, T ile eşleşir. DNA'nın bir zinciri, cDNA zincirlerinin oluşturulmasını sağlar ve bu

komplementer zincir orijinal zincirin tekrar oluşturulmasında kullanılabilir. Bu DNA replikasyonun ve dolayısıyla moleküler biyoloji ve genetiğin temelini oluşturmaktadır. DNA dizi analizi yöntemleri temelde aynı prensibe dayalıdır. Bu yöntemler, her biri bir öncekinden bir baz daha fazla içeren seriler halindeki tek zincirli DNA molekülleri oluşturulması esasına dayanırlar. Bu moleküller elektroforezle dizinin okunabilmesini sağlayan merdiven şeklinde gözlenirler (Şekil 2.15.) (55).

=====	T	AAGGTAACCCCCCTAGTCGGAT
=====	A	AAGGTAACCCCCCTAGTCGGA
=====	G	AAGGTAACCCCCCTAGTCGG
=====	G	AAGGTAACCCCCCTAGTCG
=====	C	AAGGTAACCCCCCTAGTC
=====	T	AAGGTAACCCCCCTAGT
=====	G	AAGGTAACCCCCCTAG
=====	A	AAGGTAACCCCCCTA
=====	T	AAGGTAACCCCCCT
=====	C	AAGGTAACCCCCC
=====	C	AAGGTAACCCCC
=====	C	AAGGTAACCCC
=====	C	AAGGTAACCC
=====	C	AAGGTAACC
=====	C	AAGGTAAC
=====	A	AAGGTAA
=====	A	AAGGTA

Şekil 2.15.: DNA dizi analizi ile DNA nükleotid dizilerinin ortaya çıkarılması (56).

Dizi analizi yöntemlerinden Sanger yöntemi, dideoksi zincir sonlanması yöntemi olup günümüzde en fazla kullanılan yöntemdir. Dört farklı reaksiyon içinde farklı uzunluklarda DNA zincirlerinin sentezi için enzimatik prosedürün kullanımı, DNA replikasyonunun durdurulmasının dört bazdan biri tarafından gerçekleştirilmesi ve daha sonra oluşan fragmentlerin uzunluklarının belirlenmesi esasına dayanır (56).

2.4.1. Dideoksi Zincir Sonlanması Yöntemi

Teknik olarak dizi analizinde en fazla kullanılan en popüler yöntemdir. Elektroforeze dayanan bir metot olup DNA zincirindeki her bir bazın pozisyonu tek tek belirlenmektedir. Bu yöntemde dört sıra halinde, işaretlenen DNA fragmentleri yüksek çözünürlükteki poliakrilamid jelde ayrılarak DNA zincirindeki baz dizilerinin okunması sağlanmaktadır (46).

Teknik olarak dizi analizi 3 ana basamaktan oluşur.

1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction/PCR)
2. Dizileme (sekans) Reaksiyonu
3. Jel elektroforezi ve bilgisayarda değerlendirme

2.4.2. Sekans Reaksiyonu

Reaksiyon bileşenleri:

1. Bir DNA kalıbı (pürifiye edilmiş olması tercih edilir)
2. Taq DNA polimeraz
3. Primer
4. Deoksinükleotid
5. Dideoksinükleotid

PZR gibi 3 ana basamakta ve ortalama 30-40 döngüde gerçekleşir (56).

1. Basamak: denatürasyon; 94°C'de DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması sağlanır.
2. Basamak: annealing (bağlanma); 50°C'de gerçekleşir. Sekans reaksiyonunda sadece bir primer kullanılır.
3. Basamak: extension (uzama); 60°C'de uygulanır. Polimeraz enzimi normal şartlarda 72°C'de çalışır ancak ortama katılan kimyasal olarak modifiye edilmiş (Fluoresan işaretli) ddNTP'ler bu sıcaklıkla uyum sağlamadıkları için daha düşük ısılar tercih nedenidir.

Reaksiyon sırasında lineer bir artış elde edilir. Bu reaksiyon klasik ısı döngü cihazlarında gerçekleştirilir. Bu yöntemde PZR'ın ana prensibi ile DNA polimeraz ile primerin 3' ucundan DNA sentezi başlatılmakta ve her bir yeni nükleotid son eklenen nükleotidin 3'-OH grubuna eklenmektedir. Dideoksi metodu ismini reaksiyonda kritik bir rol oynayan 3' karbon atomunda -OH'in eksik olduğu sentetik nükleotidden alır. Dideoksinükleotidlerin reaksiyona uygun konsantrasyonlarda eklenmesiyle de oluşan DNA oligonükleotid zincirlerinin uzaması, diğer nükleotidin bağlanması için gerekli olan 3'-OH eksik olduğu için rasgele bir biçimde sonlanmaktadır. Bu sebeple dideoksi metodu zincir sonlanma metodu olarak da adlandırılmaktadır. Sonlandırıcı özellikteki bu bazlar 4 farklı floresan boya (veya radyoaktif madde, kemilüminesans maddeler) ile

işaretlenir ve reaksiyon 4 farklı tüpte, 4 ayrı reaksiyon karışımı halinde gerçekleştirilir. Reaksiyonun sonucunda, elimizde deoksinükleotidlerle uzamış ve dideoksinükleotidlerle sonlanmış çeşitli uzunlukta diziler üretilmiş olur. Tüm dizilerin 5' uçları aynıdır ancak 3' uca özgün baza göre uzunlukları değişecektir. Bu dizilerin son bazıları otomatik dizi analizi cihazlarında okunabilmektedir. Karakteristik fluoresan renkleri ise poliakrilamid jelde de belirlenebilmektedir (55, 56).

2.4.3. Gümüş Boyama DNA Dizi Analizi

Gümüş boyama, yaklaşık 20 yıl önce poliakrilamid jelde az miktarda proteinleri ortaya çıkarmak için oldukça duyarlı bir yöntem olarak ortaya çıkarılmıştır. Daha sonra gümüş boyama, elektroforez ile ayrılan diğer değişik biyolojik moleküllerle de çalışılarak genişletilmiş ve kusursuz bir şekilde uygulanmaya başlamıştır. Günümüzde DNA gümüş boyama poliakrilamid jelde DNA fragmentlerinin yüksek duyarlılıkta saptanmasında kullanılmaktadır (57).

Gümüş boyamanın genellikle 2 uygulama metodundan biri kullanılır. İlkinde jeli boyamak için diamin veya amonyaklı gümüş solüsyonları ve görüntünün gelişmesi için de formaldehitin sulandırılmış asit solüsyonları kullanılır. Diğerinde ise, jel boyama için zayıf asidik yapıda gümüş nitrat kullanılır ve gümüşü alkali duruma indirgemek için formaldehit kullanılır. Bununla birlikte diamin alkalın metodu daha az duyarlı fakat kalın jeller için daha uygun olduğu, buna karşın asidik metodun ise hızlı ve ince jellerle çalışıldığında daha iyi sonuç verdiği ifade edilmektedir (58).

Görüntü gelişmesi sırasında hemen hemen bütün boyama prosedürleri gümüşü metalik gümüşe indirger ve hemen sonra boyanan materyalin çevresinde tortu şeklinde kalır. Optimal görüntü kontrastı için poliakrilamid matriksde gümüş indirgeme seviyesi minimumda tutulmalıdır. Buda genellikle gümüş kompleksasyonunun veya jel matriksindeki gümüş emilim gücünün minimumda tutulması ile gerçekleşir. Buda hızlı redüksiyon işleminin uygun ayarlanmasıyla başarılmaktadır (başlıca pH, gümüşün veya indirgeme ajanının konsantrasyonuna ve reaksiyonun oran sabitine bağlıdır). Örneğin; gümüş iyonlarının kompleksasyonu, gümüş konsantrasyonunu ve oran sabitinin her ikisini azaltır bu da metalik gümüş ile ayrılan bantların seçici boyanmasına izin verir. Bu işlem termodinamik olarak değil, gümüş redüksiyon kinetiğine bağlı olarak meydana gelir (55, 58).

Prencip: Gümüş Boyama DNA Dizi Analizi sistemi bir ısı döngüsü sekans sistemidir. Bu teknikte yükseltelen ısı derecelerinde ilave edilen nükleotidlerle *Taq* DNA polimerazın birleşme yeteneği kullanılmaktadır. Sekans reaksiyonu; miktarı pmol-fmol (10^{-12} - 10^{-15}) olan DNA, tek bir hedefe spesifik sense-primer, deoksi ve dideoksinükleotidlerin optimum oranlarında karıştığı A, C, G ve T nükleotidleri ve Sequencing Grade *Taq* DNA polimeraz kullanılarak hazırlanır. Daha sonra reaksiyon; 95°C'de denatürasyon ve 42-70°C'de yani primerlerin optimize olduğu sıcaklıkta annealing/extension aşamaları 45-60 siklus olacak şekilde ısı döngü cihazında gerçekleştirilir. Reaksiyon ürünleri standart sekans jelinde yürütülür ve ürünler gümüş boyama tekniği ile görünür hale getirilirler (59).

Bu sistemin non-radyoaktif olması en önemli avantajlarından biridir. Bu nedenle bu sistemle yapılan dizi analizi, geleneksel radyoaktif metotlardan daha güvenlidir. Sonuçlar 1 gün içerisinde elde edilebilir. Radyoaktif sekans sisteminde ise filme aktarmak için gereken en az 1-2 günlük süre, radyoizotop maliyetinin ve bu radyoaktif maddelerin çevreye atılımının olmaması bu sistemi daha avantajlı hale getirmektedir (59).

Aslında gümüş boyama, küçük miktarda nükleik asitin tespitinde etkili olarak kullanılmaktaydı. Ancak, kompleks DNA profillerinin analizi gibi daha dikkat gerektiren uygulamalar gümüş boyama protokolünün çok yönlü kullanımını gerektirmiştir. Kompleks nükleik asit karışımları çok ince poliakrilamid jellerde ayrılırlar ve oluşan bantlar yüksek duyarlılıkta güvenilir bir şekilde tespit edilmelidirler (59).

Bu sistemde kullanılan gümüş boyama prosedürü, foto-kimyasal olarak oluşturulan gümüş boyama tekniğine dayanır. Gümüş nitrat emdirilen ajan ve formaldehit (alkali ortamda) indirgeyici ajan olarak kullanılır. Emdirmede formaldehit içeren bir solüsyonun içinde göreceli olarak düşük konsantrasyonda gümüş kullanılır. Görüntünün gelişmesi (development) yüksek konsantrasyonda formaldehit kullanılarak meydana gelmektedir ve reaksiyon tiyosülfatın varlığında düşük sıcaklık derecesinde (8-12°C) gerçekleştirilir. Tiyosülfat kimyasal olarak gümüş tuzlarının kompleksasyonu ile çözülmektedir. Bu işlem, jel yüzeyindeki çözünmemiş gümüş iyonlarının eritilmesiyle gerçekleşmektedir ve böylece nonspesifik boyanmalar azalmaktadır. Yani gümüş redüksiyon kinetiğini değiştirerek jelde arka plan boyanmasını minimize etmektedir (57).

Pratikte gümüş boyama DNA dizi analizi sistemi ile gümüş boyama birkaç basamaktan oluşan basit bir tekniktir. Elektroforezden sonra sekans jeli elektroforez tamponunun, ürenin atılması ve küçük uzama ürünlerinin dağılmasının engellenmesi için asetik asitte fikse edilir. Fiksatifin uzaklaştırılması için jel birkaç kez ultra-pure distile su ile yıkanır. Daha sonra jel gümüş nitrat ve formaldehit karışımı ile boyanır. Ardından boyanan jel yıkanır ve daha sonra formaldehit ve sodyumtiyosülfat içeren alkalın sodyum bikarbonat tampon çözeltisi ile jelin banyo (developed) işlemi yapılır. Bu koşullar altında gümüş iyonları formaldehit ile birlikte metalik gümüşe indirgenir. Eklenen sodyumtiyosülfat ise metalik gümüşün serbest gümüş iyonlarına indirgenmesini önleyerek jelde arka plan boyanması (background staining-jelin kararması) engeller. Uygun banyo süresinden sonra jel yıkanır ve daha sonra kurutularak değerlendirme yapılır (59).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler

Çalışmaya Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı'ndan ağırlıklı olarak ADV, LAM ve IFN tedavisi almış 40 KHB'li hastanın serum örnekleri ile Adana'daki özel bir tıp merkezinde tedavi görmekte olan 21 KHB'li hastanın serum örnekleri dahil edilmiştir. Hastalardan 5 ml kan alınarak serumu ayrılıp -20 °C'de çalışılana kadar saklanmıştır. Ekstrakte edilen DNA, HBV PZR için kullanılmıştır. Polimeraz geninin C ve D domainlerini kodlayan bölgeleri semi-nested PZR ile amplifiye edilerek saflaştırılmış daha sonra ise DNA cycle-sequencing metodu ile dizi analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen diziler, gen bankasından temin edilecek dizi kayıtları ile karşılaştırılmış ve N236T ve K241E mutasyonunun varlığı araştırılmıştır.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

PZR cihazı (Thermal Cycler, 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 (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)
Sekans camları (Watman Biometra® glass plates)
Promega Silver Sequence DNA Sequencing System (Q4130)
Dizi analizi reaktifleri (Q4131)
Sequencing Grade *Taq* DNA polymerase
DNA Sequencing 5X Buffer
4 nükleotidin SILVER SEQUENCE d/ddNTP Mixes (Deaza)
DNA Sequencing Stop Solution
Boyama solüsyonları (Q4132)
Gümüş Nitrat (Silver Nitrate Q4133)
Q4134
Band Silane Solüsyonu
%37'lik Formaldehit
Sodyum tiyosülfat 10mg/ml
Sodyum karbonat
Distile Su
DNase, RNase Free Su
Primerler

3.2.3. Kullanılan Çözeltiler

1. Parçalayıcı (Lizis Tamponu)
Sükroz.....0.32 M
Tris-HCl (pH 7.5)10 mM
MgCl₂.....5 mM
Triton X 100.....%1

2. Fizyolojik Tampon
NaCl.....0.075 M
EDTA.....0.025 M
3. Tampon A
Tris-HCl (pH 8.0)..... 10 mM
EDTA2 mM
4. %10'luk SDS (Sodyum Dodecil Sülfat)
5. 2 M Tris-HCl (pH 7.5)
6. Proteinaz K (1 mg/ml)
Proteinaz K..... .10 mg
2 M Tris-HCl (pH 7.5).....50 µl
Distile su.....10 ml
7. Doymuş NaCl çözeltisi (~6M)
8. İzopropanol
9. % 70'lik Etil Alkol
10. TE Çözeltisi (pH 7.5)
Tris-HCl (pH 7.5).....1 mM
EDTA..... 1 mM

3.3. Yöntemler

3.3.1. Moleküler Analiz

3.3.1.1. HBV DNA Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmamıza, dahil ettiğimiz 61 KHB'li hastanın serum örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapıldı. Serum örneklerinden çalışılacak 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 (100mg/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 pellet kısmına zarar vermeden üst kısmı dikkatlice uzaklaştırıldı. Tüpler temiz kağıt havlular üzerine ters olarak koyularak 10 dakika bekletilerek kurutuldu. Pellet 20 µl steril distile su ile yavaş hareketlerle pipetaj yaparak çözdürüldü. Hazırlanan ekstrakt çalışılincaya kadar – 20°C'de saklandı.

3.3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

HBV'in ADV direncinden sorumlu önemli gen bölgeleri primer spesifik PZR tekniği ile çoğaltıldı. Direncin araştırılacağı hedef bölgeler ve bu bölgeler ile ilgili primer dizileri Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1.: ADV direncinden sorumlu polimeraz gen bölgelerine spesifik primer dizileri.

Polimeraz Gen Bölgesi	Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Ürün Uzunluğu (bp)
1. tur PZR	HBV sense external	5'- TGT GTC TGC GGC GTT TTA TC- 3'	641
	HBV-polrv2	5'- GCA AAG CCC AAA AGA CCC AC- 3'	
2. tur PZR	HBV sense internal	5'- CTT GTA TTC CGA TCC CAT CA- 3'	422
	HBV-polrv2	5'- GCA AAG CCC AAA AGA CCC AC- 3'	

PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. HBV'nün polimeraz 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 inci ve 2 nci tur reaksiyon karışımları Çizelge 3.2. ve 3.3.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2.: Polimeraz gen bölgesinin 1 inci tur PZR karışımı

PZR malzemeleri	Miktar (µl)
Distile su	35.75
MgCl ₂ (25 mM)	4
10X PZR tamponu	5
dNTP mix (10 mM)	1
Primer (sense external) (100 pmol/µl)	0.5
Primer (HBV-polrv2) (100 pmol/µl)	0.5
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.25
HBV DNA'sı	3
Toplam hacim	50

Çizelge 3.3.: Polimeraz gen bölgesinin 2 nci tur PZR karışımı

PZR malzemeleri	Miktar (µl)
Distile su	39.75
MgCl ₂ (25 mM)	2
10X PZR tamponu	5
dNTP mix (10 mM)	1
Primer (HBV sense internal) (100 pmol/µl)	0.5
Primer (HBV-polrv2) (100 pmol/µl)	0.5
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.25
1. tur PZR ürünü	1
Toplam hacim	50

Oluşturulan PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait ve üzerinde numaraları yazılı steril 0.2 µl'lik PZR tüplerine paylaştırıldı. Üzerlerine de DNA örnekleri konulduktan sonra ısı döngü cihazına yerleştirildi. Polimeraz gen bölgeleri için ısı döngü cihazında PZR koşulları Çizelge 3.4.'teki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.4.: ADV direncinden sorumlu mutasyonların görüldüğü polimeraz gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları (1 inci ve 2 nci 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, örneklere elektroforez uygulanmak üzere +4°C'ye kaldırılmıştır.

3.3.1.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

PZR ile ADV direncinden sorumlu gen bölgeleri amplifikasyonla çoğaltıldıktan sonra %1.5'lük agaroz jele yüklenerek ürünlerin elektroforezi yapıldı. 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 (HBV DNA'sı hariç PZR karışımı) kontroller kullanıldı.

- **Agaroz Jelin Hazırlanması**

Bir balon jodede 0.45 gr 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. Katılaşıma 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. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağı çalıştırıldı. Kullanılan mini tank için 30 mA akım verilerek elektrik akımı geçmesi sağlanarak örnekler 30-40 dakika boyunca yürütüldü. Yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin göçü takip ederek jelin 2/3'lük kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu. Jel tanktan çıkarılarak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-transluminatöründe incelendi ve jel görüntüleme sisteminde kayıtları yapıldı.

3.3.1.4. Polimeraz Gen Bölgesinin Tespiti

Agaroz jel elektroforez işleminden sonra polimeraz gen bölgesine spesifik primerlerin kullanıldığı reaksiyon tüplerinin elektroforezinde 422 bç hizasında gözlenen bantlar hedef polimeraz gen bölgesi olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.1.).

3.3.1.5. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

ADV'ye dirençten sorumlu gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılmış ürünlerinin dizi reaksiyonundan önce saflaştırma işlemi uygun görülmektedir. Bu amaçla 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 edildi. Karıştırılarak oda ısısında 10 dakika bekletildi. 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 nükleaz-free distile su, Tris-Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) [TE] tamponu veya 1X sekans tamponu ile süspanse edildi. Daha sonra ürünler %1.5'luk agaroz jele yüklenerek elektroforezi yapıldı. Oluşan bantların yoğunluğuna göre saflaştırılan DNA, sekans reaksiyonunda kullanılmak üzere nükleaz-free distile su ile sulandırıldı. Şekil 4.2.'de saflaştırılmış polimeraz gen bölgesi PZR ürünlerinin saflaştırmadan sonraki, Et-Br ile boyanmış %1.5'luk agaroz jel elektroforezinin UV ışık altındaki görüntüsü verilmiştir.

3.3.2. Sekans Reaksiyonu

Sekans reaksiyonu üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi (59). Her bir sekans reaksiyonu için 4 adet 0.2 ml'lik mikrosantrifüj tüpü sırasıyla Adenin (A), Sitozin (C), Guanin (G) ve Timin (T) olarak işaretlenerek 2 µl dideoksinükleotid (d/ddNTP) karışımı konuldu. Yaklaşık 20 µl (1 damla) mineral yağ, tüplerin üzerine ilave edildi Tüplerin kapakları kapatılarak +4°C'de sekans reaksiyon karışımı hazırlanıncaya kadar bekletildi.

Reaksiyonda kullanılacak DNA'lar denatürasyon amacı ile 80°C'de 2 dakika tutulduktan sonra buz üzerinde bekletildi. Çizelge 3.5.'de dizi analizi yapılacak olan her bir suş için gereken sekans reaksiyonunun hazırlanışı verilmiştir.

Çizelge 3.5.: Sekans reaksiyon karışımı (59).

Kullanılan Reaktif	Miktar (µl)
Hedef DNA	3
DNA Sequencing 5X Buffer	5
Primer (sense internal) (2 pmol/µl)	3
Nükleaz-free distile su	4.5
Sequencing Grade Taq DNA polymerase (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 mikrosantrifüj tüpleri ısı döngü cihazına, sıcaklık 95°C'ye ulaştığı zaman yerleştirildi. Dizi analizinde kullanılan reaksiyon programı Çizelge 3.6.'da verilmiştir.

Çizelge 3.6.: ADV direncinden sorumlu mutasyonların gözleendiği gen bölgesinin dizi analizinde kullanılan reaksiyon koşulları

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	∞	∞
Primer 24 bazdan fazla ve GC içeriği %50'den fazla ise		
95	2 dakika	1
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 Camların 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 (59).

- **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 (59).

- **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 (59).

3.3.2.2. Jel Solüsyonunun Hazırlanması ve Cam Kasete Dökülmesi

Jel 7 M üre içeren, %4-6'lık 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 kaynayınca 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 amonyum 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 (59).

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 (59).

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 5 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 ulaşmaya kadar, (yaklaşık 2 saat) ısıtıldı. Jel ısıtıldıktan sonra sivri dişli taraklar jelin üst kısmına hafifçe batırıldı. Yüklemeye başlanmadan 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 (59).

3.3.2.4. Sekans Jelinin Gümüş Boyanması

Bu protokole kullanılan solüsyonlar ve malzemeler aşağıda verilmiştir (59).

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 (59).

Asetik asit	200 ml
Bidistile su	1800 ml

Boyama Solüsyonu (59):

Gümüş Nitrat (AgNO ₃)	1 gr
Formaldehit (%37)	1.5 ml
Bidistile su	1000 ml

Banyo Solüsyonu (59):

Sodyum karbonat (Na ₂ CO 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

Jelin tespiti: Plastik tepsideki jel tespit-durdurma solüsyonu ile kaplandı ve boya 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 (59).

Jelin yıkanması: Jel 5'şer dakikadan 5 kez bidistile su ile çalkalanarak yıkandı. Bu aşamada asitin jelden tamamen uzaklaşması sağlandı (59).

Jelin boyanması: 2 saat boyama solüsyonu ile çalkalanarak muamele edildi (59).

Jelin yıkanması: Jel tepsi içerisine yerleştirilerek bidistile su ile 5-10 saniye, iki kez hızlı bir şekilde yıkandı (59).

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 başlayınca 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 (59).

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 (59).

Jelin yıkanması: Jel 2'şer dakikadan 2 kez bidistile su ile muamele edildi (59).

Jelin kurutulması: Jel oda ısısında tutularak kurumaya bırakıldı (59).

3.3.2.5. Görüntüleme

Jelde oluşan bantlar en iyi beyaz ışık (fluoresan ışık) üzerindeyken görülmektedir.

3.3.2.6. Değerlendirme

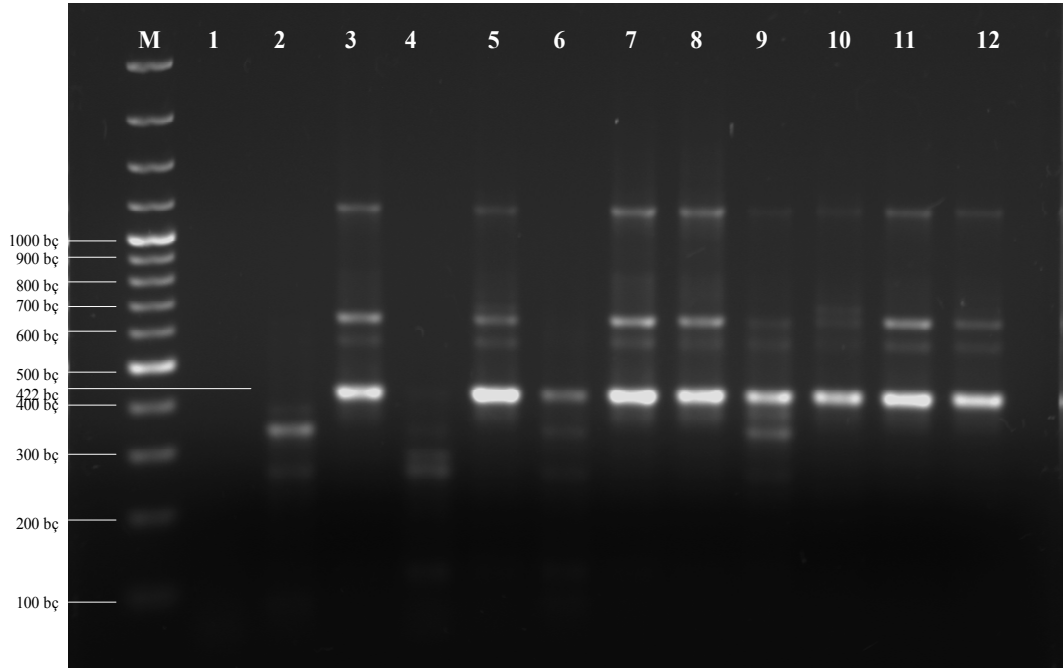
Değerlendirme aşamasında, Gen bankası veri tabanından elde edilen Z35716 kayıt numaralı dizi ile jelde oluşan diziler, 5' ucundan 3' ucuna doğru karşılaştırılarak okundu. Belirlenen nükleotid değişiklikleri kayıt edildi.

4. BULGULAR

4.1. Moleküler Analiz Sonuçları

4.1.1. PZR Aşaması

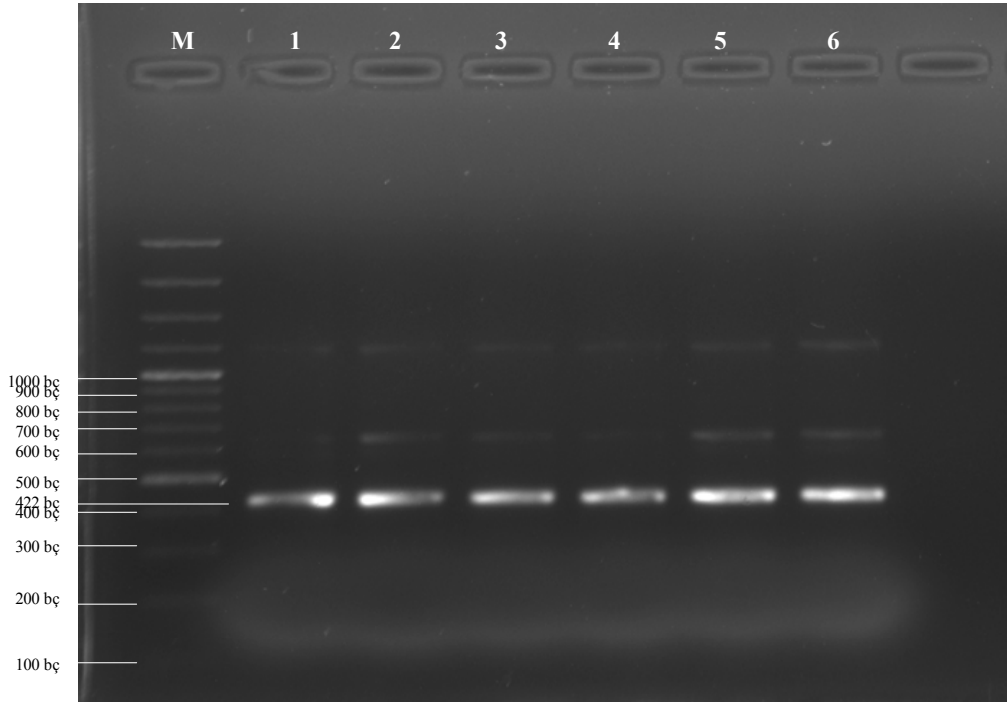
HBV'nün ADV ilaç direnci ile ilişkili mutasyonların gözlemlendiği bölgesi olan polimeraz gen bölgesi primer spesifik semi-nested PZR tekniği ile çoğaltılmıştır. PZR ürünleri Et-Br ile boyanmış %1.5'lük agaroz jel elektroforezinin UV ışık altındaki görüntüsü moleküler ağırlık standartı kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1.: Seminested PZR yöntemi ile belirlenen direnç ile ilişkili polimeraz gen bölgelerinin %1.5'lik agaroz jel elektroforezi ile gösterilmeleri. (Kolon M: Moleküler ağırlık standardı [GeneRuler 100 bp DNA ladder, Fermentas], Kolon 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12; HBV'lü hastaların örneklerinde amplifiye edilen ≈ 429 bç'lik polimeraz gen bölgesi PZR ürünü, kolon 1 ve 4; negatif amplifikasyon ürünleri)

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 saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış polimeraz gen bölgesi PZR ürünlerinin saflaştırmadan sonraki, Et-Br ile boyanmış %1.5'lük agaroz jel elektroforezinin UV ışık altındaki görüntüsü Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2.: Amonyum-asetat yöntemi ile saflaştırılmış polimeraz gen bölgelerinin PZR ürünlerinin %1,5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü. (Kolon M: Moleküler ağırlık standardı [GeneRuler 100 bp DNA ladder, Fermentas], Kolon 1, 2, 3, 4, 5, 6; ≈422 bç'lik saflaştırılmış polimeraz gen bölgesi PZR ürünleri)

Gümüş boyama DNA dizi analizi sistemi ile sekans reaksiyonu tamamlanan ve 7 M üre ile hazırlanmış sekans jelinde elektroforezine yüklenen örneklerin, elektroforez sonrası gümüş boyama metodu ile boyandıktan sonra floresan ışık altında GenBankasından elde edilen Z35716 nolu referans dizi ile karşılaştırarak değerlendirilmesi yapıldı. İlaç dirençli klinik izolatların elektroforez temelli gümüş boyama DNA dizi analizi metodu ile DNA zincirindeki her bir bazın (A, C, G, T) pozisyonu belirlendi. Referans dizi ile karşılaştırma sırasında saptanan N236T ve K241E nükleotid değişiklikleri ilaç direncinden sorumlu mutasyon olarak kabul edildi.

Çalışılan toplam 61 örneğin 5 (%8.19)'inde ADV direncinden sorumlu mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu mutasyonların %4.9'u K241E, %3.2'si ise N236T şeklindedir. Adefovir direnci ile ilişkili olduğu net olarak bilinen bu mutasyonlara ilaveten adefovir direnci ile muhtemel ilişkisi olabileceği ima edilen P237T (1 hasta, %1.6), P237H (1 hasta, %1.6), N238A (1 hasta, %1.6), N238R (2 hasta, %3.2), Y245H (2 hasta, %3.2) ve I233V (1 hasta, %1.6) mutasyon paternleri de çalışma grubumuzda tesbit edilmiştir. (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1.: Gümüş boyama DNA dizi analizi ile elde edilen sonuçlar ADV: Adefovir direnci ile ilişkili mutasyon, ADV?: muhtemel adefovir direnci ile ilişkili mutasyon).

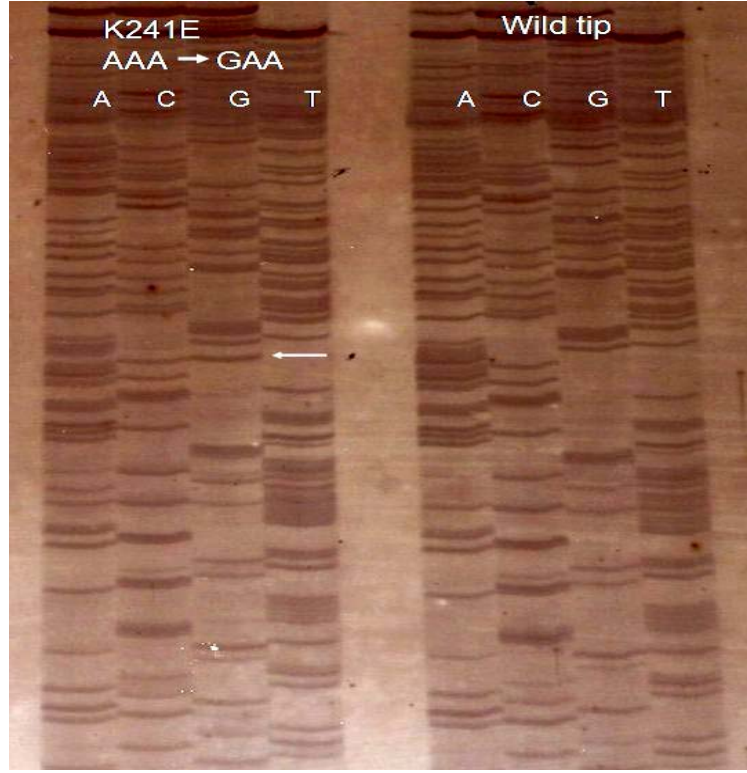
Sıra no	Hasta kodu	Hedef bölgede tespit edilen mutasyon türü
1	SS-M	Mutasyon yok
2	BK-M	Mutasyon yok
3	MG-M	Mutasyon yok
4	BAG-M	Mutasyon yok
5	İÖ-M	Mutasyon yok
6	Mİ-M	Mutasyon yok
7	SU-M	Mutasyon yok
8	ABY-M	Mutasyon yok
9	İİ-M	Mutasyon yok
10	SK-M	Mutasyon yok
11	ESE-M	Mutasyon yok
12	BE-M	Mutasyon yok
13	HŞ-M	Mutasyon yok
14	Aİ-M	Mutasyon yok
15	NT-M	Mutasyon yok
16	AB-M	Mutasyon yok
17	SA-M	Mutasyon yok
18	SM-M	Mutasyon yok
19	Mİ-M	Mutasyon yok
20	Aİ-M	Mutasyon yok
21	FO-M	Mutasyon yok
22	FD-M	Mutasyon yok
23	HA-M	Mutasyon yok
24	CB-M	rtN238A (ADV?)
25	AT-M	Mutasyon yok
26	MA-M	rtP237T (ADV?)
27	MÜ-M	Mutasyon yok
28	AA-M	Mutasyon yok
29	ŞÇ-M	rtI233V / rtK241E (ADV)
30	SÖ-M	rtK241E (ADV)
31	AK-M	Mutasyon yok
32	AKO-M	rtY245H (ADV?)
33	MYG-M	rtN238R (ADV?)
34	HK-M	rtN238R (ADV)
35	İS-M	rtY245H (ADV?)
36	HG-M	rtK241E (ADV)
37	PSS-M	Mutasyon yok
38	HY-M	Mutasyon yok
39	MK-M	rtP237H (ADV?)
40	DA-M	Mutasyon yok

41	MAA-A	Mutasyon yok
42	TY-A	Mutasyon yok
43	ŞE-A	Mutasyon yok
44	NÇ-A	Mutasyon yok
45	İP-A	Mutasyon yok
46	OK-A	Mutasyon yok
47	AD-A	Mutasyon yok
48	İÖ-A	Mutasyon yok
49	FA-A	Mutasyon yok
50	BÇ-A	Mutasyon yok
51	MÜ-A	Mutasyon yok
52	NC-A	Mutasyon yok
53	BA-A	Mutasyon yok
54	PTT-A	rtN236T (ADV)
55	NÖ-A	Mutasyon yok
56	AS-A	Mutasyon yok
57	İA-A	Mutasyon yok
58	MA-A	Mutasyon yok
59	BÇ-A	rtN236T (ADV)
60	EK-A	Mutasyon yok
61	YE-A	Mutasyon yok

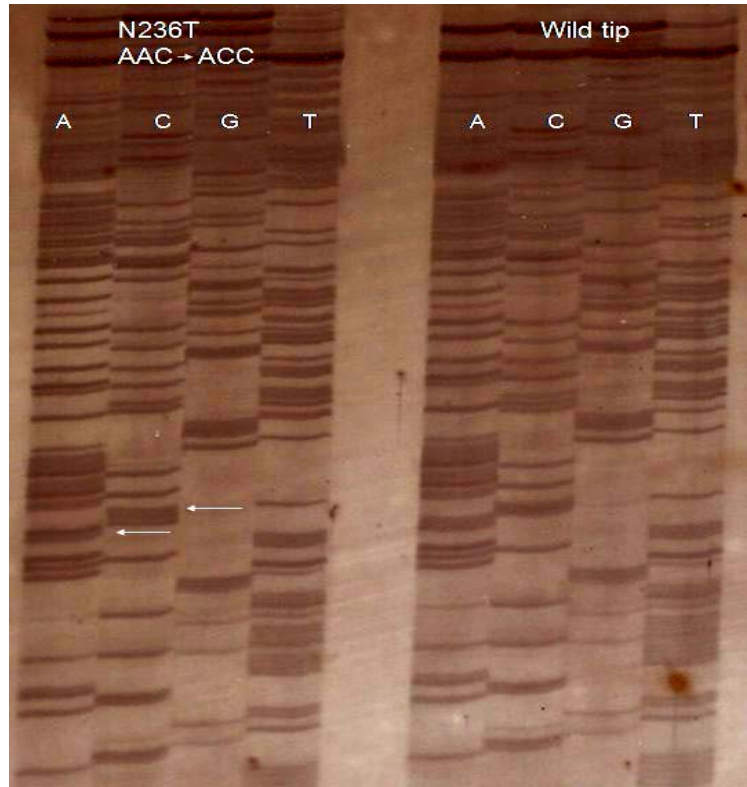
Çizelge 4.2.: Gümüş boyama DNA dizi analizi ile ADV direnci ve muhtemel ADV direnci ile ilişkili tespit edilen mutasyonlar

İzolot sayısı N=12	Mutasyonun lokalizasyonu (kodon)	Amino asit değişikliği
1 (%8.3)	237	P→T
1 (%8.3)	237	P→H
1 (%8.3)	238	N→A
2 (16.6)	238	N→R
2 (16.6)	236	N→T
2 (16.6)	245	Y→H
2 (16.6)	241	K→E
1 (%8.3)	233 ve 241	I→V ve K→E

Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'de çalışmamızda tespit ettiğimiz rtK241E ve rtN236T mutasyon tipleri gösterilmektedir.



Şekil 4.3.: ADV direnci ile ilişkili rtK241E mutasyonu



Şekil 4.4.: ADV direnci ile ilişkili rtN236T mutasyonu

5. TARTIŞMA

Son yıllarda diğer viral hastalıkların tedavisi için geliştirilmiş olan gansiklovir, LAM ve FAM gibi pek çok antiviral ilaç, günümüzde HBV replikasyonunu inhibe etmek amacıyla da kullanılmaktadır. Bu ajanlar her ne kadar HBV replikasyonunu baskılamakta oldukça etkili iseler de uzun süreli kullanımlarından sonra ilaca dirençli HBV suşları ortaya çıkmaktadır. Şu ana kadar ilaca bağlı en iyi tanımlanmış HBV mutantları LAM'a dirençli olanlardır ve bunlar HIV suşları ile aynı mutasyona sahiptirler (18).

Moleküler virolojik analizler, adefovir tedavisi altındaki HIV-HBV ko-infekte hastalarda adefovire dirence neden olan daha önceden görülmemiş rt A181T mutasyonunun tespit edildiği bildirilmiştir. Bu sebeple ko-infekte hastaların gözlenmesi sırasında, nükleosid analoglarına karşı HBV direncinin tespit edilmesi gerektiği bildirilmiştir (60).

Akut fulminant hepatitin tedavisinde kullanılan LAM ve ADV, HBV replikasyonunu inhibe ederek serum HBV düzeylerinde hızlı bir şekilde azalmaya neden olur. Akut HBV enfeksiyonundan sonra HBsAg'nin 6 aydan daha uzun süre pozitif olduğu hastalara kronik hepatit tedavisi almaya başlarlar (26).

KHB'nin siroz, HSK ve ölüme progresyonunu önlemek için etkili bir şekilde tedavi edilmesi gereklidir. KHB'si olan hastalarda tedavinin hedefleri kalıcı HBV-DNA baskılanması, serum ALT seviyesinin normalleşmesi ve karaciğer nekroinflamasyonunda iyileşme sağlanmasıdır. Uzun dönemde amaçlar ise sirozun, son dönem karaciğer hastalığının ve HSK gelişiminin önlenmesi, yaşam kalitesinde iyileşme ve daha sonra survinin uzatılmasıdır.

Oluşacak komplikasyonların tedavileri de göz önüne alındığında KHB'nin tedavisi maliyet-etkin olarak bulunmuştur. KHB'nin tedavisinde kullanılacak ilacın uygun risk-yarar profili olmalı, kalıcı etkinlik sağlamalı, sınırlı toksisitesi olmalı ve hiç veya minimal viral direnç gelişimi olmalıdır. KHB tedavisi için Türkiye'de onaylanmış olan ilaçlar IFN alfa ve interferon dışındaki tedavi seçenekleri ise LAM ve ADV gibi nükleozid analoglarıdır. Kullanılan diğer nükleozid analogları; FAM, adenin arabinosid, gansiklovir, pensiklovir, lobukavir, entekavir, emtrisitabin'dir.

Kronik HBV tedavisinde ilk seçenek olan LAM, bir sitozin analogu olup hepadnavirus DNA sentezini sonlandırarak virus replikasyonunu inhibe eder. Erişkin ve pediatrik hastalarda yapılan plasebo kontrollü klinik çalışmaların sonucuna göre 52 hafta LAM tedavisiyle HBV replikasyonunda azalma, ALT seviyelerinde normalleşme, HBeAg serokonversiyonu gelişimi ve karaciğer histolojisinde düzelme anlamlı olarak elde edilmiştir (3).

HBeAg (-) KHB'li hastalarda LAM tedavisiyle ilgili yapılmış bir kaç çalışmada HBV-DNA kaybı ve ALT normalleşmesi tedavinin 1. yılında %65-96 olarak bildirilmiştir. Fakat cevap veren hastaların %48-90'ında ilaç kesildikten sonra relaps gelişmiştir (61). HBV DNA'nın 10^5 kopya/ml'nin altına inmesinin virolojik yanıt olarak tanımlandığı 656 hastalık retrospektif, çok merkezli bir çalışmada ortalama 22 aylık LAM tedavisi sonrası virolojik yanıt %95 iken 4 yıl sonra %39 olarak bulunmuştur (3).

Uzun süre LAM alan hastalarda viral izolatların incelenmesi sonucu dirence neden olan bazı mutasyonlar tespit edilmiştir. HBV polimeraz enzimi A dan E ye isimlendirilen 5 farklı domainden oluşmaktadır. Bu domainlerden A,C ve D nükleotid trifosfatların bağlandığı ve katalizlendiği bölgelerdir. B ve E ise şablon RNA ve primerin karşılıklı getirilmesi ve aktif enzimatik bölgenin bu alana yanaşmasını sağlayan bölgelerdir (27).

LAM direnci HBV-DNA'nın tekrar pozitifleşmesi ve genellikle ALT yükselmesiyle karakterizedir. Kronik B hepatitli LAM kullanan hastalarda 6 ncı aydan itibaren genotipik direnç görülür. Direnç oranı farklı çalışmalarda farklı bildirilmiştir. Örneğin bir yıllık tedavi sonunda Asya çalışmasında %14, A.B.D. çalışmasında %32 direnç bildirilmiştir. Asya çalışmasında 2 yıllık takibi tamamlayan hastalarda toplam direnç oranı %40 olarak saptanmıştır (2 nci yıl tedaviye girmiş olan hastaların %31'i 2 nci yılda direnç geliştirmiş). Aynı hastaların 4 yıllık takiplerinde direnç oranının %66 ya çıktığı bildirilmektedir (27).

ADV ise, LAM'a dirençli ve mutant HBV infeksiyonları da dahil olmak üzere, hepatit B viral replikasyonu olan yetişkinlerde KHB tedavisinde kullanılan bir adenin nükleotid analogudur (2). ADV, dAMP'nin asiklik analogudur. ADV, KHB'nin tedavisi için A.B.D.'nde Eylül 2002'de, Avrupa'da Mart 2003'de ve Türkiye'de Ekim 2003'de onay almıştır.

ADV'nin in vitro olarak hepadnaviruslar, retroviruslar ve herpes viruslara karşı güçlü etkili olduğu gösterilmiştir (3). ADV'nin invitro olarak bilinen tüm LAM,

emtrisitabin, FAM ve HBIG'ye dirençli HBV'lerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir (36).

ADV'nin difosfat formu dAMP'nin DNA yapısına girmesini kompetitif inhibisyonla önler ve DNA sentezinde zincir sonlanması yapar. Antiviral etkisine ilave olarak ADV, NK hücreleri aktive eder, ve muhtemelen endojen IFN'ler aracılığı ile immün cevabı kuvvetlendirir. Ayrıca bir fare modelinde gösterildiğine göre ADV'nin doğal öldürücü lenfosit aktivitesini ve IFN alfa üretimini artıran immüno stimulatör etkisi mevcuttur (27).

Geniş plasebo kontrollü klinik çalışmalarda ADV'nin hem HBeAg (+) hem de HBeAg (-) KHB'li hastalarda biyokimyasal, virolojik ve histolojik iyileşme sağladığı gösterilmiştir. Aynı zamanda 48 haftaya varan tedavilerde bu ilaca karşı direnç gelişimi bildirilmemiştir.

ADV ile 3 yıla varan uzun dönem tedavinin sonuçlarında yanıtlarda virolojik, biyokimyasal ve histolojik cevabın stabil olduğu gösterilmiştir. 15 ülkenin 86 bölgesinden toplam 695 hastanın bulunduğu ADV'nin faz III klinik çalışmasındaki sonuçlara göre; KHB'li hastalarda 10 mg ADV tedavisi hastalarda HBV genotipi, HBeAg durumu (pozitif veya negatif) veya ırktan bağımsız olarak benzer antiviral etki göstermiştir. Bu çalışmada 96 ncı haftaya kadar hiçbir hastada ADV'ye direnç görülmezken, 96 ncı haftadan sonra sadece bir hastada ADV'ye direnç saptanmıştır. Bu hasta LAM tedavisine klinik ve virolojik yanıt vermiştir (3).

ADV direnci ile ilgili olarak en sıklıkla rastlanan ve bildirilen mutasyonlar polimeraz geninin reverse transkriptaz bölgesinde bulunan 241 inci nükleotidde K'dan E'ye, 236 ncı nükleotidde N'den T'ye ve 181 inci nükleotidde A'an V'ye dönüşüm şeklindedir. Yaptığımız bu çalışmada 3 hastada (%4.9) 241 inci nükleotidde K→E'ye dönüşüm şeklinde, 2 hastada (%3.2) da 236 ncı nükleotidde N→T'ye dönüşüm şeklinde mutasyona rastlanmıştır. Çalışmamızda rtA181V mutasyonuna rastlanmamıştır. Toplamda 2-3 yıllık tedavi süresince ADV direnç mutasyon oranı çalışmamızda %8.19 şeklindedir. Rastladığımız diğer mutasyonların adefovire direnç ile olan ilişkisi şimdiye kadar bildirilmemiştir. Ancak mutasyonların sıklıkla görüldüğü bölgelere yakın yerde yer alan nükleotid değişiklikleridir. Bu mutasyonların çalışılan 61 hastadaki dağılımları ise P237T (1 hasta, %1.6), P237H (1 hasta, %1.6), N238A (1 hasta, %1.6), N238R (2 hasta, %3.2), Y245H (2 hasta, %3.2) ve I233V (1 hasta, %1.6) şeklindedir (Çizelge 4.2.). Son zamanlarda bildirilen çeşitli çalışmalarda rtV84M, rtS85A, rtV214A, rtQ215S, rtA181T, rtI233V, rtP237H, rtN238T/D gibi bazı

mutasyonların adefovir direnci ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir (62). Bu mutasyonların bazıları bizim de tesbit ettiğimiz mutasyonlar olup, diğer bazıları ise bizim tespit ettiğimiz diğer mutasyonlara noktasal olarak oldukça yakın pozisyonlardadır. Hastaların tedavi takipleri ile bu mutasyonların adefovire karşı dirençte gerçekten rol oynayıp oynamadıkları netlik kazandırılması gereken yeni bir araştırma alanını oluşturmaktadır.

Kompanse KHB'li HBeAg negatif 185 hastanın 2:1 oranında randomize edildiği çok merkezli, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada 48 haftalık tedavi sonrası ADV tedavisi alan grupta anlamlı olarak histolojik, virolojik ve biyokimyasal iyileşme olduğu görülmüştür. Yan etki profili plaseboya benzer olarak bulunmuştur. ADV'ye dirençli HBV polimeraz mutasyonu görülmemiştir (3).

Yapılan klinik çalışmalar sonucu LAM'a dirençli KHB'li hastalarda da ADV'nin etkili olduğu kanıtlanmıştır (3). LAM'a dirençli hastalarda devam eden LAM tedavisine ADV eklenmesiyle veya ADV'nin tek başına verilmesiyle hastalarda virolojik ve biyokimyasal iyileşme olduğu gözlenmiştir (37).

LAM'a dirençli KHB enfeksiyonu olan 135 hastanın alındığı plasebo kontrollü bir başka çalışmada devam eden LAM tedavisine ADV eklenmesiyle 52 haftalık tedaviyle anlamlı olarak klinik, biyokimyasal ve virolojik fayda elde edilmiştir. KHB'si, kompanse karaciğer hastalığı ve LAM direnci olan HBeAg (+) 59 hastayla yapılan bir çalışmada hastalar; devam eden LAM tedavisine ADV eklenmesi, LAM +plasebo ve ADV +plasebo şeklinde randomize edilmişlerdir. 48 haftalık tedavi sonrası LAM + ADV grubu ile ADV monoterapisi alan grupta başlangıca göre ortalama serum HBV-DNA seviyelerindeki azalma, ALT normalleşme oranları ve HBeAg kaybı benzer bulunmuştur. LAM monoterapisi alan grupta serum HBV-DNA düzeyleri aynı kalmış ve çalışma boyunca anlamlı biyokimyasal ve serolojik değişiklik görülmemiştir. Yapılan bazı çalışmalar sonucu LAM'a dirençli KHB'li hastalarda tek başına ADV'yle tedavinin yeterli olduğu, YMDD mutasyonu olan hastalarda uzun dönemde LAM tedavisine devam etmenin bir avantajı olmadığı ileri sürülmüştür (3).

KHB tedavisinin gidişinde ADV'ye direnç gelişimi LAM'la karşılaştırıldığında sıklığı daha azdır ve daha geç oluşur (4). KHB'li 39 hastada 60 haftalık ADV tedavisi sonrası direnç gelişiminin değerlendirildiği bir çalışmada bu sürenin sonunda hiçbir hastada direnç gelişimi görülmemiştir (2).

Adefovire direnç oranları bir çok çalışmada genel olarak 48 inci haftada %0, 96 ncı haftada %2 ve 144 üncü haftada %7 bulunmuştur. Bu oranlar bizim sonuçlarımızla

(%8.19) paralellik göstermektedir. Homojen popülasyonda hastaları [HBeAg (-)] içeren başka bir çalışmada retrospektif olarak adefovire direnç oranları 2, 3, ve 4 üncü yıllarda sırasıyla %5, %11 ve %18 olarak bulunmuştur. 5 inci yılda yapılan bir analize göre direnç oranı %28 saptanmıştır (3).

KHB hastaların tedavisi sırasında mutant suşların ortaya çıkışı ile karşılaşılacaktır. HBV'nün primer antiviral direnci ile çok nadir karşılaşılabilineceğinden bahsedilmektedir (63). ADV'e karşı virolojik atak ile ilişkili HBV polimeraz gen mutasyonları, tek veya kombinasyon halinde rtA181V ve rtN236T mutasyonlarını içermekte olduğu belirtilmektedir. rtA181V mutasyonu tek başına veya rtN236T mutasyonları ile birlikteliği çok az sıklıkta gözlemlendiği bildirilmektedir (64).

Ülkemizdeki vakaların birinde, daha öncede ADV tedavisi almayan bir KHB'li bir hastada ADV'e karşı primer direncin saptandığı bildirilmiştir. Bu hastanın INF ve LAM ile başlayan tedavisinde 3 yılın sonunda LAM'e karşı direnç geliştiği saptanmış. Tedaviye ADV eklendikten sonra 8 inci ayda da tespit edilebilir seviyede HBV-DNA'ya rastlandığı bildirilmiştir. 11 inci ayda DNA dizi analizi ile rtA181T mutasyonunun tespit edildiği bildirilmiştir (63).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, KHB'li hastaların, lamivudin tedavisi sırasında ortaya çıkan yeni mutasyon patternleri ve adefovire karşı çarpaz direncinin gösterilmesi amaçlandığı belirtilmiştir. ADV tedavisinden önce ve sonra serumdan HBV'nün polimeraz geninin amplifikasyonu gerçekleştirilmiş ve reverse transcriptase geninde A181S şeklindeki yeni bir mutasyon, M204I mutasyonu ile birlikte tespit edildiği bildirilmiştir. Araştırmacılar, bu yeni mutasyon patterninin lamivudin tedavisi altındaki hastalarda, ADV'e karşı çarpaz direncin gelişimini arttırdığını gösterdiğini ifade etmişlerdir (65).

Yaptığımız bu çalışma Türkiye'de az sayıda yapılmış olan çalışmaların biri olup, HBV DNA'sını taşıyan 61 bireyde ADV'e karşı gelişen dirençten sorumlu tutulan mutasyon patterni %8.1 oranında tesbit edilmiştir. Bulduğumuz sonuçlar, HBV ile infekte toplumdaki ADV direncinden sorumlu tutulan bazı genomik değişiklikleri göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, yaptığımız bu çalışma ile Mersin ilinde HBV hastalarında ADV direnci ile ilişkili polimeraz gen hedef gen bölgesi analiz edilmiş ve bu gen bölgesinde meydana gelen mutasyon paterninin ortaya çıkarılmasının bölgemiz için önemli bir veri sağladığını düşünmekteyiz. Elde ettiğimiz sonuçlar özellikle hastalığın klinik tedavisinde çalışan klinisyenler için oldukça kıymetli bilgiler sağlamış ve tedavi stratejisinin yönlendirilmesine ciddi katkılar sağlamıştır. Bu çalışma ile başlayan ileri moleküler düzeydeki işbirliği, konu ile ilgili diğer bazı yeni çalışmaların da temelini atmış ve klinik ile yeni ortak çalışmalara başlanmıştır.

Çalışmada kullandığımız dizi analiz tekniği, nonradyoaktiftir 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 önemli avantaj sağlamaktadır. Bu açıdan, bu yöntemin bölgemizdeki HBV hastalarındaki antiviral ilaca karşı gelişen direnç ile ilişkili mutasyonların ortaya çıkarılmasında ve hastalarının klinik tedavisinin yönlendirilmesinde fayda sağlayan oldukça kullanışlı bir yöntemdir.

Çalışma ülkemiz çapında genellendiğinde güçlü bir direnç pattern bilgisinin elde edilebileceği aşikardır. Böylece bölgenin hatta ülkenin antiviral ilaç direnci ile ilgili mutasyon patternlerinin coğrafik dağılım ve hatta epidemiyolojik verileri oluşturulabileceğide söylenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Aşkar E.** Sağlık çalışanlarında hepatit B ve hepatit C seroprevalansı. Uzmanlık tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, **2006**.
2. **Schiff E, Lai CL, Hadziyannis S, Neuhaus P, Terrault N, Colombo M, Tillmann HL, Samuel D, Zeuzem S, Lilly L, Rendina M, Villeneuve JP, Lama N, James C, Wulfsohn MS, Namini H, Westland C, Xiong S, Choy GS, Doren SV, Fry J, Brosgart CL.** Adefovir dipivoxil therapy for lamivudine-resistant hepatitis B in pre- and post-liver transplantation patients. *Hepatology* **2003**;38:1419–1427.
3. **Kaya T.** Lamivudine dirençli kronik hepatit B'li hastalarda adefovir dipivoksilin etkinliği. Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa, **2006**.
4. **Lampertico P, Viganò M, Manenti E, Iavarone M, Sablon E, Colombo M.** Low resistance to adefovir combined with lamivudine: a 3-year study of 145 lamivudine-resistant hepatitis B patients. *Gastroenterology*. **2007**;133(5):1445–1451.
5. **Divrikli DK.** İstanbul ilinde çocukluk çağında hepatit B seroprevalansı ve kronik hepatit B insidansı. Uzmanlık Tezi, İstanbul Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, **2006**.
6. **Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S.** This week's citation classic. A "new" antijen in leukemia sera. *JAMA*, **1965**;191:541–546.
7. **Mahoney FJ.** Update on diagnosis, management, and prevention of Hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev*, **1999**;2:351–366.
8. **Seeger C, Mason WS.** Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*, **2000**;64:51–68.
9. Erişim; <http://www.stanford.edu/group/virus/1999/tchang/replication.htm> Erişim tarihi: 21.10.2007.
10. **Seyec JL, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P.** Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in Hepatitis B virus assembly and infectivity. *J Virol*, **1998**;72:5573–5578.
11. **Blitz L, Pujol FH, Swenson PD, Porto L, Atencio R, Araujo M, Costa L, Monsalve DC, Torres JR, Fields HA, Lambert S, Geyt CV, Norder H, Magnius LO, Echevarria JM, Stuyver L.** Antigenic diversity of Hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. *J Clin Microbiol*, **1998**;36:648–651.
12. **Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS.** Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol*, **2002**;40:1207–1209.

13. **Chu CJ, Lok ASF.** Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology*, **2002**;35:1274–1276.
14. **Zöllner B, Petersen J, Schafer P, Schröter M, Laufs R, Sterneck M, Feucht HH.** Subtype-dependent response of hepatitis B virus during the early phase of lamivudine treatment. *Clin Infect Dis*, **2002**;34:1273–1277.
15. **Lunn ER, Hoggarth BJ, Cook WJ.** Prolonged hepatitis B surface antigenemia after vaccination. *Pediatrics*, **2000**;105(6):e81.
16. **Ireland JH, O'Donnell B, Basuni AA, Kean JD, Wallace LA, Lau GKK, Carman WF.** Reactivity of 13 in vitro expressed hepatitis B surface antigen variants in 7 commercial diagnostic assays. *Hepatology*, **2000**;31:1176–1182.
17. **Akarca US.** Hepatit B virusu mutasyonları. Viral Hepatitle Savaşım Derneği. Erişim: http://www.vhsd.org/slayt_seti/hepatit_b_05.htm Erişim tarihi: 17.07.2007.
18. **Kıyan M.** Hepatit B virusu. *Viral Hepatit 2001*. In: Kılıçturgay K, Badur S (ed.). Viral Hepatitle Savaşım Derneği. İstanbul, **2001**:186–220.
19. **Baumert TF, Rogers SA, Hasegawa K, Liang TJ.** Two core promotor mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J Clin Invest*, **1996**;98:2268–2276.
20. **Günther S, Piwon N, Iwanska A, Schilling R, Meisel H, Will H.** Type, prevalence, and significance of core promoter/enhancer II mutations in hepatitis B viruses from immunosuppressed patients with severe liver disease. *J Virol*, **1996**;70:8318–8331.
21. **Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F, Itoh K, Akahane Y, Yotsumoto S, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M.** Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in the carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J Virol*, **1994**;68:2671–2676.
22. **Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR.** Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. *Hepatology*, **1998**;27:628–633.
23. <http://www.google.com.tr/search?hl=tr&q=treonin&btnG=Google%27da+Ara&meta=> Erişim tarihi: 06.08.2007.
24. **Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, Reybroeck GV, Zoulim F, Leroux-Roels G, Rossau R.** Line probe assay for monitoring drug resistance in Hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol*, **2000**;38:702–707.
25. **Malik AH, Lee WM.** Chronic hepatitis virus B infection: treatment strategies for the next millennium. *Ann Int Med*, **2000**;132:723–731.

26. Viral Hepatitle Savaşım Derneği. Viral Hepatit Tanı ve Tedavi Konsensus Toplantısı Ön Raporu. Erişim: http://www.vhsd.org/tani_ted_rehberi.htm Erişim tarihi: 21.08.2007.
27. **Akarca US.** Kronik B hepatitinde interferon dışı tedaviler ve interferon ile yapılan kombinasyonlar. *Viral Hepatit 2001*. In: Kılıçturgay K, Badur S (ed.). Viral Hepatitle Savaşım Derneği. İstanbul, **2001**:152–173.
28. **Akarca US.** Kronik B hepatitinde interferon tedavisi. Viral hepatitle savaşım derneği. Erişim: http://www.vhsd.org/slayt_seti/hepatit_b_07.htm Erişim tarihi: 07.10.2007.
29. **Wong DK, Cheung AM, Rourke K, Naylor CD, Detsky AS, Heathcote J.** Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis (see comments). *Ann Intern Med*, **1993**;119:312–323. Erişim: <http://www.annals.org/cgi/content/full/119/4/312> Erişim tarihi: 02.07.2007.
30. **Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF.** Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in polymerase region. *Hepatology*, **2001**;33:751–757.
31. **Lok ASF, Hussain M, Cursano C, Margotti M, Gramenzi A, Grazi GL, Jovine E, Benardi M, Andreone P.** Evolution of hepatitis B virus polymerase gene mutations in hepatitis B e antigen-negative patients receiving lamivudine therapy. *Hepatology*, **2000**;32:1145–1153.
32. Genom Laboratuvarı Direnç Mutasyonları. Erişim: <http://www.genom.gen.tr/hbv%20dna%20analiz.html> Erişim tarihi: 21.10.2007.
33. **Naharcı Mİ.** Kronik Hepatit B İnfeksiyonunda Tedaviye Direnç. <http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/ichastaliklari/files/dersler/233.pdf> Erişim tarihi: 10.10.2007.
34. **Di Marco V, Marzano A, Lampertico P, Andreone P, Santantonio T, Almasio PL, Rizzetto M, Craxi A.** Clinical outcome of HBeAg-negative chronic hepatitis B in relation to virological response to lamivudine. *Hepatology*, **2004**;40:883–891.
35. **Mutimer D, Pillay D, Shields P, Cane P, Ratcliffe D, Martin B, Buchan S, Boxall L, O'Donnell K, Shaw J, Hübscher S, Elias E.** Outcome of lamivudine resistant hepatitis B virus infection in the liver transplant recipient. *Gut*, **2000**;46:107- 113.
36. **Xiong X, Flores C, Yang H, Toole JJ, Gibbs CS.** Mutations in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir in vitro. *Hepatology*, **1998**;28:1669–1673.
37. **Perrillo R, Schiff E, Yoshida E, Statler A, Hirsch K, Wright T, Gutfreund K, Lamy P, Murray A.** Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B mutants. *Hepatology*, **2000**;32:129–134.
38. **Tenney DJ, Levine SM, Rose RE, Walsh AW, Weinheimer SP, Discotto L, Plym M, Pokornowski K, Yu CF, Angus P, Ayres A, Bartholomeusz A, Sievert W, Thompson G, Warner N, Locarnini S, Colonna RJ.** Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires

additional substitutions in virus already resistant to lamivudine. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **2004**;48:3498–3507.

39. **Ristig MB, Crippin J, Aberg JA, Powderly WG, Lisker-Melman M, Kessels L, Tebas P.** Tenefovir disoproxil fumarate therapy for chronic hepatitis B in human immunodeficiency virus/hepatitis B virus-coinfected individuals for whom interferon-alpha and lamivudine therapy have failed. *J Infect Dis*, **2002**;186:1844–1847.
40. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Hepatit B aşısı uygulaması hakkında genelge 29–9–**2003**/14408.
41. **Chen WN, Oon CJ, Koh S.** Horizontal transmission of a Hepatitis B virus surface antigen mutant. *J Clin Microbiol*, **2000**; 38: 938–939.
42. **Kurt H.** Klinik Bulgular. In: Kılıçturgay K (ed.). *Viral Hepatit 2001*. Viral Hepatitle Savaşım Derneği. İstanbul, **2001**:129–134.
43. **Bilgiç A.** Hepatit B virusu ve serolojik tanı. Viral Hepatitle Savaşım Derneği. Erişim: http://www.vhsd.org/slayt_seti/hepatit_b_01.htm Erişim tarihi: 21.10.2007.
44. **Sönmez E.** Antiviral direnç monitorizasyonu ve klinik yararı. *Klinik Dergisi*, **2001**;14(2):66–70.
45. **Ülger M.** Mersin ilinde izole edilen streptomisin dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi izolatların *rpsL* ve *rrs* gen bölgesi mutasyonlarının DNA dizi analizi ile gösterilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, **2007**.
46. **Durmaz R.** *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul, **2001**.
47. **Harper DR.** *Molecular Virology: A Medical Perspectives Book*, 1st.Ed., UK: BIOS Scientific Publishers Limited, **1994**.
48. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Book 2, 2nd. Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**.
49. **Serin MS.** Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR). Aslan G, Emekdaş G, Köksal F, Serin M.S. IV. Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan İnfeksiyonlar Simpozyumu: Uygulamalı Moleküler Kurs Kitabı, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın No. 51*, Mersin, **2005**:37–52.
50. PCR-Symposium. Erişim: <http://derma.klinikum.unimuenchen.de/Alte%20Seiten/PCRsymposium.htm>. Erişim tarihi: 10.02.2007.
51. **Taylor GR.** Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In: McPherson M.J, Quirke P, Taylor G.R. *PZR Volume 1: A Practical Approach*, 1st Ed. New York: Oxford University Press, **1991**:1–14.

52. **McPherson MJ, Moller SG.** PZR: The Basics from Background to Bench, 1st. Ed., UK: BIOS Scientific Publishers Limited, **2000**.
53. **Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Furuta Y, Norkrans G.** Hepatitis B virus carriers without precore mutations in hepatitis B e antigen-negative stage show more severe liver damage. *Hepatology*, **1996**; 24:494–501.
54. **Persing DH.** In vitro nucleic acid amplification techniques. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. (eds). Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications. *American Society For Microbiology*, Washington DC **1993**:51–87.
55. **Ban M.** DNA Sequencing and PCR Methods. *Techniques in Neuroscience*. **2006**:5(6):18–19.
56. **Horasanlı S.** Dizi Analizleri ve Biyoinformatik. In: Ustaçelebi Ş., Abacıoğlu H., Badur S. *Moleküler, Klinik ve Tamsal Viroloji*. 1. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, **2004**:89–99.
57. **Caetano-Anollés G, Gresshoff PM.** Staining Nucleic Acids with Silver: An Alternative to Radioisotopic and Fluorescent Labeling. *Promega Notes Magazine*. **1994**:45;13.
58. **Qu L, Li X, Wu G, Yang N.** Efficient and sensitive method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. **2005**:(26):99–101.
59. Promega Technical Manuel. Siver Sequence™ DNA Sequencing System, Instructions for use of products Q4130, Q4131 and, Q4132. Erişim: www.promega.com Erişim tarihi: 05.11.2006.
60. **Lacombe K, Ollivet A, Gozlan J, Durantel S, Tran N, Girard PM, Zoulim F.** A novel hepatitis B virus mutation with resistance to adefovir but not to tenofovir in an HIV-hepatitis B virus-coinfected patient. *Aids*, **2006**;20:2229–2231.
61. **Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A, Papaioannou C.** Efficacy of long-term lamivudine monotherapy in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* **2000**;32:847–851.
62. **Esoda KB, Miller MD, Arterburn S.** Pooled analysis of amino acid changes in the HBV polymerase in patients from four major adefovir dipivoxil clinical trials. *Journal of Hepatology*, **2007**;47:492–498.
63. **Yamazhan T, Sertöz R, Pullukçu H, Taşbakan M, Ulusoy S, Erensoy S.** A case of chronic hepatitis B with primary adefovir resistance. *Mikrobiyol Bul.*, **2007**;41(2):297-301.
64. **Qi X, Xiong S, Yang H, Miller M, Delaney WE.** In vitro susceptibility of adefovir-associated hepatitis B virus polymerase mutations to other antiviral agents. *Antivir Ther*, **2007**;12(3):355–362.
65. **Karataylı E, Karayalcin S, Karaaslan H, Kayhan H, Turkyilmaz AR, Sahin F, Yurdaydin C, Bozdayi AM.** A novel mutation pattern emerging during lamivudine treatment shows cross-resistance to adefovir dipivoxil treatment. *Antivir Ther*, **2007**;12(5):761–768.

ÖZGEÇMİŞ

21.12.1980 tarihinde Konya ilinde doğdu. Liseyi Mersin Yusuf Kalkavan Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2000 yılında Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2005 yılında mezun oldu. 2005 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrencisi olarak öğrenimine devam etmektedir.

Ayrıca lisansüstü eğitim süresi içerisinde 17.09.2007 tarihinden itibaren 6 aylık eğitim programı olan İstanbul Arnavutköy Polis Meslek Eğitim Merkezi'nde öğrenim görmektedir.