

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BİR YILDAN UZUN SÜRELİ ANTİVİRAL İLAÇ KULLANAN
KRONİK HEPATİT B HASTALARINDA DİRENÇ
MUTASYONLARININ SAPTANMASI**

Dr. Sibel AYDOĞAN

TIBBİ VİROLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. A. Dürdal US

Ankara

2011

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimim süresince bilimsel olarak her türlü desteği vermesinin yanında anlayışı, sevgisi ve çalışkanlığı ile her zaman çok büyük saygı duyacağım tez danışmanım Prof. Dr. A. Dürdal US' a sonsuz teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimlerinin yanında, verimli bir çalışma ortamı sağlayarak eğitimime katkıda bulunan Yrd. Doç. Dr. Koray Ergünay, Doç. Dr. Ahmet Pınar ve diğer tüm hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma ve tüm çalışmalarımda özveri ile yardımlarını esirgemeyen İrfan Atmaca' ya çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca varlıkları ile bana güç veren canım anneme ve kardeşime, sevgi ve ilgisiyle her zaman yanımda olduğunu bildiğim sevgili eşime ve biricik oğluma sonsuz teşekkürler.

ÖZET

Aydoğan, S. Bir Yıldan Uzun Süreli Antiviral İlaç Kullanan Kronik Hepatit B Hastalarında Direnç Mutasyonlarının Saptanması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Viroloji Yan Dal Uzmanlık Tezi, Ankara, 2011. Hepatit B virusu (HBV), tüm dünyada yaygın olarak görülen önemli bir viral hepatit etkenidir. HBV taşıyıcıları kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinoma gibi ciddi komplikasyonlar nedeniyle risk altındadırlar. Kronik hepatit B (KHB) enfeksiyonunun tedavisi etkin antiviral ilaçlarla mümkündür; ancak viral genomda ortaya çıkan ve ilaç direncine neden olan mutasyonlar, tedavinin klinik etkinliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle ilaca dirençli mutantların erken dönemde tespiti, tedavinin yönlendirilmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada, tedavi uygulanan KHB olgularında, ilaç direncinden sorumlu ana mutasyonların, genotipik yöntemler olan DNA dizi analizi (DA) ve ters hibridizasyon temeline dayalı "*Line ProB*" yöntemi (LiPA) (Inno-Lipa HBV DRv2, Innogenetics, Belçika) ile araştırılması ve mutasyonların saptanmasında bu iki yöntemin performanslarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Ünitesi'nde KHB tanısı ile takip edilen ve bir yıl ve/veya daha uzun süre lamivudin (LVD) tedavisi alan 38 hastaya ait serum örneği, bilgilendirilmiş onam alınarak dahil edilmiştir. Hastaların kadın erkek oranı 14/24, yaş ortalamaları ise 39.7 ± 2.51 yıl (13-65) olarak belirlenmiştir. On hasta örneği, düşük DNA düzeyi (<1000 kopya/ml) nedeniyle DA çalışmasına alınamamış; altı örnek ise, tekrarlayan uygulamalarda sonuçların değerlendirilememesi nedeniyle çalışma dışı bırakılmıştır. LiPA yönteminde ise, test kapsamında tüm hasta örneklerine uygulanan konsensus PCR pozitif örnekler değerlendirilmiştir. Buna göre çalışmada, toplam 38 hastanın 22'sinde DA yöntemi ile, 25'inde ise LiPA yöntemi ile mutasyon analizi yapılmıştır. DA ile değerlendirilen 22 örneğin 7'sinde, antiviral ilaç direnci ile ilişkili mutasyonlar saptanmıştır. Tekli mutasyon saptanan örnekler; 2 olguda Q215S (adefovir [ADV]-sekonder), 1 olguda N236T (ADV-primer) ve 1 olguda M204I (LVD-primer) şeklindedir. İki ve daha fazla mutasyon belirlenen örnekler ise; 2 olguda L180M+M204I (LVD primer ve onarıcı mutasyonları) ve 1 olguda L180M+M204V+S202G (LVD+entekavir [ECV] primer ve onarıcı mutasyon) olarak gözlenmiştir. LiPA testi ile, çalışılan 25 olgunun 6'sında LVD'e direnç oluşturduğu bilinen primer ve onarıcı mutasyonlar (2 örnekte L80V/I+M204I, 2 örnekte L80I+L180M+M204I, 1 örnekte L180M+M204I ve 1 örnekte L80I+M204I) birarada saptanırken, 1 olguda LVD direnciyle ilişkili bir primer mutasyon (M204V) belirlenmiştir. Hiçbir hasta örneğinde ADV direncine neden olan mutasyon izlenmemiştir. DA yönteminde LiPA testinde saptanan dirençle ilişkili tüm primer mutasyonlar saptanmış; ek olarak LiPA testinde yer verilmeyen ECV direnci ile ilişkili bir mutasyon (S202G) daha gözlenmiştir. DA testi ile N236T mutasyonu saptanan bir örnekte ise LiPA testinde M204V mutasyonu izlenmiştir. Sonuç olarak, HBV antiviral ilaç direnci ile ilgili mutasyonların saptanmasında DA ve LiPA yöntemleri ile, bir hasta örneği dışında uyumlu sonuçlar alınmıştır. LiPA testi uygulama ve değerlendirme aşamalarında daha pratik bir yöntem olarak değerlendirilmiştir. Saptanan ilaç direnci mutasyon profillerinin literatür sonuçları ile benzerlik gösterdiği de izlenmiştir. Çalışmamız, üniversitemizde bu konuda yapılan ilk çalışma olup, elde edilen bulguların bundan sonraki çalışmalar için bir temel oluşturacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Hepatit B virusu, antiviral ilaç direnci, DNA dizi analizi, Inno-Lipa testi.

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 09D09101007).

ABSTRACT

Aydoğan, S. Detection of Resistance Mutations in Chronic Hepatitis B Patients Who Were Receiving Antiviral Therapy for Over One Year. Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Medical Virology Specialization Thesis, Ankara, 2011. Hepatitis B virus (HBV) is a frequent and globally-distributed cause of viral hepatitis and infected individuals are under increased risk for chronic hepatitis B (CHB), cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The suppression of HBV replication can be achieved via antiviral therapy but the efficacy of such treatment is significantly affected by the emergence of resistant HBV strains due to point mutations in the viral genome. Therefore, the early identification of resistant strains is crucial for optimal antiviral therapy. In this study, primary mutations conferring HBV antiviral resistance and associated secondary/compensatory mutations have been investigated by DNA sequencing (SEQ) and a commercial Line Probe Assay (LiPA) (Inno-Lipa HBV DRv2, Innogenetics, Belgium). A total of 38 subjects under follow-up for CHB and receiving lamivudine (LVD) therapy for one year or longer at the Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Gastroenterology Unit have been included in the study with informed consent. Male to female ratio and mean age was noted as 24/14 and 39.7 ± 2.51 (13-65) years, respectively. Ten samples were excluded from SEQ due to low viral load (<1000 copies/ml) and 6 samples could not be interpreted due to insufficient results. All samples with a positive consensus PCR were further analysed via LiPA, as directed by the manufacturer. Therefore a total of 22 and 25 samples could be evaluated via SEQ and LiPA assays, respectively. In 7 of the 22 samples evaluated via SEQ, primary and secondary mutations associated with resistance were identified. Single point mutations observed in SEQ comprise Q215S (adefovir [ADV]-secondary) in 2, N236T (ADV-primary) in 1 and M204I (LVD-primary) in 1 sample(s). Multiple mutations that comprise L180M+M204I (LVD primary + compensatory) in 2 and L180M+M204V+S202G (LVD + entecavir [ECV] primary + compensatory) in 1 samples have also been identified via SEQ. In LiPA, LVD resistance-associated primary and secondary mutations (L80I+L180M+M204I in 2, L80V/I+M204I in 2, L180M+M204I in 1 and L80I+M204I in 1) have been observed in 6 out of 25 samples. In one sample, a primary mutation associated with LVD resistance (M204V) was also identified in LiPA. No specific mutation for ADV resistance have been recognized by LiPA assay. SEQ further revealed another mutation associated with ECV resistance (S202G) which is not included in the LiPA method. Discordant results were identified in a single sample, where SEQ revealed a N236T mutation and LiPA result interpreted as M204V mutation. As a result, SEQ and LiPA displayed comparable performances for the detection of HBV drug resistance mutations and LiPA was interpreted as being more practical for the diagnostic laboratory. Being the pilot study for our institution, the results from this work will surely provide a basis for future diagnostic and research surveys.

Keywords: Hepatitis B virus, antiviral drug resistance, DNA sequencing, Inno-Lipa assay.

This study has been supported by Hacettepe University Scientific Research Unit (Project no: 09D09101007).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Sınıflandırma	4
2.3. Hepatit B Virusunun Yapısı	4
2.3.1. Virion	4
2.3.2. Genomik Organizasyon ve Viral Proteinler	7
2.3.3. Genotip ve Serotipler	8
2.3.4. Subviral Partiküller	9
2.4. Hepatit B Virusunun Replikasyonu	10
2.4.1. Hücreye Tutunma ve Giriş	10
2.4.2. Transkripsiyon ve Translasyon	11
2.4.3. Paketlenme, DNA Sentezi ve Salınım	12
2.5. Hepatit B Virus Mutantları	14

2.5.1. Prekor/Kor Geni Mutasyonları	14
2.5.2. Yüzey Geni Mutasyonları	15
2.5.3. X Geni Mutasyonları	16
2.5.4. Polimeraz Geni Mutasyonları	16
2.6. Hepatit B Virus Enfeksiyonu	17
2.6.1. Patogenez ve İmmünite	17
2.6.2. Klinik Bulgular	21
2.6.3. Gizli Hepatit B Enfeksiyonu	25
2.6.4. Epidemiyoloji	25
2.7. Hepatit B Virus Enfeksiyonlarının Tanısı	28
2.7.1. Serolojik Tanı	29
2.7.2. Moleküler Tanı	32
2.8. Hepatit B Virus Enfeksiyonlarının Tedavisi	33
2.8.1. Antiviral Ajanlar	34
2.8.1.1. Alfa İnterferonlar	35
2.8.1.2. Nükleoz(t)id Analogları	36
2.8.2. Antiviral İlaçlara Direnç Mekanizmaları	38
2.8.3. Direnç Tespiti ve İzlenmesi	40
2.9. Hepatit B Virus Enfeksiyonlarından Korunma ve Aşı	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Çalışma Grubu	43
3.2. Etik Kurul Onayı	43
3.3. Hepatit B Virusunda İlaç Direncine Neden Olan Mutasyon Varlığının Saptanması	44
3.3.1. DNA Dizi Analizi	44

3.3.1.1. Yöntemin Mekanizması	44
3.3.1.2. Yöntemin Uygulanması	45
3.3.2. Inno-Lipa HBV DR v2 İlaç Direnç Testi	50
3.3.2.1. Yöntemin Mekanizması	50
3.3.2.2. Yöntemin Uygulanması	51
4. BULGULAR	56
4.1. Demografik Bulgular	56
4.2. Hastaların HBV Serolojik Göstergeleri, HBV DNA ve Karaciğer Enzim Düzeyleri ile İlgili Bulgular	56
4.3. Antiviral İlaç Direncine Neden Olan Mutasyonların Saptanmasında Kullanılan Testlerin Bulguları	58
4.3.1. HBV DNA Polimeraz Bölgesinin Dizi Analizi ile Elde Edilen Bulgular	59
4.3.2. Inno-Lipa HBV DR v2 Testi ile Elde Edilen Bulgular	62
5. TARTIŞMA	68
KAYNAKLAR	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

Aa	Aminoasit
ADV	Adefovir
ALT	Alanin aminotransferaz
Anti-HBc	Hepatit B kor antijenine karşı gelişen antikor
Anti-HBe	Hepatit B erken (<i>early</i>) antijenine karşı gelişen antikor
Anti-HBs	Hepatit B yüzey (<i>surface</i>) antijenine karşı gelişen antikor
AST	Aspartat aminotransferaz
AuAg	Avustralya antijeni
Bç	Baz çifti
BKP	Bazal kor promotor
C	Kor (<i>core</i>)
cccDNA	<i>Covalently closed circular DNA</i>
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
cDNA	Komplementer (<i>complementary</i>) DNA
CTL	Sitotoksik T lenfosit
DA	DNA Dizi analizi
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECV	Entekavir
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplazmik retikulum
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
HBcAg	Hepatit B kor (core) antijeni

HBeAg	Hepatit B erken (<i>early</i>) antijeni
HBIG	Hepatit B immüoglobulini
HBsAg	Hepatit B yüzey (<i>surface</i>) antijeni
HBV	Hepatit B virusu
HCC	Hepatoselüler karsinoma
HCV	Hepatit C virusu
HIV	İnsan immün yetmezlik virusu (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
IFN	İnterferon
IFN- α	İnterferon-alfa
IFN- β	İnterferon-beta
IgG	İmmüoglobulin G
IgM	İmmüoglobulin M
KHB	Kronik hepatit B
LdT	Telbivudin
LHBs	Büyük (<i>large</i>) yüzey proteini
LVD	Lamivudin
M	Molar
MALDI TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation-Time of flight</i>
MHBs	Orta (<i>medium</i>) yüzey proteini
μ l	Mikrolitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı (<i>messenger</i>) RNA
NA	Nükleoz(t)id analogu
NK	Doğal öldürücü (<i>Natural Killer</i>) hücre
ORF	Açık okuma çerçevesi (<i>Open reading frame</i>)

P	Polimeraz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (<i>Polymerase chain reaction</i>)
Peg IFN- α	Pegile interferon-alfa
pgRNA	Pregenomik RNA
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	Ribonükleik asit
RT	Ters (<i>reverse</i>) transkriptaz
SHBs	Küçük (<i>small</i>) yüzey proteini
TDF	Tenofovir
T _H	Yardımcı (<i>helper</i>) T hücresi
TNF	Tümör Nekrozis Faktör (<i>Tumor necrosis factor</i>)
YIDD	Tirozin-İzolösin-Aspartat-Aspartat motifi
YMDD	Tirozin-Metiyonin-Aspartat-Aspartat motifi
YSDD	Tirozin-Serin-Aspartat-Aspartat motifi
YVDD	Tirozin-Valin-Aspartat-Aspartat motifi

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. HBV virionunun şematik yapısı	5
2.2. HBV genomik organizasyonu ve sentezlenen mRNA transkriptleri	6
2.3. HBV partiküllerinin şematik yapısı ve elektron mikroskopik görünüşleri	9
2.4. HBV virusunun replikasyon döngüsü	13
2.5. Akut hepatit B enfeksiyonunun seyri	22
2.6. Kronik hepatit B enfeksiyonunun seyri	23
2.7. Dünyada HBsAg pozitifliğinin coğrafi dağılımı	26
2.8. İyileşme ile sonuçlanan akut HBV enfeksiyonunda tanısal göstergeler	31
2.9. Kronik HBV enfeksiyonunda serolojik göstergeler	32
2.10. Kronik HBV enfeksiyonunun tedavi algoritması	34
2.11. Polimeraz geninde nükleoz(t)id analoglarına karşı primer direnç mutasyonları	39
3.1. Line Prob hibridizasyon testinin prensibi	51
3.2. Inno-Lipa HBV DRv2 test şeridi	54
3.3. Inno-Lipa HBV DRv2 testi okuma kartı	55
4.1. Çalışmaya alınan hastaların cinsiyet dağılımı	56
4.2. Kullanılan yöntemlerde çalışmaya alınan hasta sayıları	58

4.3. Mutasyon analizi yapılan hasta örneklerinin ortalama HBV DNA düzeyleri	59
4.4. DNA dizi analizi ile hasta örneklerinde saptanan mutasyonlar	61
4.5. Agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmede 867 bç büyüklüğünde bant oluşturan örneklerden bazıları	63
4.6(a). Inno-Lipa testi çalışma sonuçlarını gösteren 1 no'lu rapor kağıdı	64
4.6(b). Inno-Lipa testi çalışma sonuçlarını gösteren 2 no'lu rapor kağıdı	64
4.6(c). Inno-Lipa testi çalışma sonuçlarını gösteren 3 no'lu rapor kağıdı	65

TABLolar

	Sayfa
2.1. HBV varyantları ve hepatit B patogenezindeki potansiyel etkileri	18
2.2. HBV enfeksiyonunun tanı ve izleminde kullanılan serolojik göstergeler	30
2.3. Kronik HBV enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan antiviral ajanlar	35
3.1. İki turlu PCR için kullanılan primer dizileri	47
3.2. Birinci tur PCR bileşenleri ve reaksiyon koşulları	47
3.3. İkinci tur PCR bileşenleri ve reaksiyon koşulları	48
3.4. Inno-Lipa testi PCR bileşenleri	52
4.1. Çalışmaya alınan hastaların demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları	57
4.2. Aminoasit sembolleri ve nükleotid kodonları	60
4.3. DNA dizi analizi ile saptanan mutasyonlar ve oluşturdukları etkiler	62
4.4. Inno-Lipa HBV DRv2 testi ile saptanan mutasyonlar ve etkileri	66
4.5. Dizi analizi ve Inno-Lipa testleri ile saptanan mutasyonların karşılaştırmalı değerlendirilmesi	67

GİRİŞ

Hepatit B virus (HBV) enfeksiyonları, otuz yıldan uzun süredir etkili profilaktik aşının kullanılıyor olmasına rağmen, hala günümüzde siroz ve hepatoselüler karsinomaya (HCC) kadar ilerleyerek insan hayatını tehdit eden global bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Dünya üzerinde yaklaşık 2 milyar insan HBV ile enfekte olup, bunların yaklaşık 350 milyon kadarında ise kronik enfeksiyon gelişmektedir. Ayrıca her yıl yaklaşık 620 bin kişi hepatit B enfeksiyonuna bağlı olarak gelişen akut/kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinoma gibi hastalıklar sonucu hayatını kaybetmektedir (1).

Ülkemizde de HBV'ye bağlı kronik hepatit ve komplikasyonları, ayrıca hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) taşıyıcılığı önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. HBV sıklığı yönünden Türkiye orta endemik bir bölge olup, toplum genelinde HBsAg pozitifliği %5 olarak bildirilmiştir (2).

Kronik hepatit B enfeksiyonunun tedavi seçenekleri arasında, interferon (IFN)- α ya da pegile IFN- α 'nın yanında nükleozid ve nükleotid analogları yer almaktadır. Bu grup ilaçlar, viral polimeraz/ters transkriptaz enzimini inhibe ederek etki gösterirler. Bunlardan lamivudin ve adefovir dipivoksil, Avrupa Birliği ülkelerinde kronik hepatit B'nin tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır (3). Bunların dışında Amerika'da lisans almış entecavir ve HIV-1 enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan tenofovir de hepatit B enfeksiyonunun tedavisinde etkili bulunmuştur (4, 5). Türkiye'de ruhsat almış olan anti-viral ajanlar lamivudin, adefovir, entekavir ve tenofovirdir.

Tek bir viral polimeraz inhibitörü, kronik hepatit B enfeksiyonlu hastaların çoğunda kısa sürede HBV replikasyonunun baskılanmasını sağlar. Ancak bu etki, daha sonraki dönemlerde ortaya çıkan ilaç direnci nedeniyle devam edememektedir. Tedavinin etkinliği; kısa dönemde ortaya çıkan yan etkiler, uzun dönemde ortaya çıkan toksisite, daha önce uygulanan yetersiz tedaviler ve ilaca yetersiz maruziyet (bazı ilaçların farmakolojik özelliklerine bağlı olarak, hastanın ilaç kullanımına uyum gösterememesi veya konağın

genetik pleomorfizmi) gibi birçok faktöre bağılı olmakla birlikte, tedavide başarısızlığa neden olan en önemli faktör ilaç direncidir. Viral polimeraz geninde özgün mutasyonlar taşıyan dirençli suşların ortaya çıkmasıyla, bu grup ilaçlarla elde edilen tedavi başarısı tehlikeye düşmektedir. Herhangi bir ilaca karşı direnç gösteren suşlarda, grubun diğer üyelerine karşı da çapraz direnç oluşabilir veya diğer gruplara karşı duyarlılık azalabilir (3).

Kronik hepatit B tanısı ile takip edilen hastalarda, antiviral ilaç direncine neden olan mutasyonların erken dönemde tespiti, özellikle tedavi altındaki hastalarda klinik öneme sahiptir. Direnç mutasyonlarının saptanması, gereksiz ilaç kullanımının önlenerek erken dönemde en uygun tedavi protokolünün belirlenmesini sağlayacak ve sonuçta ciddi, hayatı tehdit eden siroz ve HCC gibi komplikasyonların gelişme insidansını azaltacaktır. Buna ek olarak, gereksiz ilaç kullanımının getireceği toksisite riski ve ekonomik yükün azaltılması da elde edilecek önemli kazanımlardır (3, 6).

Bu çalışmada; Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Ünitesi'nde kronik hepatit B tanısı ile takip edilen ve bir yıldan uzun süredir antiviral ilaç tedavisi alan olgularda, ilaç direncinden sorumlu ana mutasyonların, genotipik yöntemler olan DNA dizi analizi ve ters hibridizasyon temeline dayalı "*Line ProB*" yöntemi ile araştırılması ve mutasyonların saptanmasında bu iki yöntemin performanslarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma, üniversitemizde HBV ilaç direnci ile ilgili planlanan ilk çalışma olma özelliğine sahiptir. Bu yönüyle üniversitemizde gelecekte yapılacak araştırma ve rutin tanı uygulamalarına veri sağlayacağı düşünülmektedir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Viral hepatitler, ilk kez M.Ö. 5. yüzyılda Hipokrat tarafından "epidemik sarılık" terimi ile tanımlanmış ve tarih boyunca, özellikle de 19. ve 20. yüzyıldaki savaşlar sırasında sıkça ifade edilmiştir. Kan ve kan ürünleri ile direkt temas sonucu bulaşan hepatit formu, Almanya, Bremen'de çiçek aşısı kampanyası sırasında gözlenmiş; insan lenf sıvısından hazırlanan aşının uygulandığı tersane çalışanlarının %15'inde, birkaç haftadan sekiz aya kadar değişen sürede sarılık geliştiği izlenirken, aşının uygulanmadığı kişilerde enfeksiyon oluşmamıştır. XX. yüzyılın ilk yarısında veneryal hastalık, diyabet, tüberküloz ve kan transfüzyonu yapılanlar gibi değişik risk gruplarında "uzun inkübasyon süreli" sarılık salgınları bildirilmiştir (7). 1940'lı yıllarda gönüllü insanlarla yapılan çalışmalarda, sarılık etkeni olarak en az iki viral ajanın olduğuna dair kanıtlar elde edilmiştir. 1947 yılında Mc Callum ve Bauer, enfeksiyöz hepatit için "Hepatit A" ve serum hepatiti için "Hepatit B" isimlerini önermişlerdir (8, 9). 1965 yılında Blumberg ve arkadaşlarının değişik insan popülasyonlarındaki genetik farklılıklarla ilgili yaptıkları araştırma sırasında, bir Avustralya yerlisinin serumunda yeni bir antijen saptanmış ve önceleri Avustralya antijeni (AuAg) olarak isimlendirilen bu antijen, sonraki yıllarda hepatit B ile ilişkilendirilmiştir (10). Elektron mikroskopik çalışmalarda, AuAg pozitif hastaların serumlarında, bu antijeni içeren farklı tip partiküller saptanmış; sferik ve çubuk benzeri AuAg yapısının yanı sıra, viral genomu da içeren enfeksiyöz virus partikülleri ("Dane partikülü") gösterilmiştir. Böylece, Dane partikülünün insan hepatit B virusu olduğu, yüzeyinde daha önce AuAg olarak tanımlanmış antijenin bulunduğu ve ayrıca bir kor antijeni içerdiği belirlenmiştir (11). 1971 yılında Krugman, ısı ile inaktive edilen hepatit B yüzey antijeni pozitif serumların immünojenik olduğunu ve aşı olarak kullanılabileceğini göstermiş; 1972 yılında virusun erken (e) antijeni Magnius ve Espmark tarafından tanımlanmış; 1979 yılında ise viral DNA klonlanarak tam nükleotid dizisi çıkarılmıştır (12-14).

2.2. Sınıflandırma

Hepadnaviridae ailesinin bir üyesi olan hepatit B virusu (HBV), adını, enfeksiyonun tablosu, hepatotropik özelliği ve nükleik asit tipinden almıştır. Hepadnavirusların temel tanımlayıcı özellikleri; (a) Gevşek çembersel, kısmi çift zincirli 3 kilobaz (kb) büyüklüğünde DNA genomu, (b) Zarf ve nükleokapsidden oluşan 40 nm büyüklüğünde virionlar, (c) Kor kısmında polimeraz aktivitesi, (d) Sadece zarf glikoproteinlerinden oluşan 20-22 nm büyüklüğünde subviral partiküllerin üretimi ve (e) Mutlak olmayan hepatotropizm olarak sıranabilir (15, 16).

Hepadnaviridae ailesi, memelileri (*Orthohepadnavirus*) ve kuşları (*Avihepadnavirus*) enfekte eden hepatit viruslarının yer aldığı iki cins içermektedir (17). Ortohepadnavirus cinsinde, insan, primatlar (maymun, orangutan, şempanze, goril), sincap ve sıçan gibi konakları enfekte eden türler bulunurken, avihepadnavirus cinsinde ördek, balıkçıl, kaz, leylek ve turna gibi konaklara sahip olan türler sınıflandırılmaktadır.

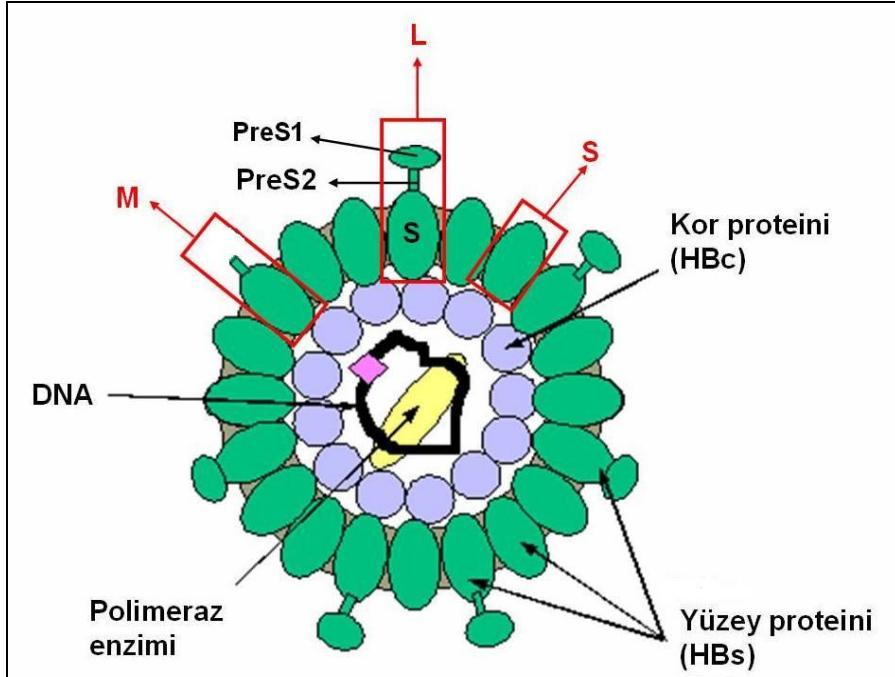
Ortohepadnavirusların prototipi olan HBV, insan dışında başka bir hayvanda üremezken, herhangi bir hayvan hepatit virusu ile de insan enfeksiyonu rapor edilmemiştir (16). Ancak şempanzeler HBV ile deneysel olarak enfekte edilebilmektedir. HBV, primat dışı memelileri enfekte eden hepatit virusları [*Woodchuck Hepatitis Virus* (WHV), *Ground Squirrel Hepatitis Virus* (GSHV)] ile %70'e varan nükleotid homolojisi göstermekte; ancak bu oran avihepadnaviruslar ile [örn. *Duck Hepatitis B Virus* (DHBV)] sadece %40 olarak saptanabilmektedir (16-18).

2.3. Hepatit B Virusunun Yapısı

2.3.1. Virion

Küçük, zarflı bir DNA virusu olan HBV, 40-42 nm büyüklüğünde olup, yaklaşık 3200 nükleotid içeren kısmi çift zincirli çembersel DNA genomu, ikozahedral bir kapsid ile çevrilidir. Kapsidin üzerinde ise üç farklı büyüklükte yüzey antijeni [küçük (Small, S); orta (Middle, M); büyük (Large, L)] taşıyan

lipoprotein yapılı bir zarf yer alır (Şekil 2.1). HBV'nu diğer DNA viruslarından ayıran en önemli özelliği, ters transkriptaz (*reverse transcriptase*; RT) enzimini kullanarak RNA aracısı üzerinden replike olmasıdır (7, 16, 19).

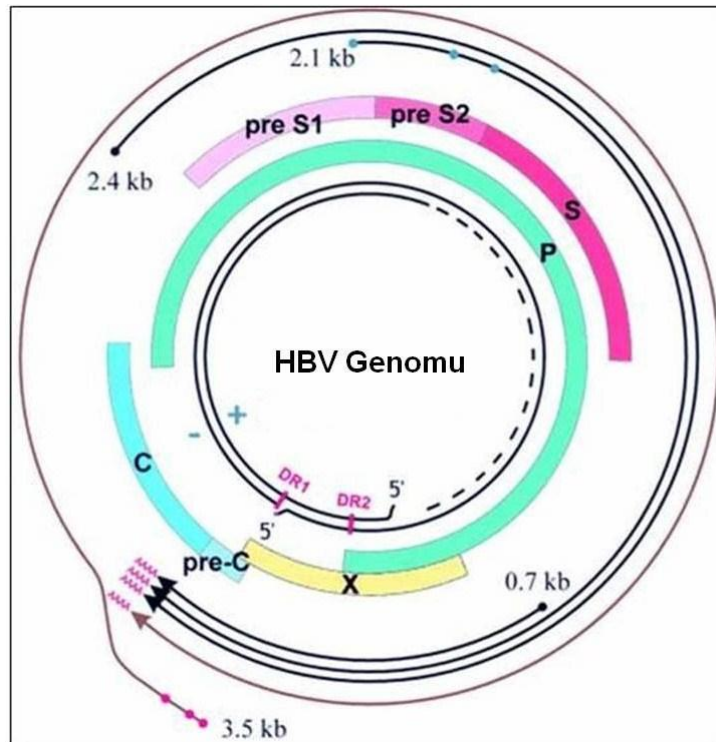


Şekil 2.1. HBV virionunun şematik yapısı

(<http://www.bio.davidson.edu/people/sosarafova/Assets/Bio307/chbrough/page01.html>'den uyarlanmıştır)

Virusun zarf yapısında en yoğun olarak bulunan ve zarfın temel ünitesi olan 24 kDa ağırlığındaki küçük yüzey proteini [hepatit B yüzey (*surface*) antijeni; HBsAg], olup, genomun *S* bölgesi tarafından kodlanmakta ve SHBs olarak bilinmektedir. *S* geninin üretim bölgesi preS bölgesi olarak isimlendirilir ve AUG kodonunun lokalizasyonuna göre preS1 ve preS2 olarak iki alt bölgeye ayrılmıştır (Şekil 2.2) (20). Senteze birinci AUG kodonundan başlanırsa 39 kDa büyüklüğünde ve reseptör bağlamada görevli olan preS1 proteinini de içeren L ünitesi (LHBs: preS1+preS2+S) oluşurken; sentez ikinci AUG kodonundan başlarsa 31 kDa büyüklüğünde ve fonksiyonu tam olarak bilinmeyen preS2 proteinini içeren M ünitesi (MHBs: preS2+S) üretilir (Şekil 2.1). Bu üç zarf proteininin herbirinin glikozile olan ve olmayan formları vardır (16,21).

Virion zarfı, iyonik olmayan deterjanlar ile muamele edildiğinde iç kısımdaki nükleokapsid ya da kor (özyapı) bölgesi açığa çıkar. 27 nm'lik ikozahedral simetrik kapsid, "hepatit B kor (*core*) antijeni" (HBcAg) olarak isimlendirilen ve 180-240 kopyadan oluşan C proteinini içerir (Şekil 2.1). İki kangaldan oluşan 21 kDa büyüklüğündeki C proteini, amino ucunda kapsid oligomerizasyonunu uyarıcı bir bölge ile karboksil ucunda arjininden zengin bir bölgeyi içerir (22-24).



Şekil 2.2. HBV genomik organizasyonu ve sentezlenen mRNA transkriptleri (<http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/full/83/6/1267>'den alınmıştır)

Kısmi çift zincirli (~%70 çift, ~%30 tek) virus genomunun gevşek çembersel yapısı, komplementer 5' ucunun hidrojen bağı ile bağlanması sonucu oluşturulmaktadır. Viral DNA'nın negatif zinciri 3.2 kb uzunluğunda iken, komplementeri olan pozitif zincir daha kısadır (Şekil 2.2). Pozitif zincirin 5' ucu sabittir; ancak 3' ucu genomda herhangi bir yerde olabilir. Bu durum, her bir HBV DNA molekülünün, virionlar arasında değişiklik

gösteren uzunlukta tek zincirli bir boşluğa sahip olduğunu vurgulamaktadır (16, 25). Negatif ve pozitif zincirlerin uçları, viral genom üzerinde iki tam kez tekrar eden dizi bölgelerini kopyalar. DR1 ve DR2 olarak isimlendirilen bu bölgeler, viral DNA sentezinin başlamasında önemli rol oynamaktadır (Şekil 2.2).

Özyapı içinde aynı zamanda DNA polimeraz aktivitesi mevcuttur. Bu enzim, başlangıçta pozitif zincirli DNA'nın 3` ucunu primer ve negatif zinciri kalıp olarak kullanarak, virion DNA'sının tek zincirli bölgesini doldurma yeteneği ile keşfedilmiştir (26). Bu endojen polimeraz reaksiyonunun sonunda, tamamen çift zincirli, gevşek ve çembersel yapıdaki viral DNA oluşmaktadır. HBV'nin polimeraz enzimi, viral genomda yer alan *P* bölgesi tarafından kodlanır (Şekil 2.2). *P* proteini aynı zamanda negatif zincirli DNA'ya bağlı terminal proteindir. Bu enzim, gerek viral DNA'nın her iki zincirinin sentezinde, gerekse olağandışı bir reaksiyon olan RNA aracılı ters transkripsiyon reaksiyonunda görev almaktadır (27).

2.3.2. Genomik Organizasyon ve Viral Proteinler

HBV genomu dört açık okuma çerçevesi (open reading frame; ORF) oluşturacak şekilde organize olmuştur. Bunlardan en büyüğü olan *PoI* viral polimerazı, *PreS/S* zarf proteinlerini, *C* kor proteinini, *X* ise viral ve hücrel genlerin ifadenmesine etki eden küçük düzenleyici proteini (17 kDa) kodlamaktadır (Şekil 2.2). *PreS/S* ORF bölgesi *PoI* ORF bölgesi ile tamamen örtüşük şekilde; *C* ve *X* ORF bölgeleri ise *PoI* ORF bölgesi ile kısmi olarak örtüşük şekilde bulunur (Şekil 2.2). Virusun replikasyonu sırasında, kovalent olarak kapalı çembersel DNA (*covalently closed circular DNA*; cccDNA) formuna dönüştürülen genomdan, virusa ait 3.5 (pre-genomik RNA), 2.4, 2.1, ve 0.7 kb büyüklüklerinde mRNA transkriptleri sentezlenmektedir (Şekil 2.2) (28).

Bazı genlerde (*S* ve *C*), açık okuma çerçevesi içinde çok sayıda AUG kodonundan farklı translasyonel okuma başlar. Örneğin *C* gen bölgesinde AUG kodonları iki parça halinde bulunur ve iç bölgedeki AUG yapısal kor (*C*;

21 kDa) proteininin, dış bölgedeki AUG ise öncül kor (precore, preC; 24 kDa) proteininin üretiminden sorumludur (16). C proteini (HBcAg) viral nükleokapsidi yapılandırmak için kullanılmaktadır. PreC bölgesi ise, "hepatit B erken (*early*) antijeni" (HBeAg) olarak bilinen 18 kDa'luk proteinin üretimini yönetir. HBeAg'nin gerçek in vivo fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte viral replikasyon için gerekli olmadığı anlaşılmıştır (29). Ancak doğal enfeksiyon sırasında periferik kanda HBeAg varlığı yüksek düzey viremi ile ilişkilidir ve yüksek enfektiviteyi yansıtır. Bu çelişkili durum, HBeAg translasyonunun yapıldığı mRNA transkriptlerinin (genomik RNA) aynı zamanda viral DNA sentezi için de kalıp olarak kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla yüksek düzey HBeAg üretimi, yüksek düzey genomik RNA sentezi ve sonuç olarak etkin viral genom replikasyonunun bir göstergesidir (16).

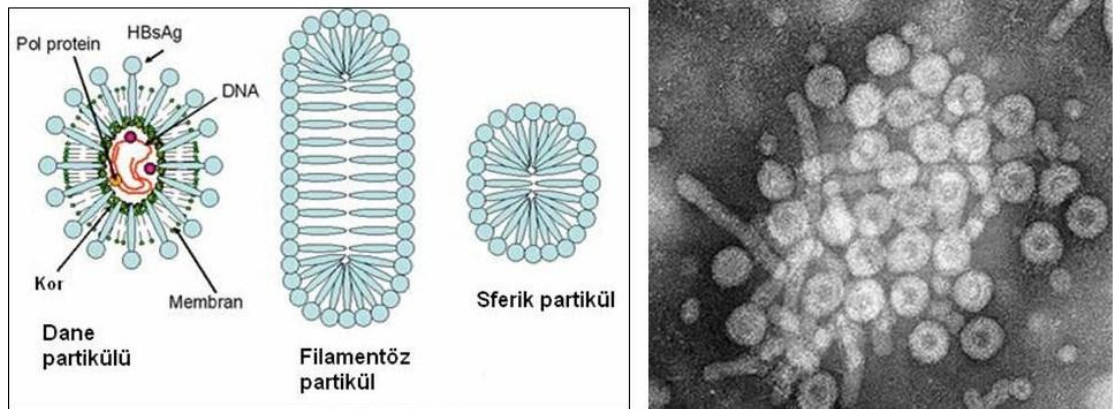
2.3.3. Genotip ve Serotipler

HBV genotipleri, tüm genom dizisinde %8'i ve S geninde %4'ü aşan farklılık taşıyan varyantlar olarak tanımlanmaktadır. Buna göre HBV'nun, A'dan H'ye kadar 8 majör genotipi mevcuttur. Ayrıca viral zarf glikoproteinlerinin antijenik farklılıklarına göre de en az dört stabil serolojik HBV alt tipi tanımlanmıştır. Bu tiplerin tümü "a" olarak belirtilen majör serolojik belirteç taşırlar; ayrıca d/y ve w/r olarak ifade edilen iki bağımsız ve dimorfik göstergeye de sahiptirler. Buna göre de HBV alt tipleri *adw*, *ayw*, *adr* ve *ayr* olarak isimlendirilmiştir (16, 17). Moleküler düzeyde tanımlanmış olan bütün bu antijenik varyantlar, S geni içindeki dizi polimorfizmlerinden kaynaklanmaktadır (30). Ancak bugüne kadar polimorfizm gösteren bu tipler arasında önemli biyolojik ya da patojenik farklılıklar saptanmamıştır. Dolayısıyla immünodominant olan ve nötralizan antikor yapımını indükleyen "a" antijeni hepsinde ortak olduğundan, herhangi bir serotipe karşı immünizasyon, tüm tiplere karşı çapraz koruma sağlamaktadır. S geninin dizi analizi hem genotipleri hem de serotipleri tanımlayabilmesine karşın, genotipler ve serotipler tam olarak birbiri ile

örtüşmemekte, serotip benzerlikleri genetik ilişkiyi doğrulamamaktadır. Virusun coğrafi dağılımı ile genotipler arasındaki ilişki, serotiplere göre daha uyumlu olduğundan moleküler epidemiyolojik çalışmalar için genotip tespitinin daha yararlı olduğu ifade edilmektedir. Farklı genotiplerle ko-enfeksiyon ve genotipler arası rekombinasyon olasılığı da çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (31). Prototipik HBV genomu, B, C, F ve H genotiplerinde 3215 nükleotid uzunluğunda olup, delesyon ve insersiyonlar nedeniyle diğer genotiplerin genom uzunlukları arasında küçük farklılıklar bulunmaktadır (17).

2.3.4. Subviral Partiküller

Hepadnavirus ile enfekte hücrelerin belirgin özelliklerinden biri, virusla ilişkili çok sayıda farklı partiküllerin üretilmesidir. Virionlara ek olarak, HBV ile enfekte hücreler, 20 nm büyüklüğünde küresel (sferik) ve aynı çapta ancak uzun (200 nm) filamentöz partiküller olmak üzere iki farklı subviral lipoprotein yapılar üretirler (Şekil 2.3). Bu yapılar sadece zarf glikoproteinleri ve konağa ait lipidleri içermektedir.



Şekil 2.3. HBV partiküllerinin şematik yapısı (solda) ve elektron mikroskopik görünümü (sağda) (<http://pathmicro.med.sc.edu/virol/hepatitis-virus.htm> ve www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8006/bin'den alınmıştır)

Küresel partiküller primer olarak S proteini, daha az miktarda M ve çok az miktarda L proteini içerirken; sayıları daha az olan filamentöz partiküller, daha yüksek oranda L proteinine sahiptir. Her iki tip partikül de, C ve P

proteinleri ve viral DNA içermediğinden enfeksiyöz özellik taşımazlar. İn vivo olarak çok yoğun miktarda üretilen bu partiküllerin, virusun yaşam döngüsündeki fonksiyonları belirsizdir; ancak daha az sayıda olan enfeksiyöz partikülleri nötralizan antikorlara (anti-HBs) karşı korumada görev aldıkları düşünülmektedir (16, 32).

2.4. Hepatit B Virusunun Replikasyonu

Karaciğerin parenkimal hücreleri (hepatositler gibi) HBV'nun primer hedefidir. Ancak virusun hepatositlere ve diğer duyarlı hücrelere giriş mekanizmaları, uygun hücre kültürü sistemlerinin olmaması nedeniyle halen tam olarak aydınlatılamamıştır (33). HBV replikasyonunun en önemli özelliği olan "DNA genomunun RNA'nın ters transkripsiyonu ile çoğaltılması" olayının olağandışı bir uygulama olması nedeniyle, virusun replikasyon döngüsü ile ilgili çalışmaların ve elde edilen bilgilerin çoğu transkripsiyon sonrası döneme aittir (16).

2.4.1. Hücreye Tutunma ve Giriş

Virusun hücreye giriş yolağı, virus-konak ilişkisinin temel belirleyicisidir. Yapılan çalışmalar, HBV partikülünün hepatosit yüzeyindeki heparan sülfat proteoglikanlarının karbonhidrat yan zincirlerine enerjiden bağımsız bir mekanizma ile tutunduğunu göstermiştir (34, 35). Zayıf ve geri dönüşebilir özellikteki bu primer tutunmayı takiben, virionun hücreye girişini sağlayacak özgül bir reseptöre daha bağlanması gerekmektedir; ancak HBV için özgül olan bu reseptör henüz tanımlanamamıştır. Son yıllarda bu konu üzerinde yoğunlaşan çalışmalar, hepatosit yüzeyindeki pürinerjik reseptörlerin ve asialoglikoprotein moleküllerinin HBV'nun hücreye girişi için reseptör adayı olabileceğini göstermektedir (36, 37).

Hücre yüzey reseptörleri ile ilgili birçok bilinmeyene rağmen, virusun hücreye hangi yapılarıyla tutunduğu iyi bilinmektedir. HBV'nun hepatositlere tutunması, zarf yapısında en fazla yoğunlukta bulunan büyük zarf proteinlerinin (LHBs) uç kısmındaki preS1 bölgesinin 21–47. aminoasit motifi ile olmaktadır (38,39). Buna karşın tutunma olayında preS1 bölgesinin farklı

motiflerinin ve preS2 bölgesinin de rolü olduğu ileri sürülmektedir (37, 40, 41).

Hepatit B virusunun hücreye penetrasyonu ile ilgili olarak da bilgilerimiz kısıtlıdır. Virionların hücre yüzey reseptörlerine bağlanmasından sonra membran füzyonu sonucu pH-bağımsız bir mekanizma ile girişin gerçekleştiği birçok kanıtla desteklenmektedir. Sitoplazmaya geçen nükleokapsidler, hücrenin transport sistemi ile çekirdek membranına taşınır ve burada kapsidin enzimatik olarak parçalanması ile viral DNA çekirdek porlarından içeri bırakılır (27, 42).

Hücre çekirdeğine giren viral genom tamir edilerek cccDNA (*covalently closed circular DNA*) formunda epizomal bir minikromozom oluşturulmaktadır (Şekil 2.4). Bu işlem, hücre polimerazları tarafından genomdaki tek zincirli açık bölgenin onarılması ve DNA ucunun kovalent olarak bağlanması ile gerçekleştirilir (43).

2.4.2. Transkripsiyon ve Translasyon

Hücre çekirdeğinde oluşan cccDNA, konağın RNA polimeraz II enzimi için kalıp görevi yaparak dört RNA transkriptinin sentezini gerçekleştirir (Şekil 2.2). Transkripsiyon olayı dört *promotor* (preS1, preS2, C ve X) ve iki *enhancer* (Enh-I ve Enh-II) bölge tarafından kontrol edilmektedir (16,44). Bunlardan S/preS2 promotorunun karaciğer hücrelerine olan özgüllüğü düşük iken, preS1 ve C promotorları karaciğer için çok özgüldür ve C promotorunun bu özelliği virus hepatotropizminin esas belirleyicisidir (45).

Sentezlenen viral RNA transkriptleri çekirdekten sitoplazmaya geçerek protein sentezini başlatırlar. Buna göre, kor proteini (HBcAg), erken protein (HBeAg) ve polimeraz proteini sentezi 3.5 kb büyüklüğündeki genomik RNA'dan; zarf proteinleri (HBsAg) 2.1/2.4 kb büyüklüğündeki subgenomik RNA'dan; X proteini (HBx) ise 0.7 kb büyüklüğündeki RNA'dan sentezlenmektedir (28). Prekor proteini, sahip olduğu öncü (*leader*) dizi sayesinde endoplazmik retikulum (ER)'a taşınır ve burada işlenerek HBe

antijenini oluşturur. Bir transkripsiyon faktörü olan HBx ise, kendisi çekirdeğe girmeden, çekirdeğe girecek olan hücrel sitoplazmik transkripsiyon faktörleri ile etkileşmekte ve bu şekilde HBV promotor aktivitesini artırmaktadır (46). Sentezlenen zarf proteinleri (HBsAg) de, ER'a giderek glikozillenmekte ve ER membranına integre olmaktadır. Kor ve polimeraz proteinleri, pregenomik RNA (pgRNA)'yı çevreleyerek HBV RNA içeren kapsidleri oluşturmaktadır.

2.4.3. Paketlenme, DNA Sentezi ve Salınım

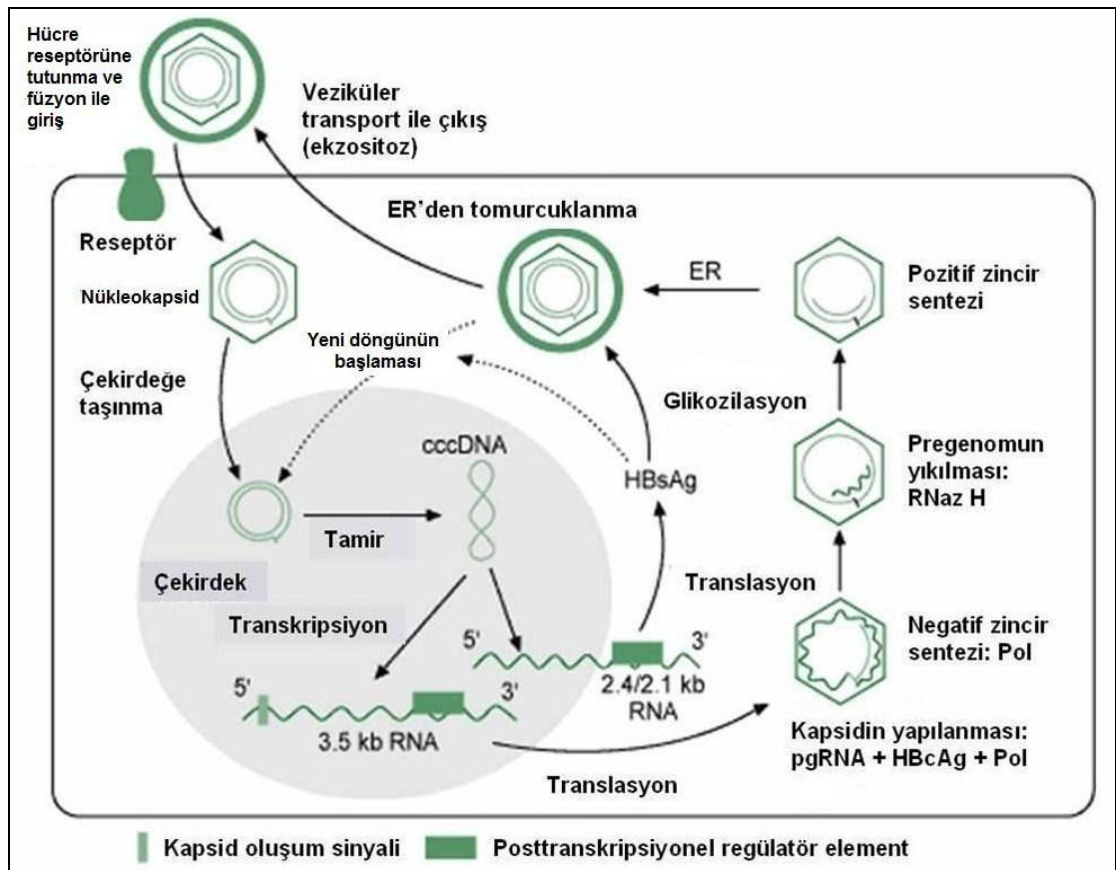
Paketlenme (kapsidasyon) sırasında, viral kor içine pgRNA ve P proteini (polimeraz) birlikte alınmaktadır (Şekil 2.4). Diğer bir deyişle, eğer P proteini viral RNA ile kompleks olarak bulunuyorsa kapsid için hedef olmaktadır (44). Bu son derece özel olayda, sadece genomik uzunluktaki viral RNA'lar, 5' uçlarında taşıdıkları kapsidasyon sinyali (ϵ) ile kapsid içine etkili bir şekilde girerler (27, 47).

Ters transkripsiyon ile DNA sentezi, kapsidasyon ile aynı anda ya da hemen ardından başlar. İlginç olarak bu sentez, nükleik asit primerleri ile değil P proteinindeki tirozin molekülünün hidroksil grubu ile başlatılmaktadır (16). Polimerazın RT aktivitesi ile pgRNA kalıbından negatif DNA zinciri sentezlenir ve geçici DNA-RNA hibridleri oluşur. Bu kez polimeraz enziminin RNaz aktivitesi ile DNA-RNA hibridlerindeki RNA seçici olarak parçalanır ve akabinde pozitif DNA zincir sentezi başlar (Şekil 2.4). Pozitif zincir sentezi için primer görevini ise 15-18 nükleotidlik kısa bir RNA parçası görmektedir (44).

RNA içeren kapsid, DNA içeren kapsid haline olgunlaşırken sitoplazmada çift yönlü olarak hareket etmektedir. Birinci yol, ER membranından zarf proteinlerinin alınması ve tomurcuklanma ile virionların hücre dışına salgılanması (ekzositoz) ile sonlanırken; ikinci yol nükleokapsidin çekirdeğe geri taşınmasıyla cccDNA havuzunun çoğaltılması ve yeni döngünün başlamasını sağlar (Şekil 2.4) (46). Ancak virusun olgunlaşması viral

DNA'nın pozitif zincir sentezi tamamlanamadan gerçekleştiğinden, progeni virionlarda DNA genomu gevşek kısmi çift zincirli olarak kalmaktadır (48).

Subviral partiküller ise, SHBs ve MHBs proteinlerinin sentez sonrası hızla oligomerize olarak pre-Golgi kompartmanından tomurcuklanması ve veziküler transport ile hücre dışına atılması ile oluşur. Buna karşın LHBS, diğer viral proteinlerin yokluğunda salınamamaktadır (49). L ünitelerini içeren partiküller, sferikten ziyade filamentöz morfoloji kazanırlar ve hücre dışına atılmadıkları için ER ve Golgi içinde kalırlar. Bu tür hasarlı hücreler, patolojik olarak, HBV ile enfekte hastaların karaciğer biyopsi örneklerinde, sitoplazmik görünüşleri nedeniyle "buzlu cam hücreleri" olarak isimlendirilirler (32, 50).



Şekil 2.4. Hepatit B virusunun replikasyon döngüsü

(<http://www.clinicaloptions.com/Hepatitis/Annual%20Updates/2008%20Annual%20Update'den> uyarlanmıştır)

2.5. Hepatit B Virus Mutantları

Hepatit B virus enfeksiyonu, insan immün yetmezlik virusu (HIV) ve hepatit C virusu (HCV) enfeksiyonlarında olduğu gibi yüksek düzeyde virion üretimi ve yıkımı ile karakterizedir. Replikasyonun immün sistem ya da ilaçlar tarafından baskılanmadığı dönemlerde, günde yaklaşık 10^{11} virionun meydana geldiği tahmin edilmektedir. HBV'nun plazma yarı ömrü 1-3 gün olmasına karşın virusla enfekte hepatositlerin yarı ömrü 10-100 gün arasında değişmektedir. HBV RT enziminin hata düzeltme (*proof-reading*) aktivitesinin olmaması, yoğun virion üretimi ile birlikte yüksek düzeyde mutant oluşumuna yol açmaktadır. HBV polimerazının hata oranının yılda nükleotid başına 1.4×10^{-5} - 5×10^{-5} olduğu hesaplanmıştır. Bu hata düzeyi, retroviruslara yaklaşık bir oran olmakla birlikte DNA viruslarından 10^4 kat yüksektir. Oluşan viral mutantlar, endojen (fonksiyonel kısıtlamalar, immün sistemin etkileri, vb) ve ekzojen (aşılama, ilaç tedavisi, vb) faktörlerle sınırlandırılmakla birlikte, bu faktörlerin seçici baskısı yeni mutantların ortaya çıkmasına da neden olabilmektedir. Diğer bir deyişle, konaktaki virusa herhangi bir avantaj sağlayan mutasyonu taşıyan suşlar seçilerek baskın popülasyon haline gelecektir. Dolayısıyla enfekte bir kişideki virus popülasyonu, genetik olarak yakın, ancak farklı özelliklere sahip varyantların (*quasispecies*; türümsü) bir kombinasyonu olarak karşımıza çıkacaktır (25, 51).

2.5.1. Prekor/Kor Geni Mutasyonları

Kuzey Avrupa ve Amerika'da kronik HBV hastalarının birçoğunda HBeAg pozitifliği ve aktif viral replikasyon izlenirken, Güney Avrupa ve Asya'lı hastalarda HBeAg negatifliğine rağmen ciddi karaciğer hastalığı ve aktif viremi tablosu vardır (16). Bu hastalarda yapılan çalışmalarda, prekor bölgesinin dizi analizinde 1896. nükleotidde G→A değişimi ile sonuçlanan nokta mutasyonu gösterilmiştir. Bu mutasyon (prekor *stop* kodon mutasyonu; PSKM), HBeAg üretiminin durdurulmasına, ancak kor proteini üretiminin devam etmesine yol açmaktadır. Bu tip varyant virusların,

fulminant karaciğer yetmezliği ve ciddi kronik karaciğer hastalığı ile ilişkisi de belirlenmiştir (52, 53). PSKM, Kuzey Amerika ve Avrupa'da predominant olan HBV genotip A ile enfekte hastalarda daha az sıklıkta oluşmaktayken, genotip B, C, D ve E'nin predominant olduğu ülkelerde yaygın olarak görülmektedir (28, 52).

Bir diğer mutasyon, bazal kor promotor (BKP) bölgesini etkilemekte ve prekor/kor RNA'larının transkripsiyonunda azalma şeklinde kendini göstermektedir. BKP bölgesinde A1762T ve G1764A mutasyonları, viral genotiplere bağlı olarak yalnız ya da prekor mutasyonları ile birlikte görülebilirler. A1762T ve G1764A çift mutasyonunun varlığı ise, HBeAg sentezinde azalmaya ve viral yükte artışa neden olmaktadır. Genel olarak bu mutasyon tipi sıklıkla A genotipi ile enfekte kişilerde ortaya çıkmaktadır. BKP bölgesinde oluşan mutasyonlar, daha az prekor ve kor transkriptinin ve kor proteininin oluşmasına neden olurlar; ancak pgRNA transkripsiyonunu ya da polimeraz/kor proteinlerinin translasyonunu etkilemezler (52, 53).

Kor proteininin arjininden zengin karboksi terminali, hem pgRNA'nın bağlanma bölgesini, hem de önemli B ve sitotoksik T hücre epitoplarını içermektedir. Kronik HBV enfeksiyonunda, virusla enfekte hepatositlerin sitotoksik T lenfositleri tarafından temizlendiği dönemlerde, bu epitoplarda mutasyonu olan viruslar seçilmektedir. Bu bölgede sıklıkla mutasyon izlenen sıcak noktalar; majör sitotoksik T hücre epitopları olan 18-30. aminoasit (aa)'ler, yardımcı T hücre epitopları olan 50-70. aa'ler ve iki önemli B lenfosit epitopu olan 75-90 ve 120-140. aa'ler arasındaki bölgelerdir. Kor geninde izlenen mutasyon oranları, PSKM varlığı, HBeAg sentezi ve karaciğer hastalığının aktivitesi ile ilişkilidir (25).

2.5.2. Yüzey Geni Mutasyonları

Nötralizan antikorlardan korunma, virusun iyi korunmuş bölgesi olan "a" determinantı sayesinde olmaktadır. 124-147. aa'ler arasında bulunan bu hidrofilik bölgenin enfeksiyonlara karşı korunmada önemli olduğu düşünülmektedir (54). 145. aa'de G→R nükleotid değişikliğinin virusta

majör antijenik farklılıklara neden olduğu görülmüştür. Poliklonal hepatit B immünooglobülini (HBIG) ile profilaksi uygulanan bebeklerde 'escape' mutantlar tanımlanmıştır. Anti-HBs antikorlarının koruyucu düzeyde olmasına rağmen, bu mutasyonu taşıyan suş ile enfekte kişilerde HBsAg pozitifdir ve kronik karaciğer hastalığı oluşmaktadır (55). Bu mutasyonlar çoğu kez HBsAg'nin 145. aa'de glisin-arjinin dönüşümü (sG145R) ya da 144. aa'de aspartat-alanin dönüşümü (sD144A) şeklinde izlenmektedir (56). Özellikle sG145R mutasyonu, aşı ve HBIG başarısızlığı ile ilişkilendirilmektedir (55-58).

Hepatit B virusunun genomik organizasyonu göz önüne alındığında, "a" determinantındaki değişikliklerin, HBV polimeraz fonksiyonunda değişiklik oluşturma potansiyeli olduğu bilinmektedir. Aynı şekilde HBV tedavisi ile ilişkili polimeraz varyantlarının da, yüzey geni mutasyonlarına yol açma potansiyelleri vardır (16, 58).

2.5.3. X Geni Mutasyonları

X proteininin sentezi ve özellikleri, bazal kor promotor (BKP) ya da Enh-II gibi replikasyonun kontrolünde görev alan regülatör bölgelerde meydana gelecek mutasyonlardan etkilenmektedir. BKP bölgesinin X geni ile çakışmasına bağlı olarak, yukarıda açıklanan A1762T ve G1764A kor promotor mutasyonları X geninde de değişikliklere sebep olabilir. Ek olarak BKP bölgesinde izlenen tüm delesyon ve insersiyonlar, X geninde çerçeve kayması (*frame shift*) oluşturarak dallı ve kısa X proteinlerinin oluşmasına neden olmaktadır. Bu mutant proteinler ise HBx antijeninin transaktivasyon aktivitesini, karboksi terminalinde 130-140. aa'ler arasında yer alan fonksiyonel bölgenin sentezlenememesine bağlı olarak olumsuz yönde etkilemektedir (28, 57, 59).

2.5.4. Polimeraz Geni Mutasyonları

Hepatit B enfeksiyonlarının tedavisinde nükleoz(t)id analoglarının kullanımı, *Pol* geninde mutasyonu olan dirençli virusların seçilmesine ve

sonuçta ilaçların klinik etkinliğinde azalmaya neden olmaktadır. Tedavide interferon ile birlikte en sık kullanılan ilaç olan lamivudine karşı direnç, tedavi alan hastaların %14-32'sinde ilk yılda izlenmekte; dört yılın sonunda ise %70'e ulaşmaktadır (58). Direnç riski taşıyan durumlar arasında; tedavi öncesi yüksek viral yük ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri ile virus replikasyonunun tam olarak baskılanamaması yer alır. HBV'unda izlenen ve nükleozid analoglarına direnç oluşturan mutasyonların büyük kısmı, polimeraz proteininin dNTP bağlayan bölgesinde (C kangalı, YMDD motifi) izlenmektedir (60). Bunlar arasında, lamivudin direncinden sorumlu olan rtM204V (YVDD), rtM204I (YIDD) ve rtM204S (YSDD) mutasyonları sayılabilir. YMDD (Y: tirozin; M: metiyonin; D: aspartik asit) motifinde aa değişimi taşıyan dirençli mutantların in vitro replikasyon etkinliğinin, vahşi tip viruslara göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, mutant virusun replikasyon yeteneğini artıracak ikincil (onarıcı; *compensatory*) mutasyonların, dirençten sorumlu ana mutasyonlarla birlikte seçildiği bilinmektedir (61).

2.6. Hepatit B Virus Enfeksiyonu

2.6.1. Patogenez ve immünite

Virus ile konak ilişkisi, virusun immün sisteme yakalanmadan çoğalma ve yayılmaya çalışması ile konağın kendisine en az zarar ile onu elimine etmesi esasına dayanan son derece dinamik bir süreçtir. Yapılan çalışmalar, HBV'nun hepatositlerde sitopatik etki oluşturmaksızın replike olduğunu ve yayıldığını göstermekte; oluşan karaciğer hasarının ise immünopatolojik mekanizmalar ile ortaya çıktığını vurgulamaktadır (46). HBV'nun hücreler üzerine direkt sitotoksik etki göstermemesi ile ilgili elde edilen bulgular, tüm HBV taşıyıcılarının asemptomatik olması ve yoğun intrahepatik enfeksiyona rağmen karaciğer hasarının minimal kalması sonucu ile uyumaktadır. Bu görüş bazı araştırmacılar tarafından, asemptomatik taşıyıcıların virülansı düşük suşlar ile enfekte olmasına bağlanmakla birlikte, epidemiyolojik verilerin çok azı bu düşüncüyü desteklemektedir (16).

Sitopatik etki oluşturmadığı kabul edilmesine rağmen, çeşitli deneysel modellerde hepadnavirusların hepatositleri farklı mekanizmalarla apoptozise götürdüğü tespit edilmiştir (62). Örneğin HBV'nun replikasyonu sırasında, çok fazla miktarda sentezlenen L yüzey antijeninin (LHBs) hücre içinde birikimi nedeniyle apoptozu indüklediği gösterilmiştir (63). Bir diğer mekanizma ise, HBx proteininin p53 ile ilişkili olan ve olmayan yollarla apoptozu indüklemesidir (64-66).

Viral mutasyonların patogenez üzerine etkileri ile ilgili veriler; bazı HBV mutantlarının farklı klinik tablolara neden olabildiğini, enfeksiyonun doğal seyrini değiştirebildiğini ve antiviral ajanlara direnç oluşturabildiğini göstermektedir. Örneğin prekor *stop* kodon mutasyonları HBeAg'nin kaybına, kor promotor mutasyonları viral replikasyonun artışına, RT/polimeraz gen mutasyonları antivirallere karşı dirence ve yüzey geni mutasyonları HBsAg antijenitesinin değişmesine ve nötralizan antikordardan kaçışa yol açmaktadır (Tablo 2.1) (62).

Tablo 2.1. HBV Varyantları ve Hepatit B Patogenezindeki Potansiyel Etkileri

<i>Gen</i>	<i>Mutasyon</i>	<i>Moleküler fenotip</i>	<i>Klinik önem</i>
<i>PreS/S</i>	Pre-S1/ pre-S2/ S promotor	Hatalı paketlenme	Fibröz kolestatik hepatit
	S	B ve T hücre epitoplarnın değişimi	Aşıdan, immün yanıtta ve tanısal testlerden kaçış
<i>PreC</i>	PreC stop	HBeAg kaybı	Ağır hepatit tablosu; HBeAg negatifliği
<i>Kor</i>	Kor	T hücre epitoplarnın değişimi	Virusun persistansı; ağır hepatit tablosu
<i>RT/Pol</i>	Pol	Eksik replikasyon	Viral latentlik; viral persistans
	Pol	Antiviral direnci	Tedaviden kaçış
Regülatör elemanlar	Kor promotor	Replikasyon ve kor ekspresyonunda artış	Ağır hepatit tablosu; ilaç direncinin modülasyonu
		HBeAg sentezinde azalma	HBeAg seronegatifliği
	Enh1	Replikasyonda azalma	Kronik hepatit

Viral varyanların ve bazı viral proteinlerin hepatositler üzerindeki direkt biyolojik etkilerinden ayrı olarak, günümüzde hepatit B enfeksiyonlarının patogeneğinde konak immün yanıtının, özellikle de virusa özgül CD8+ T hücre yanıtının, temel rolü oynadığı görüşü kabul edilmektedir (67).

Bilindiği gibi, viral enfeksiyonlara karşı en önemli doğal immün yanıt mekanizmaları, virusun hücreleri enfekte etmesini takiben ortaya çıkan tip 1 interferon (α/β -IFN) ve NK hücre yanıtıdır. Ancak ilginç olarak, HBV enfeksiyonunda doğal bağışıklık mekanizmalarının, gerek vireminin kontrolüne gerekse karaciğer hücre hasarına önemli bir katkısı yoktur (46). Şempanzelerde yapılan çalışmalar, virusa özgül T hücre yanıtı oluşuncaya kadar, hepatositlerde histolojik ve biyokimyasal anlamda harabiyetin ortaya çıkmadığını göstermiştir (68, 69). Bunun nedeni, enfeksiyonun ilk dönemlerinde –özgül immün yanıt oluşuncaya kadar- virusun kendisini başarılı bir şekilde saklamasından kaynaklanmaktadır. Zira HBV'nun replikasyon stratejisi, doğal immün yanıtın tanıma mekanizmalarından kaçış için oldukça elverişlidir (46, 70). Dolayısıyla HBV patogeneğine katkıda bulunacak olan özgül immün yanıt elemanları (T lenfositleri) oluşuncaya kadar hepatosit harabiyeti de ortaya çıkmamaktadır (71). Yapılan çalışmalar, HBV immünopatogeneğinde rol oynayan hücrelerin primer olarak sitotoksik CD8+ T hücreleri (*Cytotoxic T lymphocyte*; CTL) olduğunu, CD4+ T hücrelerinin ise dolaylı olarak sitotoksin salgılarıyla CTL aktivasyonuna ve kalıcılığına katkıda bulunmak suretiyle etki gösterdiğini ortaya koymuştur (46, 69, 72).

Kendiliğinden iyileşen akut hepatit B'li hastalarda, virusun birçok antijenine (kor, polimeraz, zarf proteinleri) karşı güçlü CTL yanıtları ortaya çıkmakta ve iyileşmeden sonra uzun bir süre kalıcı olmaktadır (73). Bu durum, HBV'na karşı CTL yanıtının poliklonal ve çoklu özgüllükte (*multispecific*) olduğunu vurgulamaktadır (62). Akut enfeksiyonda ayrıca, kor ve polimeraz proteinlerine karşı güçlü CD4+ T hücre (*Helper T lymphocytes*, T_H) yanıtlarının oluştuğu da gösterilmiştir (16). HBV'nun

profesyonel antijen sunan hücreleri enfekte etme özelliği olmadığından, T hücrelerinin uyarımı, virusla enfekte apoptotik hücreleri fagosite ederek bölgesel lenf nodlarına giden dendritik hücreler tarafından yapılmaktadır (46).

Sitotoksik T lenfositleri tarafından virusun temizlenmesi iki farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir (62, 69). Bunlardan birisi, erken dönemde gerçekleşen sitopatik olmayan mekanizmalardır ve CTL, hepatositleri öldürmeksizin antiviral etki gösteren interferon-gama (IFN- γ) ve tümör nekrozis faktör (TNF- α) salgılayarak virus ekspresyonu ve replikasyonunu sınırlandırmaktadır (62, 74). Diğeri ise, daha geç dönemde -haftalar sonra- gerçekleşen sitopatik mekanizmadır ve HBV'na özgül CTL'nin, enfekte hücreleri MHC sınıf I antijenleri ile tanıyarak Fas ligand/perforin yolağı ile öldürmesi sonucu karaciğer hastalığı ortaya çıkmaktadır (68).

Kendiliğinden iyileşen akut HBV enfeksiyonlarının aksine, kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda T hücre yanıtı oldukça zayıf ve sınırlı özgülüktedir (75). Bunun nedeni tam olarak açıklığa kavuşmamış olmakla birlikte, T hücrelerinde delesyon, anerji, tükenme, gelişim ve fonksiyon bozuklukları gibi faktörlerin etkili olabileceği düşünülmektedir (62). Virusun persistansında öngörülen bir diğer mekanizma da, viral kaçış mutasyonlarıdır. Zira kronik HBV enfeksiyonlarında mutasyonlar sonucu B ve T hücre epitoplarının inaktive olduğu ya da değiştiği gösterilmiştir (70, 76). Kronik enfeksiyonlarda T hücre yanıtının yetersiz kalmasında, viral yükün yüksek olmasının da önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (62). Bu durumda antiviral tedavi, kronik hepatit B'li hastalarda CTL yanıtını düzeltebilir (77).

Hepatit B virus enfeksiyonunda, hücrel immün yanıt virusla enfekte hücreleri elimine ederken, humoral immün yanıt da dolaşımdaki viral partikülleri temizlemekte ve virusun yayılımını sınırlamaktadır (78). Virusa karşı oluşan nötralizan antikolar aynı zamanda virusun duyarlı hücrelere girmesini de önlemektedir. Ancak nötralizan antikolar, akut enfeksiyonun

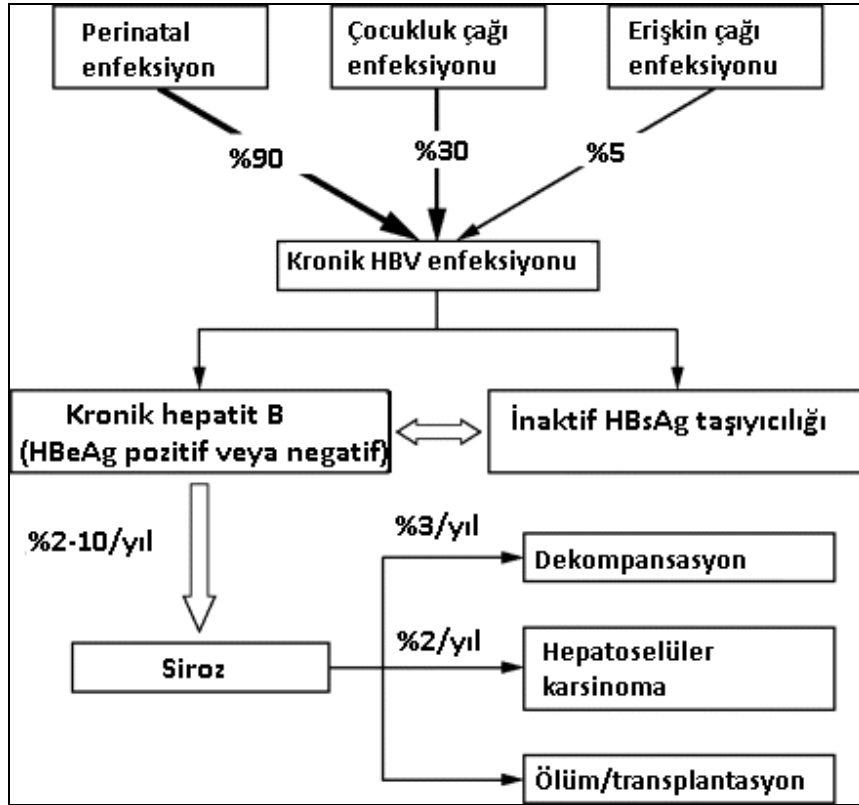
geç dönemlerinde devreye girdiğinden klinik iyileşmenin olduğu hastalarda HBV reaktivasyonu ve/veya reenfeksiyonunu önlemede görev almaktadırlar (46). HBV enfeksiyonunun patogeneğinde humoral immün yanıtın da rolü vardır. Enfeksiyon sırasında çok yüksek düzeylerde sentezlenen ve salgılanan HBsAg, kendisine karşı oluşan antikorlarla (anti-HBs) immün kompleksler oluşturarak damar endoteli, eklemler ve böbreklerde birikmekte ve immün kompleks hastalıklarına neden olabilmektedir. İndüklenen tip III aşırıduyarlılık reaksiyonları sonucu hastalık sırasında deri döküntüleri, artralji ve böbrek harabiyetinin ortaya çıkması nadir değildir (79).

2.6.2. Klinik bulgular

Akut HBV enfeksiyonu, asemptomatik seyredebileceği gibi ciddi karaciğer hastalıklarına kadar değişen klinik tablolar ile de karşımıza çıkabilir (Şekil 2.5). Enfeksiyonun inkübasyon süresi 6 hafta - 6 ay arasında değişmekte olup, klinik belirtiler yüksek oranda yaşa bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (14). Genellikle yenidoğanlarda herhangi bir klinik belirti görülmezken, 1-5 yaş arası çocukların %5-15'inde, büyük çocuklar ve erişkinlerin ise %33-50'sinde semptomatik enfeksiyon tablosu izlenmektedir. Semptomatik enfeksiyonun seyri, orta dereceli enfeksiyondan fulminant formlara kadar değişebilir (15). Akut enfeksiyonun belirti ve bulguları ateş, iştahsızlık, halsizlik, bulantı, kusma, sarılık, koyu renkli idrar, kil renginde ya da renksiz dışkılama ve üst kadran ağrısıdır. Cilt döküntüleri, artralji ya da artrit şeklinde karaciğer dışı belirtiler de gözlenmektedir (16). Akut hastalığı olan kişilerin yaklaşık %1-2'sinde fulminant hepatit gelişmekte ve bu hastalarda olgu/ölüm oranı %63-93 olarak bildirilmektedir (Şekil 2.5) (7).

Kronik HBV enfeksiyonu ise, serumda ≥ 6 ay HBsAg pozitifliği ya da HBsAg pozitifliği ile birlikte anti-HBc IgM negatifliği olarak tanımlanan bir tablodur (7). Kronik enfeksiyon gelişme riski yaşla ters orantılı olup, enfeksiyonu perinatal dönemde kazanan bebeklerde en yüksek (%90) orandadır (Şekil 2.6). 1-5 yaş arasındaki çocukların %25-90'ında kronik enfeksiyon gelişirken, bu oran büyük çocuk ve erişkinlerde %5-10

ve mortalitesi, viral replikasyonun persistansına ve siroz ya da HCC gelişimine bağlıdır (82).



Şekil 2.6. Kronik hepatit B enfeksiyonunun seyri (80)

Kronik hepatit B enfeksiyonunun doğal gelişimi 5 dönemde gruplandırılabilir; ancak bunların ardışık olarak ortaya çıkma şartı yoktur (82).

1. İmmün toleran faz: Bu dönem; HBeAg pozitifliği, yüksek serum HBV DNA düzeyi, normal ya da düşük aminotransferaz düzeyleri, karaciğerde minimal nekrozlu inflamasyon olması ya da hiç olmaması ve yavaş seyirli fibrozis olması ya da hiç olmaması ile karakterizedir. Bu fazda HBeAg'nin kendiliğinden negatifleşme oranı çok düşüktür. Birinci fazın görülme sıklığı diğerlerine göre daha fazladır ve perinatal dönemde ya da yaşamın ilk yılında enfekte olan kişilerde daha uzun seyreder. Ayrıca vireminin yüksek olması nedeniyle bu kişiler son derece bulaştırıcıdırlar (82-84).

2. İmmün reaktif faz: Bu dönem; HBeAg pozitifliği, düşük serum HBV DNA düzeyi, aminotransferazlarda artış ya da dalgalı seyir, orta ya da ciddi karaciğer inflamasyonu ve önceki fazla karşılaştırıldığında daha hızlı fibrozis gelişimi ile karakterizedir. Bu faz birkaç haftadan birkaç yıla kadar sürebilir; ayrıca kendiliğinden HBeAg negatifleşme oranı artmıştır. Bu faz immün toleran fazdan birkaç yıl sonra gelişebilir ve erişkin dönemde enfekte olanlarda daha sık izlenir (82-84).
3. İnaktif taşıyıcılık dönemi: HBeAg serokonversiyonunu inaktif HBV taşıyıcılık durumu izleyebilir. Çok düşük ya da tespit edilemeyen HBV DNA ve normal aminotransferaz düzeyleri ile karakterizedir. Enfeksiyonun immünolojik kontrolünün bir sonucu olarak, bu evredeki hastaların büyük bir kısmında uzun dönemli prognoz iyi seyretmektedir. Genellikle birkaç yıl saptanamayan HBV DNA seyrinden sonra, her yıl olguların %1-3'ünde kendiliğinden HBsAg kaybı ve anti-HBs oluşumu görülebilir (85).
4. HBeAg negatif dönem: İmmün reaktif faz döneminde HBeAg serokonversiyonu sonrası anti-HBe oluşabilir ve kronik enfeksiyonun geç fazını ifade eder. Periyodik olarak HBV DNA ve enzim düzeylerinde dalgalanmalar ve aktif hepatit reaktivasyonu ile seyreder. Prekor ve/veya bazal kor bölge mutasyonlarına bağlı olarak HBeAg negatif olan bu hastaları gerçek inaktif taşıyıcılardan ayırt etmek çok önemlidir; zira inaktif taşıyıcılarda prognoz iyi seyrederken, aktif hastalıklı kişilerde hepatik fibroz, siroz ve HCC gibi süreçlere ilerleme riski yüksektir. Bu nedenle hastaların en az yılda bir kez serum ALT ve üç ayda bir HBV DNA düzeylerinin izlenmesi, HBeAg negatif kronik aktif hepatitli olgularda alevlenmelerin tespitine imkan verir (86).
5. HBsAg negatif dönem: HBsAg'nin negatifleşmesinden sonra gelişen evrede, düşük düzey HBV replikasyonu, karaciğerde HBV DNA tespiti ile devam edebilir. Genel olarak anti-HBs ile birlikte ya da tek başına anti-HBc saptanır. Serum HBV DNA ve HBsAg negatifliğine bağlı olarak siroz,

dekompansasyon ve HCC riski azalmaktadır. Ancak bu hastalarda immün süpresyon, HBV reaktivasyonuna yol açabilir. Bu dönemin gizli HBV enfeksiyonu ile ilişkisi ise belirli değildir (87).

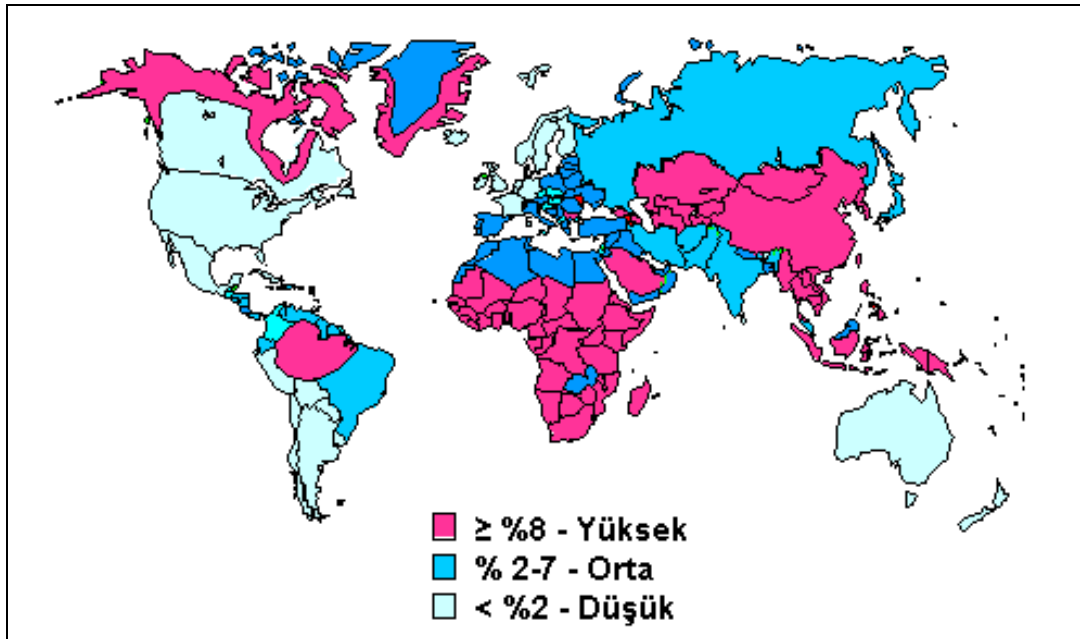
2.6.3. Gizli Hepatit B Enfeksiyonu

Gizli (okült; *occult*) Okült hepatit B enfeksiyonu, periferik kan ya da karaciğerde HBsAg saptanamazken, duyarlı nükleik asit saptama yöntemleri ile HBV DNA'nın tespit edildiği durumlar olarak tanımlanır. Okült hepatit B; açıklanamayan karaciğer hastalığı (HCC ve kriptojenik siroz) olanlarda, spontan olarak veya interferon (IFN) tedavisinden sonra iyileşen kronik enfeksiyonlu HBV seropozitif hastalarda ve karaciğer hastalığı bulgusu olmayan hemodiyaliz hastaları ve kan vericileri gibi HBV seronegatif kişilerde görülmektedir. Okült HBV enfeksiyonunun prevalansı ile ilgili veriler yeterli olmamakla birlikte, Kuzey Amerika'da HCC'li hastalarda %16, anti-HBc pozitif kan vericilerinde %2 ve hemodiyaliz hastalarında %4 oranında bildirilmektedir. Ayrıca kronik HCV enfeksiyonu olan kişilerin karaciğer biyopsi örneklerinde %50 ve serum örneklerinde %30'a varan oranlarda HBV DNA pozitifliği tespit edilmiştir (88). Okült HBV enfeksiyonunun, HBsAg'yi kodlayan ya da transkripsiyonu kontrol eden bölgelerin mutasyonu sonucunda antijenite ya da ekspresyon düzeylerinin değişimine bağlı olarak gelişebileceği düşünülmektedir (89). Anti-HBc pozitif okült HBV enfeksiyonlu kişilerde viral yük genellikle <10000 kopya/ml (<2000 IU/ml) düzeylerinde olduğu için, tanıda "*nested*" ya da gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi duyarlı yöntemler kullanılmalıdır (88, 90).

2.6.4. Epidemiyoloji

Hepatit B virus enfeksiyonu, dünyada yaygın olarak dağılım gösteren enfeksiyon hastalıklarındandır. Altı milyar dünya nüfusunun yaklaşık 1/3'ünün HBV ile enfekte olduğu ve bunların da 400 milyona yakınında kronik enfeksiyon geliştiği bilinmektedir (91). HBV enfeksiyonunun prevalansı, coğrafi açıdan üç kategoriye ayrılarak değerlendirilmekte ve prevalansın %8 ve üzerinde olduğu bölgeler "yüksek endemik", %2-7 arasında olduğu

bölgeler "orta endemik", %2'nin altında olduğu bölgeler ise "düşük endemik" bölgeler olarak kabul edilmektedir (Şekil 2.7) (92). Kronik enfeksiyon göstergesi olarak HBsAg pozitiflik oranları; Çin'de %5.3-12, Güney Kore'de %2.6-5.1, Hindistan'da %2.4-4.7, Tayvan'da %10-13.8, Japonya'da %4.4-13, Afrika'da %5-19, Rusya'da %1.4-8 ve Avrupa'da %0.3-12 arasında bildirilmektedir. Türkiye, epidemiyolojik olarak HBV enfeksiyonu yönünden orta endemik ülkeler arasında yer almaktadır. Ülkemizden bildirilen HBsAg pozitiflik oranları ülke genelinde %1-14.3 arasında değişmekte; batı bölgelerimizde bu oran ortalama %3-5 arasında iken, doğu ve güneydoğu bölgelerimizde çok daha yüksek oranlara (%8-10) ulaşmaktadır (93).



Şekil 2.7. Dünyada HBsAg pozitifliğinin coğrafi dağılımı (2004)
(<http://www.medsci.org/v02p0050.htm>'den alınmıştır)

Hepatit B virus genotiplerinin coğrafi dağılımına bakıldığında, Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Güney Afrika, Asya ve Hindistan'da A; Çin, Tayvan, Tayland, Vietnam ve Japonya'da B ve C; Güney Avrupa, Kuzey Afrika, Orta Doğu ve Hindistan'da D; Batı Afrika'da E; Orta ve Güney

Amerika'da F; ABD ve Fransa'da G ve Orta Amerika'da H genotiplerinin yaygın olduğu görülmektedir (94). Ülkemizde ise HBV enfeksiyonlarından büyük oranda (%85-100) genotip D sorumludur (95-102).

Hepatit B virusunun bulaşı temel olarak genital, parenteral, perinatal ve horizontal yol ile olmaktadır. Farklı coğrafi bölgelerde bulaş yolları arasında belirgin farklılıklar vardır. Örneğin, Batı Avrupa gibi düşük prevalanslı bölgelerde bulaş esas olarak korunmasız cinsel ilişki ve damar içi ilaç kullanımı ile olurken, Sahra-altı Afrika gibi prevalansı yüksek olan bölgelerde predominant bulaş yolu prenatal enfeksiyondur (7, 15).

Cinsel yolla bulaş, HBV'nun başlıca bulaş yollarından olup, özellikle düşük endemik bölgelerde ve gelişmiş ülkelerde enfeksiyon bu şekilde kazanılmaktadır (15, 16). Kronik HBV enfeksiyonlu hastaların birçoğu, hastalıklarından habersiz ve asemptomatik taşıyıcı oldukları için, tüm dünyada virusun cinsel temas ile bulaşında en önemli rolü üstlenmektedirler.

Bulaşta bir diğer önemli yol kan transfüzyonudur. Tüm dünyada kan donörleri HBsAg açısından rutin olarak taramakta; ABD gibi bazı gelişmiş ülkelerde, taramada HBsAg ile birlikte anti-HBc testi de kullanılmaktadır (15). Ancak transfüzyon sonrası hepatit B gelişme riski, ülkelerin prevalans oranları ve donör test stratejileri gibi diğer bazı faktörlere de bağlıdır. Örneğin, düşük prevalanslı bölgelerde transfüzyona bağlı HBV enfeksiyonu 1-4/1.000.000 olarak tahmin edilirken, yüksek prevalanslı bölgelerde 1/20.000 olarak bildirilmiştir (103, 104).

Damar içi ilaç kullananlar arasında enjektör ve iğnelerin paylaşımı ile gerçekleşen perkütan bulaş riski ise, ilacın kullanım süresi, enjeksiyonun sıklığı ve paylaşılan birey sayısı ile artmaktadır. Ayrıca akupunktur ve dövme gibi uygulamaların bulaşta etkili olduğu bilinmektedir. Muhtemel diğer bir perkütan bulaş yolunun da, traş bıçakları ve diş fırçaları gibi kişisel eşyaların ortak kullanımı ile olduğu düşünülmektedir (15).

Perinatal HBV bulaşı, aktif ve pasif immünizasyona rağmen HBsAg pozitif annelerden doğan bebeklerin %10-15'inde ortaya çıkmaktadır. Viral replikasyon düzeyinin yüksek olduğu (>80 pg/ml) HBeAg pozitif annelerden doğan bebeklerde bu oran %70-90'a kadar ulaşabilir. Diğer yandan sezaryan ile doğumun, HIV gibi diğer vertikal yolla geçen hastalıklarda olduğu gibi koruyucu olmadığı belirtilmektedir (15, 16).

Horizontal bulaş, bütünlüğü bozulmuş deri ya da mukoz membranlardan veya yakın temas sonucu gerçekleşebilir. HBV'nun dış ortamda uzun süre canlılığını devam ettirebilmesi nedeniyle kontamine ev eşyaları ve hatta oyuncaklar ile de bulaş oluşabileceği belirtilmiştir. HBV taşıyıcılarının çeşitli vücut salgılarında HBV DNA tespit edilebilmesine rağmen, kan ve genital salgılar dışındaki diğer vücut sıvılarıyla bulaş hakkında önemli bir kanıt yoktur (105).

Hepatit B virusunun nozokomiyal enfeksiyonlara neden olma sıklığı, HIV ve HCV ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğundan, hastanelerde kan kaynaklı bulaşın önlenmesinde, tek kullanımlık iğne/enjektör ve ekipman kullanımı, cerrahi aletlerin sterilizasyonu, enfeksiyon kontrol parametrelerinin uygulanması ve sağlık çalışanlarının aşılınması gibi stratejiler önem kazanmaktadır (106).

Literatürde, HBsAg pozitif donörlerin böbrek ve kornea gibi organlarının naklinden sonra gelişen HBV bulaşı da bildirilmektedir (107). Bu nedenle tüm organ donörleri HBsAg açısından taranmalıdır; ancak anti-HBc taraması tartışmalıdır (15).

2.7. Hepatit B Virus Enfeksiyonlarının Tanısı

Hepatit B virusunun in vitro olarak hücre kültürlerinde üretilmemesi nedeniyle HBV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı temel olarak serolojik ve moleküler yöntemlere dayanmaktadır (108).

2.7.1. Serolojik Tanı

Bu amaçla, virusa ait antijenler ve bunlara karşı konak tarafından oluşturulan antikolar (HBV göstergeleri; *HBV markers*) saptanmaktadır (Tablo 2.2) (108). HBV göstergelerinin saptanmasında en yaygın olarak kullanılan serolojik testler ELISA (manuel, yarı veya tam otomatize) ve kemilüminesans (tam otomatize) yöntemleridir.

Serolojik tanıda ilk adım, HBV enfeksiyonunun akut ya da kronik olduğunun saptanmasıdır (109). Akut HBV enfeksiyonu sırasında saptanan ilk gösterge HBsAg'dir (Şekil 2.8). Hastalık belirtileri başlamadan 3-5 hafta önce serumda saptanabilir düzeye ulaşmakta ve akut enfeksiyon sırasında en yüksek düzeye çıkmaktadır. İyileşme ile sonuçlanan olgularda HBsAg, 2-6 ay içinde azalarak kaybolmakta ve kısa bir süre sonra HBsAg'ye karşı oluşan ve genellikle hayat boyu kalıcı olan anti-HBs antikoları ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.8).

Anti-HBs antikoları nötralizan özelliğe sahip koruyucu antikolardır. Aslında anti-HBs, akut hastalık sırasında daha erken dönemde oluşmakta, ancak çok fazla miktarda HBsAg varlığı nedeniyle antijen tarafından bloke edilmekte ve bu şekilde oluşan immün komplekslerin anti-HBs'nin saptanmasını maskeleyiği düşünülmektedir. HBsAg'nin kaybolduğu ve henüz anti-HBs antikolarının saptanamadığı bu döneme "pencere dönemi" adı verilir. Bu dönemde hem HBsAg hem de anti-HBs negatif olarak bulunduğundan, akut enfeksiyonun tek göstergesi anti-HBc IgM ve/veya total pozitifliğidir. Akut enfeksiyondan sonra anti-HBs antikolarının oluşması, iyileşmeyi ve kazanılan bağışıklığı ifade eder. Anti-HBs pozitifliği, geçirilmiş akut enfeksiyon dışında hepatit B aşısı ile bağışıklama, hepatit B immünoglobulin uygulaması, kan transfüzyonu ve anneden bebeğe pasif geçiş durumlarında da saptanabilmektedir. Serum anti-HBs düzeyinin >10 mIU/ml olmasının, enfeksiyona karşı koruyuculuk sağladığı ifade edilmektedir (110, 111).

Tablo 2.2. HBV Enfeksiyonunun Tanı ve İzleminde Kullanılan Serolojik Göstergeler*

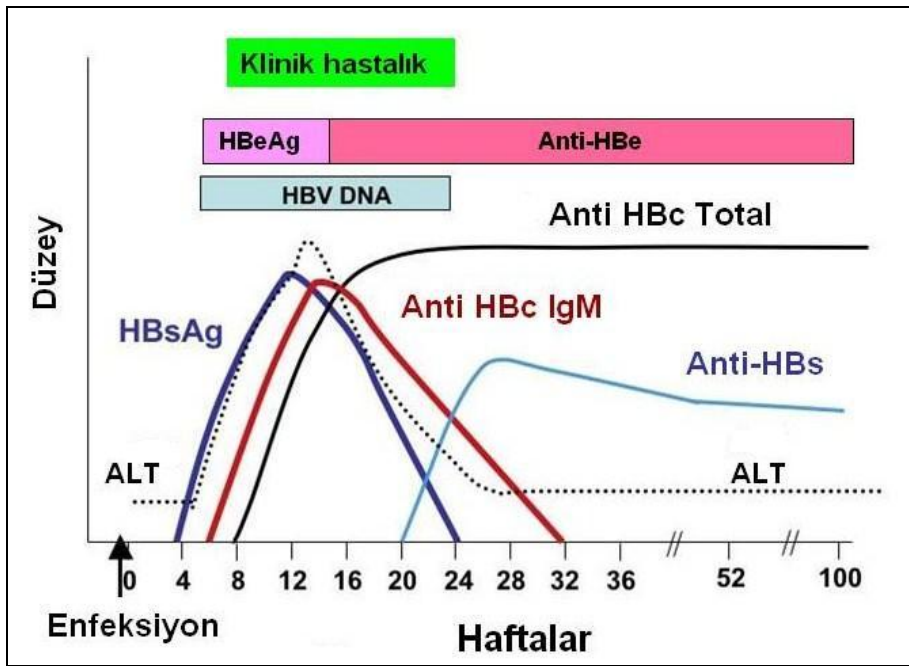
Enfeksiyonun Durumu	Serolojik HBV Göstergeleri						HBV-DNA
	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc IgM	Anti-HBc total	HBeAg	Anti-HBe	
İnkübasyon dönemi	+/-	-	-	-	+	-	+/- ^c
Akut enfeksiyon	+	-	+	-/+	+	-	+
Geçirilmiş enfeksiyon	-	+	-	+	-	+/-	-
Kronik taşıyıcılık	+	-	-	+/-	-	+	-
Kronik aktif hepatit	+	-	- ^b	+/-	+	-	+ ^c
Kronik aktif hepatit (prekor mutanti ile)	+	-	-	+/-	-	+	+ ^c
Aşılama	- ^a	+	-	-	-	-	-

* HBV-DNA serolojik bir gösterge olmayıp, tanı bütünlüğü amacıyla tabloya eklenmiştir. ^aAşılamanın 1-2. haftasında aşı antijeninin düşük düzeyde tespit edilmesine bağlı olarak yalancı pozitif sonuç alınabilir; ^bKronik olarak enfekte bazı bireylerde pozitif olabilir; ^cYöntemlerin duyarlılığı etkili olmaktadır.

Akut enfeksiyon sırasında HBsAg'nin ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra serumda HBeAg belirmekte ve HBsAg negatifleşmeden önce kaybolmaktadır (Şekil 2.8). Serumda HBeAg'nin varlığı, bulaşıcılık, enfektivite ve aktif viral replikasyon ile ilişkilidir. HBeAg kaybolduktan kısa bir süre sonra anti-HBe antikoları ortaya çıkmakta; bu serokonversiyon ise viral replikasyonda azalmayı ve hastalık prognozunun iyiye gittiğini göstermektedir. Ancak prekor mutantlar, HBeAg eksprese etmeden aktif replikasyon göstererek, siroz ve HCC gelişimi için yüksek risk oluştururlar (52, 110).

Kor proteinine karşı oluşan IgM tipi antikolar, HBsAg'nin pozitifleşmesinden kısa bir süre sonra oluşan ilk HBV antikolarıdır (Şekil 2.8). Anti-HBc IgM pozitifliği virusla yeni karşılaşmayı işaret ettiğinden, akut HBV enfeksiyonu için tanısal değer taşır. Daha sonra anti-HBc IgM, yerini anti-HBc IgG/total antikolarına bırakmakta ve bu antikolar da genellikle

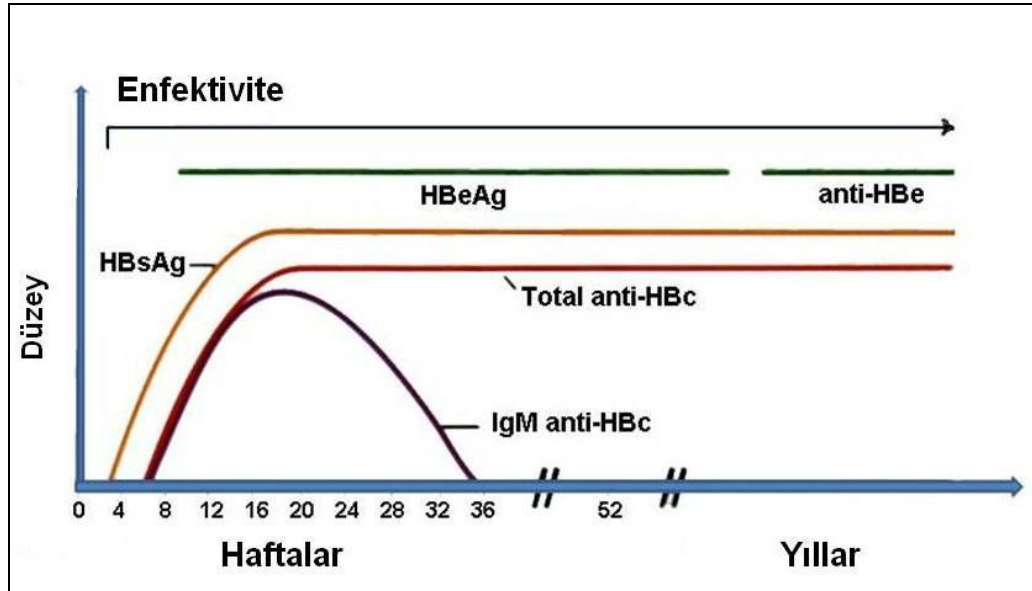
serumda hayat boyu kalmaktadırlar. Bu nedenle anti-HBc IgG/total pozitifliği anti-HBs varlığı ile birlikte doğal olarak geçirilen enfeksiyona karşı gelişen bağışık yanıtı gösterir. Buna karşın tek başına saptanan anti-HBc pozitifliğinin yorumlanması ile ilgili çelişkiler vardır. Örneğin kronik hepatit C enfeksiyonlu hastalarda saptanan tek başına anti-HBc pozitifliği, parenteral maruziyetin olduğu bu hastalarda, muhtemelen iyileşmiş ya da düşük düzey HBV enfeksiyonunu göstermektedir. Kan donörlerinde saptanan izole anti-HBc pozitifliği ise, özellikle de ELISA testlerinde optik dansite düşük bulunmuşsa, muhtemelen yanlış pozitif sonucu düşündürmelidir. İyileşmiş ya da düşük düzeyde devam eden HBV enfeksiyonları için altın standart bir tanı yönteminin eksikliğinden dolayı, izole anti-HBc pozitifliğinin yorumu ciddi bir sorun oluşturmaktadır (111, 112).



Şekil 2.8. İyileşme ile sonuçlanan akut HBV enfeksiyonunda tanısal göstergeler

Kronik HBV enfeksiyonlarında ise, HBsAg genellikle ömür boyu kalıcı olmakta ve genellikle anti-HBs antikorları saptanmamaktadır (Şekil 2.9). Bu hastalarda HBeAg pozitifliği değişkenlik göstermektedir. Anti-HBc IgM, akut enfeksiyondan sonra 6 ay içinde sıklıkla negatifleşmesine rağmen, bazen

kronik enfeksiyonun akut alevlenmeleri sırasında serumda saptanabilir düzeylere ulaşmaktadır (Tablo 2.2) (111).



Şekil 2.9. Kronik HBV enfeksiyonunda serolojik göstergeler

2.7.2. Moleküler Tanı

Hepatit B enfeksiyonunun tanısında moleküler yöntemlerin kullanım alanları; (a) Kantitatif viral yük testleri, (b) Genotiplendirme testleri, (c) İlaç direncinde mutasyon varlığını saptayan testler ve (d) Kor promotor/prekor bölge mutasyon testleri olmak üzere dört amaca yöneliktir (88).

Kantitatif HBV DNA testlerinin, kronik hepatit B'nin ilk değerlendirmesi sırasında ve prognozun takibinde olduğu kadar, tedavinin başlamasında ve antiviral ajanlara karşı yanıtın takibinde de büyük önemi vardır (113). Plazma ya da serumda HBV DNA'sının tespiti, kronik HBV enfeksiyonunun tanı kriterlerinden biri olduğundan, serolojik testlerle birlikte HBV DNA düzeyinin de çalışılması bir gerekliliktir (Tablo 2.2) (88).

HBV genotipleri ile kronik enfeksiyon gelişim riski ve tedaviye yanıt arasında yakın ilişki olduğu bildirilmektedir. Örneğin genotip B ile enfekte olan hastalar, genotip C ile enfekte olanlara göre daha iyi progresyon

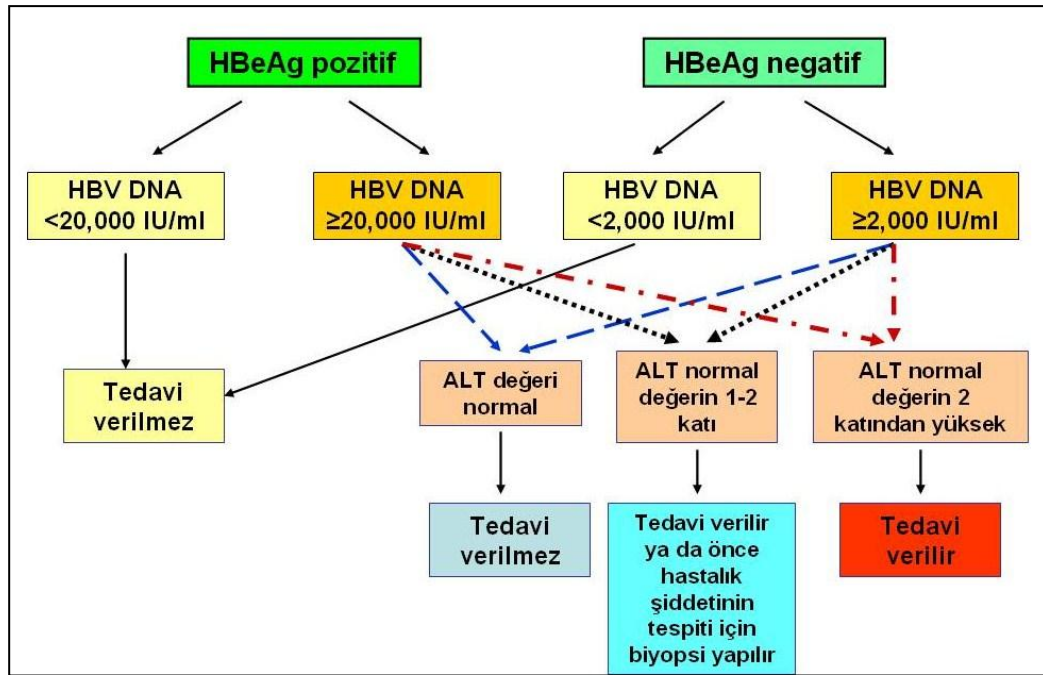
göstermektedir. Benzer olarak farklı genotiplerin antiviral tedaviye olan yanıtları da farklı olabilmektedir. Bu nedenlerden dolayı moleküler yöntemler ile HBV genotiplendirmesinin yapılması önerilmektedir. Genotiplendirme için DNA dizi analizi ve *Line Prob Assay* gibi yöntemler kullanılabilir (88, 114).

Tedavi alan kronik hepatit B'li hastalarda, antiviral ilaçlara karşı direnç gelişiminin izlenmesinde viral yük takibinin yapılması ve tedaviye yanıtızlığın olduğu durumlarda dirence neden olan mutasyonların saptanması için de yine moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır (3).

2.8. Hepatit B Virus Enfeksiyonlarının Tedavisi

Hepatit B virusuna karşı etkin antiviral aktivite gösteren birçok ajanın varlığına rağmen, genel bir prensip olarak, akut HBV enfeksiyonlarında özgül antiviral tedavi uygulanmamaktadır (7). Semptomatik akut hepatit B'li hastalara destekleyici tedavinin uygulanması yeterlidir. Bunlar arasında yatak istirahati, kusma ve diyare nedeniyle ortaya çıkan sıvı kaybının giderilmesi, ateş ve eklem ağrılarının antipiretik ve analjeziklerle semptomatik tedavisi yer almaktadır.

Kronik hepatit B'li hastalarda ise antiviral tedavi, siroz ve HCC gelişiminin önlenmesi ve riskin azaltılması amacıyla uygulanmaktadır. Tedavinin başarısı; virusun süpresyonu (HBV DNA'nın negatifleşmesi, HBeAg ve HBsAg kaybı) ve karaciğer fonksiyonlarının düzelmesi (ALT düzeyinin normale dönmesi, karaciğer histolojisinin düzelmesi) ile ölçülmektedir (115). Tedaviye, virusun replikasyon durumu (viral yük) ve karaciğer hastalığının düzeyi dikkate alınarak başlanmakta ve tedavi protokolü hastanın yaşı, tedaviye uyumu ve HBeAg durumuna göre düzenlenmektedir (113) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Kronik HBV enfeksiyonunun tedavi algoritması (<http://knol.google.com>'dan uyarlanmıştır)

2.8.1. Antiviral Ajanlar

Kronik HBV enfeksiyonunun tedavisi için onay almış ilaçlar iki grupta toplanmaktadır. Bunlardan birincisi, viral replikasyonu inhibe etmesinin yanı sıra konağın immün yanıtını da düzenleyen alfa-interferonlar (IFN- α); diğeri ise HBV DNA sentezini direkt olarak inhibe eden nükleoz(t)id analoglarıdır. Günümüzde Avrupa ülkelerinde uygulanan yedi farklı tedavi yaklaşımı mevcuttur. Bunlar; standart interferonlar (IFN- α 2a ve α 2b), pegile interferon (PegIFN- α 2a), nükleozid analogları (lamivudin, telbivudin, entekavir) ve asiklik nükleotid analogları (adefovir, tenofovir) olarak sıralanabilir (Tablo 2.3). HBV'na karşı antiviral aktivite gösteren ve klinik kullanım için geliştirilen diğer nükleoz(t)id analogları arasında ise emtrisitabin, klevudin, torsitabin, amdoksovir ve alamifovir yer almaktadır (116-118).

İlaç	Ticari adı	Doz
İnterferon alfa-2b	<i>Intron A</i>	5 milyon IU sq qd veya 10 milyon IU sq 3x/hafta
Peginterferon alfa-2a	<i>Pegasys</i>	180 mcg sq haftada bir kez
Lamivudine (3TC)	<i>Epivir-HBV (100 mg)</i> <i>Epivir</i>	100 mg PO qd 300 mg PO qd
Adefovir (ADV)	<i>Hepsera</i>	10 mg PO qd
Entecavir (ETV)	<i>Baraclude</i>	0.5 mg PO qd → Naif hastaların tedavisi için 1 mg PO qd fo → Lamivudine dirençli hastalar için
Telbivudine (LdT)	<i>Tyzeka</i>	600 mg PO qd
Tenofovir (TDF)	<i>Viread</i>	300 mg PO qd
IU: İnternasyonal ünite; sq: Subkütan; PO: Oral yol; qd: Günde bir kez; bid: Günde iki kez		

Tablo 2.3. Kronik HBV enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan antiviral ajanlar(<http://depts.washington.edu/hepstudy/hepB/mgmt/agents/discussion.html> 'den uyarlanmıştır)

2.8.1.1. Alfa İnterferonlar

Standart IFN- α (Roferon A®, Intron A®) tedavisi, nükleoz(t)id analoglarının aksine antiviral dirence neden olmamakta, ancak sınırlı süre (haftada 3 kez 3-10 MU, 6-12 ay boyunca) uygulanmaktadır (117). Zira yan etkileri fazla olup, hastaların %30'unda tedaviye son verilmesi gerekmektedir.

Standart IFN- α 'nın polietilen glikol molekülü ile pegilasyonu sonucu elde edilen pegile IFN- α ise, yarı ömrü daha uzun olduğundan daha yüksek sistemik kalıcılık ve daha iyi biyolojik etki oluşturan bir moleküldür. Günümüzde sadece PegIFN- α 2a (Pegasys®), HBeAg negatif ve pozitif kronik hepatit B tedavisinde kullanılmak için Avrupa ve Amerika'da onay almıştır. Haftada bir kez cilt altından uygulanır; ancak tedavi sırasında halsizlik, doza bağlı trombositopeni ve lökopeni gibi ciddi yan etkiler ortaya çıkabilir. ALT düzeyinde yükselmeler nedeniyle dekompanse karaciğer sirozunda kullanımı kontrendikedir (117, 118).

2.8.1.2. Nükleoz(t)id Analogları

Nükleoz(t)id analogları (NA) ön ilaç (*pro-drug*) olarak kabul edilebilir, zira polimeraz inhibitörü olarak etki gösterebilmeleri için fosforile edilerek aktive olmaları gereklidir. Bu ilaçlar önce hücresel kinazlarla nükleozid monofosfatlara, daha sonra da yine hücresel enzimlerle difosfat ve trifosfat formlarına dönüşmektedir. Günümüzde; L-nükleozidler (lamivudin, telbivudin, emtrisitabin, klevudin), asiklik fosfonat nükleotidler (adefovir, tenofovir) ve siklopentan deoksiguanozin analogları (entekavir, abakavir/karbovirin) olmak üzere üç grup ajan mevcuttur (119).

Lamivudin (Zeffix®, Epivir®, Lamivir®): İyi tolere edilebilen oral L-nükleozid analogu olan lamivudin (LVD), DNA zincir sentezini sonlandırarak HBV replikasyonunu durdurur. HBeAg pozitif kronik hepatit B (KHB) hastalarında 100 mg/gün dozunda kullanıldığında bir yıllık tedavi ile HBV DNA düzeyi ortalama 5.5 log kopya/ml azalmaktadır. Hastaların %36-41'inde ise HBV DNA tespit edilemeyen düzeylere gerilemekte ve yaklaşık %20 hastada HBeAg serokonversiyonu elde edilmektedir (120). Tedavi süresince HBsAg serokonversiyonu nadirdir, ancak HBeAg serokonversiyonu elde edilen hastalarda tedaviden sonraki 3 yıl içinde %20 oranında HBsAg kaybı görülebilmektedir (121). Replikasyonunun durdurulmasına rağmen HBV, hepatositlerin içinde varlığını devam ettirmekte ve 1-2 yıllık tedavilerde, tedavi kesildikten sonra tekrar replike olmaya başlamaktadır. Bu durumda tedavinin uzun süre verilmesi önerilmektedir; ancak uzun süreli tedavide ilaç baskısı nedeniyle mutant suşlar seçilmektedir. Bu mutantlar, polimeraz enziminin aktif katalitik bölgesindeki yüksek derecede korunmuş YMDD motifinde M→V, M→I veya M→S (rtM204V/I/S) aminoasitlerinin değişimi sonucu meydana gelmekte ve 5 yıllık tedavi sonrası %70'e varan oranlarda gelişmektedir. YMDD aminoasit motifi, HBV ve HIV polimerazlarının her ikisinde de görülmekte olup, bu motif LVD, emtrisitabin ve telbivudine karşı direnç neden olmakta ve aynı zamanda entekavir ile tedavi için de direnç riski taşımaktadır (61, 121).

Telbivudin (Tyzeka®, Sebivo®): Telbivudin (LdT), timidinin L-nükleozid analogudur ve HBV DNA zincir sentezini sonlandırır. HBeAg negatif hastaların birçoğunda bir yıllık LdT tedavisi sonrası HBV DNA düzeyi saptanamayan sınırlara düşmüş ve bu yanıt LVD ile karşılaştırıldığında daha yüksek olmuştur. Bir yıllık tedavi sonrası HBeAg pozitif (rtM204I) hastalarda %5, HBeAg negatif hastalarda ise %2 direnç görülmüş, ancak 5 yıllık tedavi sonrası bu oran HBeAg pozitif hastalarda %25'e yükselmiştir. LVD ile çapraz direnç göstermesi ve tedaviyle ortaya çıkan yüksek direnç oranı nedeniyle LdT, HBeAg pozitif hastaların tedavisinde bir seçenek olarak kabul edilmemektedir (117).

Adefovir Dipivoksil (Hepsera®): Bu ilaç, zincir sentezini sonlandırarak HBV polimerazı inhibe eden oral asiklik fosfonat nükleotid analogudur (117). Ayrıca polimeraz proteininin *priming* fonksiyonunu da bozmaktadır. Adenozinden daha küçük asiklik yapıda olduğu için LVD'ye karşı gelişen direnç mekanizması etkili olmamaktadır. HBeAg negatif hastalarda 5 yıllık tedaviden sonra %29 oranında dirence neden olan rtA181T ve rtN236T mutasyonları gelişmektedir (122). Adefovir (ADV) LVD ile çapraz direnç göstermez ve bu nedenle LVD'ye dirençli KHB hastalarında daha etkilidir (123).

Tenofovir (Viread®): Tenofovir disoproksil fumarat, adefovir gibi oral yoldan uygulanan bir nükleotid analogudur. Etki, potens ve antiviral direnç profili yönünden adefovir ile benzerlik gösterir. HBeAg pozitif hastalarda 48 haftalık tedavi ile %80 oranında HBV DNA negatifliği sağlamaktadır (117). HBeAg negatif hastalarda ise % 95 oranında başarı elde edilmiştir. KHB hastalarında 2 yıllık tedavi sonrası tenofovir direncini gösteren hiçbir kanıt elde edilmemiştir (124).

Entekavir (Baraclude®): Bir siklopentil guanozin analogu olan entekavir (ECV), HBV DNA *priming* fonksiyonunu, negatif zincirli DNA'nın ters transkripsiyonunu ve pozitif zincirli DNA'nın sentezini inhibe etmektedir. Bu nedenle HBV'na karşı çok güçlü etkisi vardır. HBeAg pozitif ve negatif

hastalarda 0.5 mg/gün dozunda tedavi ile LVD' ye göre belirgin oranda yüksek virolojik, biyokimyasal ve histolojik yanıt elde edilir (117). HBsAg kaybı bir yıllık tedaviden sonra %2 iken, tedaviden yıllar sonra %5'e ulaşmaktadır. LVD tedavisi almamış hastalarda entekavire direnç oldukça nadir olup, 6 yıllık tedavi sonrası sadece %1-2 olarak bildirilmektedir. Buna karşın LVD'e dirençli hastalarda bir yıllık tedavi sonrası %1-4 oranında entekavir direnci ortaya çıkmaktadır (125).

2.8.2. Antiviral İlaçlara Direnç Mekanizmaları

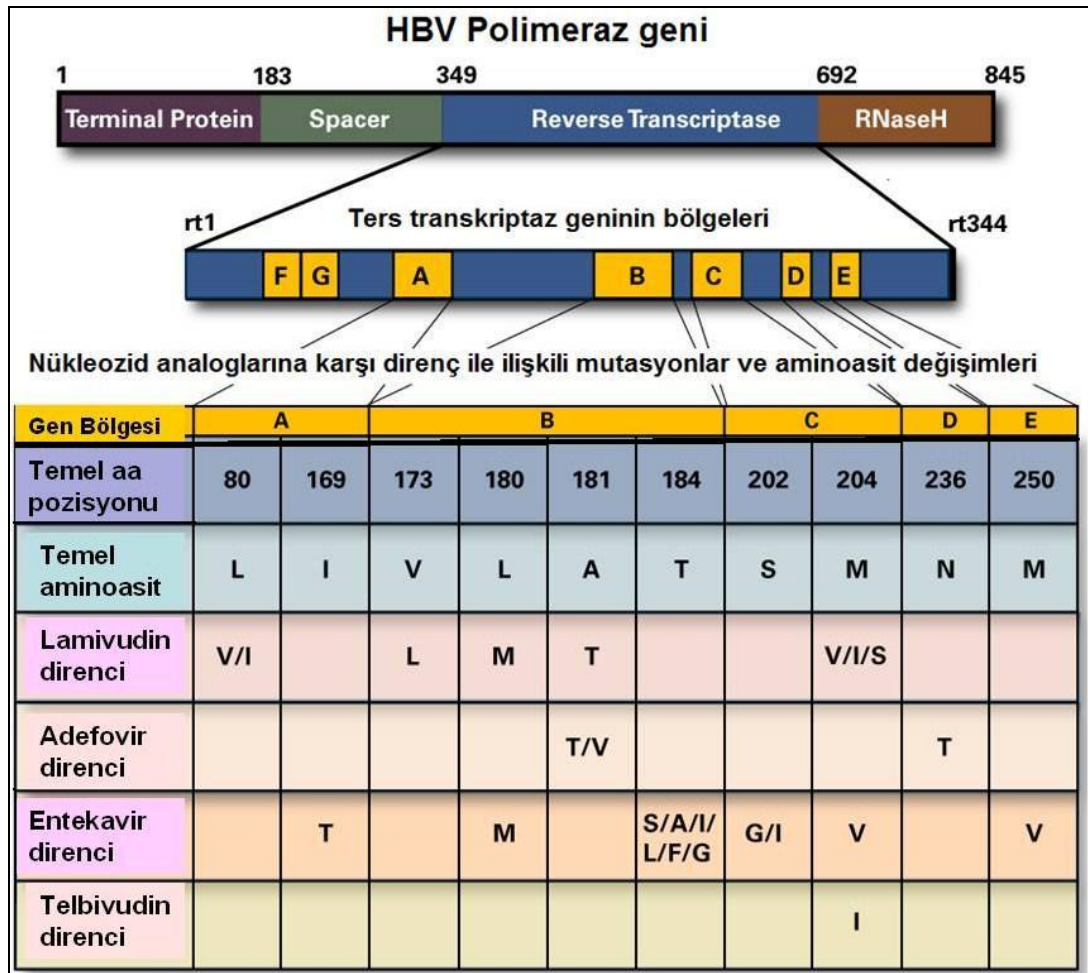
Yüksek replikasyon hızına ve buna bağlı olarak da yüksek mutasyon oranına sahip olan HBV'nun neden olduğu kronik enfeksiyonların tedavisinde monoterapi, büyük olasılıkla dirençli virus suşlarının seçilmesi ile sonuçlanacaktır. Bu nedenle ideal tedavi rejimi, farklı bölgeleri hedef alan antiviral ilaçları içermelidir. Böylece replikasyonun tamamen baskılanması sağlanabilir ve direnç gelişimi önlenir. Antiviral ajanlara karşı direnç gelişimi virusa, konağa ve ilaca bağlı faktörlerin karşılıklı etkileşimi ile belirlenmektedir (119).

Lamivudin (LVD) direnci: HBV polimerazında LVD direnci ile ilişkili olarak rtM204V ve rtM204I olmak üzere iki primer mutasyon tanımlanmıştır (Şekil 2.11). Bunlardan rtM204V mutasyonu genellikle onarıcı (kompansatuvar) rtL180M mutasyonu ile ilişkilidir (3). Primer LVD mutasyonları olan rtM204V/I sonucunda valin ve izolösinin, ilacın polimeraza bağlandığı yüzey bölgesinde sferik engellemeye neden olduğu ve bağlanma için gerekli katalitik aktiviteyi azalttığı tespit edilmiştir (119).

Sıklıkla rtM204V mutasyonu ile birlikte bulunan rtL180M mutasyonu LVD'ye direnci artırır; ancak tek başına LVD direncine katkıda bulunmaz (121). RtM204V/I ± rtL180M mutasyonları olan suşların, adefovir ve entekavire duyarlı iken diğer L-nükleozidlerine direnç gösterdiği belirlenmiştir (126).

Adefovir(ADV)/Tenofovir(TDF) direnci: ADV direnci ile ilişkili primer mutasyonlar, polimerazın D kangalındaki rtN236T ve rtI233V ve B kangalındaki rtA181V değişimidir (Şekil 2.11). Bu mutasyonlar ilacın polimeraza bağlanma afinitesini azaltmaktadır (119).

Tenofovire direnç ile ilişkili olarak da rtA194T mutasyonu bildirilmiştir. Bu mutasyonun da dNTP bağlanma bölgesi ile ilişkili olarak DNA kalıp zincirinin pozisyonunu değiştirebildiği ve DNA polimerizasyonunu etkilediği öne sürülmüştür (127).



Şekil 2.11. Polimeraz geninde nükleoz(t)id analoglarına karşı primer direnç mutasyonları(<http://depts.washington.edu/hepstudy/hepB/mgmt/treatment/discussion.html>'den) uyarlanmıştır)

Entekavir (ECV) direnci: ECV'e direnç gelişiminde rtM204V/I primer LVD direnç mutasyonu ön şart olarak görülmektedir. Bununla birlikte ECV direncinin klinik ya da fenotipik ekspresyonu için rtM204V/rtL180M mutasyonlarına ek olarak rtT184G, rtS202I, rtM250V ve rtI169T mutasyonlarının da olması gereklidir (Şekil 2.9). Moleküler modellemede rtM250 ve rtI169 mutasyonlarının nükleik asit primer ya da kalıbı ile etkileşim gösterirken, rt184 ya da rtS202'de olan değişimlerin dNTP bağlanma bölgesinin yanındaki geometriyi değiştirdiği gösterilmiştir. ECV direnci için çoklu mutasyonların gerekmesi, direnç için yüksek bir genetik bariyer olduğunu düşündürmektedir (3, 119).

2.8.3. Direnç Tespiti ve İzlenmesi

Antiviral ilaç direncinin belirlenmesinde HBV viral yük testleri, genotiplendirme ve fenotiplendirme testleri kullanılmaktadır (128). Günümüzde kullanılan HBV DNA testleri ile, ilaca dirençli HBV popülasyonunun ortaya çıkışı yavaş olsa bile, viral yükteki artış duyarlı bir şekilde saptanabilmektedir. Genotiplendirme amacıyla ise DNA dizi analizi, PCR ürünlerinin DNA dizi analizi, klonlanmış HBV segmentlerinin DNA dizi analizi, *Line prob* yöntemi, PCR RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), gerçek zamanlı PCR, mikroçip ile DNA dizi analizi, pirosekanslama, peptid nükleik asit problemleri ile PCR ve FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) problemleri ile gerçek zamanlı PCR gibi yöntemler uygulanabilir (3, 6).

HBV genom dizi analizi yöntemi, yeni testlerin geliştirilme çalışmalarında altın standart olarak kabul edilmektedir. Hedeflenmiş viral genom bölgesinin PCR ile amplifikasyonundan sonra yapılan dizi analizi; viral genotip, prekor/kor, bazal kor promotör ve polimeraz mutasyonları hakkında bilgi edinilmesini sağlar. Bu tekniğin en önemli avantajı, henüz direnç mutasyonunun bilinmediği yeni antiviral ilaç alan hastalarda herhangi bir yeni mutasyonu saptayabilmesidir. Majör dezavantajları ise, zaman alıcı olması ve PCR ile amplifikasyon ve dizi analizine ihtiyaç duyulmasıdır (6).

Hibridizasyon temelli Line-Prob (INNO-LiPA) yöntemiyle ise total virus popülasyonunun %5-10'undan sorumlu mutantlar saptanabilir. Bu yöntem, hastalık progresyonu açısından yüksek riskli olgular için avantajlıdır (3).

Dirençli mutantların in vitro fenotipik analizi için geliştirilen yaklaşımlar arasında ise; viral polimeraz için enzimatik yöntemler, dirençli HBV mutanti eksprese eden devamlı hücre kültürleri ve viral replikasyonun ve ilaç duyarlılığının analizi için dirençli mutantın genomunun transfer edilebildiği hücre kültür modelleri sayılabilir (128).

2.9. Hepatit B Virus Enfeksiyonlarından Korunma ve Aşısı

Hepatit B virus enfeksiyonlarından korunmada temel önlemler risk faktörlerinden sakınma ve aşılama'dır. Bugün için HBV aşısı, ülkemiz de dahil olmak üzere dünyanın birçok ülkesinde rutin ulusal aşılama programına dahil edilmiştir (129). Bu programa göre tüm bebekler universal olarak, daha önceden aşılanmamış çocuk ve adölesanlar rutin olarak ve daha önceden aşılanmamış erişkinler risk grubundakiler öncelikli olmak üzere aşılanmaktadır.

Rekombinant DNA teknolojisi ile hazırlanan HBV aşısı, altı aylık süre zarfında (0, 1, 6. ay) üç doz kas içi olarak uygulanmaktadır. Etkinliği son derece yüksek olan bu aşılarda, üç dozluk aşılama'yı takiben sağlıklı erişkinlerde %95-100 ve sağlıklı çocuk/adölesanlarda %90-95 oranında immünojenik olduğu bilinmektedir (129-131). Aşıya karşı yanıtızsızlık ya da düşük yanıtı neden olan faktörlerin, bebeklerde düşük doğum ağırlığı, erişkinlerde ise 40 yaş üzerinde olma, erkek cinsiyet, sigara kullanımı, obesite ve altta yatan bazı hastalıklar (immün süpresyon, HIV enfeksiyonu, böbrek yetmezliği, siroz) ile ilişkili olduğu saptanmıştır (130).

Aşının indüklediği immün yanıt uzun süre kalıcı olup, antikor düzeyleri 15 yıldan uzun süre koruyucudur (129). Her ne kadar koruyucu antikor düzeyi >10 mIU/mL olarak kabul ediliyorsa da, daha düşük hatta saptanamayan titrelerde bile olsa, aşılanmış tüm bireyler HBV

enfeksiyonuna karşı bağışık kalmaktadır (129, 130). Bu durum, aşının indüklediği immün yanıtın, oluşan bellek hücreler tarafından devam ettirilmesine bağlıdır (131). Dolayısıyla günümüzde aşının tekrar (*booster*) dozunun uygulanması önerilmemektedir (130).

HBV aşısı son derece güvenilir bir aşı olup, bazı nörolojik yan etkilerin bildirildiği raporlar olmakla birlikte, bunlar olgu bazındadır ve nedensel bir ilişkiyi işaret etmemektedir (130). Aşılama sonrası en sık rastlanılan yan etkiler, enjeksiyon yerinde ağrı, ateş, baş ağrısı, kas ağrıları ve hafif yorgunluk şeklindedir. Aşıya karşı alerjik reaksiyon gelişme riski ise 1/1.1 milyon doz olarak öngörülmektedir (129).

Hepatit B virusu ile temas sonrası enfeksiyonun önlenmesi amacıyla iki profilaktik tedavi yaklaşımı mevcut olup, bunlardan birisi HBV aşılması, diğeri ise hepatit B immünoglobulin (HBIG) uygulamasıdır. Endikasyon olduğu durumlarda (örneğin, HBsAg pozitif anneden doğan bebekler, vb) her iki tedavinin birlikte uygulanması gereklidir (131). Virus ile karşılaşmadan sonra kısa süre içinde (doğumu takiben 12 saat; iğne batmasını takiben 7 gün; cinsel teması takiben 14 gün içinde) uygulandıklarında hem HBIG hem de aşının koruyuculuğu oldukça yüksektir ve olguların sadece 5%’inde semptomatik enfeksiyon gelişebilir (130).

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Bu çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Ünitesi'nde kronik hepatit B tanısı konulan ve bir yıl ve/veya daha uzun süre lamivudin tedavisi alan 38 hasta dahil edilmiştir. Hastalar, HBV viral yük ve karaciğer enzim düzeylerinin rutin kontrolü için Gastroenteroloji Ünitesi'ne başvurdukları zaman kan örnekleri alınarak serumları ayrılmış ve çalışmaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

Çalışmaya alınan olgular, HBV göstergeleri (HBsAg, HBeAg, anti-HBc total, anti-HBe, anti-HBs), karaciğer enzim (ALT, AST) düzeyleri ve viral yük değerleri (HBV DNA) daha önceden belirlenmiş hastalardır. Bu hastalarda HBV göstergeleri kemilüminesans immünolojik yöntemi ile (Architect® HBsAg, Abbott, Almanya); ALT ve AST düzeyleri modüler bir otoanalizör ile (Roche/Hitachi, Tokyo, Japonya) ve HBV DNA düzeyleri gerçek zamanlı PCR (COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test, version 2.0, Roche, ABD) yöntemi ile çalışılmıştır.

Çalışmamıza dahil edilen olguların enfekte olduğu HBV süşunun polimeraz geninde antiviral ilaçlara karşı direnç oluşturan mutasyonların varlığı, DNA dizi analizi ve hibridizasyon temeline dayanan ticari Inno-Lipa HBV DR v2 testi (Innogenetics, Belçika) ile araştırılmıştır.

3.2. Etik Kurul Onayı

Çalışmanın amaç ve içeriği ile ilgili olarak hazırlanan detaylı rapor "Etik Kurul Başvuru Dosyası" halinde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı'na sunulmuş ve 27.08.2009 tarih ve FON 09/45-188 sayı ile değerlendirilerek Etik Kurul onayı alınmıştır.

3.3. Hepatit B Virusunda İlaç Direncine Neden Olan Mutasyon Varlığının Saptanması

3.3.1. DNA Dizi Analizi

3.3.1.1. Yöntemin Mekanizması

Dizi analizi, bir DNA zincirinin tüm nükleotid dizilerinin belirlenmesi anlamına gelmektedir. Çift polimer bir yapı olan DNA molekülünde guanin (G), sitozin (C) ile ve adenin (A), timin (T) ile eşleşmektedir. DNA'nın bir zinciri, komplementer DNA (cDNA) zincirlerinin oluşturulmasını sağlar ve bu komplementer zincir orijinal zincirin tekrar oluşturulmasında kullanılabilir. DNA dizi analizi yöntemleri, temelde aynı prensibe yönelik olup, her biri bir öncekinden bir baz daha fazla içeren seriler halinde tek zincirli DNA moleküllerinin oluşturulması esasına dayanırlar. Bu moleküller, elektroforez ile dizinin okunabilmesini sağlayan merdiven şeklinde gözlenirler (132). Dizi analizi yöntemlerinden Sanger yöntemi, dideoksi zincir sonlanması yöntemi olup günümüzde en fazla kullanılan yöntemdir. Bu yöntem; 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 parçaların uzunluklarının belirlenmesi esasına dayanmaktadır (133).

Elektroforeze dayalı bir uygulama olan dideoksi zincir sonlanması yöntemi ile DNA zincirindeki her bir bazın pozisyonu tek tek belirlenmektedir. Bu yöntemde işaretlenen DNA parçaları, yüksek çözünürlükteki poliakrilamid jelde ayrılarak baz dizilerinin okunması sağlanmaktadır (132). Bu yöntem teknik olarak üç basamaktan oluşmaktadır:

1. Polimeraz zincir reaksiyonu (*Polymerase Chain Reaction; PCR*)
2. Dizileme (sekans) reaksiyonu
3. Jel elektroforezi ve bilgisayarda değerlendirme

Dizileme reaksiyonunda saflaştırılmış bir DNA kalıbı, Taq DNA polimeraz, primer, deoksinükleotid ve dideoksinükleotid gibi bileşenler kullanılır. Reaksiyon, PCR gibi 3 ana basamakta ve ortalama 30-40 döngüde gerçekleşir. Klasik ısı döngü cihazlarında uygulanan bu reaksiyon sırasında lineer bir artış elde edilmektedir. Bu yöntemde, temel PCR prensibine göre, DNA polimeraz ile primerin 3` ucundan DNA sentezi başlatılmakta ve her bir yeni nükleotid son nükleotidin 3`-OH grubuna eklenmektedir. Dideoksi yöntemi ismini, reaksiyonda kritik bir rol oynayan 3` karbon atomunda -OH` in eksik olduğu sentetik nükleotidden alır. Dideoksinükleotidlerin reaksiyona uygun konsantrasyonlarda eklenmesiyle oluşan DNA oligonükleotid zincirlerinin uzaması, diğer nükleotidin bağlanması için gerekli olan 3`-OH eksik olduğu için rastgele bir biçimde sonlanmaktadır. Bu nedenle dideoksi yöntemi, 'zincir sonlanma yöntemi' olarak adlandırılmaktadır. Sonlandırıcı özellikteki bu bazlar, 4 farklı floresan boya ile işaretlenir ve reaksiyon 4 farklı tüpte, 4 ayrı reaksiyon karışımı halinde gerçekleştirilir. Reaksiyon sonucunda, deoksinükleotidlerle uzamış ve dideoksinükleotidler ile sonlanmış çeşitli uzunlukta diziler elde edilmiş olur. Tüm dizilerin 5` uçları aynıdır, ancak 3` uca özgün baza göre uzunlukları değişecektir. Bu dizilerin son bazları otomatik dizi analizi cihazlarında (*Cycle Sequencing*) okunabilmektedir (132, 134).

3.3.1.2. Yöntemin Uygulanması

a) HBV DNA Eldesi

Çalışmamızda, hastaların serum örneklerinden DNA izolasyonu, ticari bir spin kolon nükleik asit ekstraksiyon kiti olan *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche Diagnostics, Almanya) ile üreticinin önerileri doğrultusunda yapıldı. Buna göre 200 µl hacimdeki her bir örneğe, poli(A) taşıyıcı RNA solüsyonu ve proteinaz K içeren 200 µl bağlanma solüsyonu [*Binding Buffer (BB)*; 6 M guanidin-HCL, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCL, %20 Triton X-100, pH: 4.4 (25°C)] eklenerek karıştırıldı; 72°C'de 10 dakikalık inkübasyonu takiben, 100 µl BB daha eklenerek kolonlara aktarıldı ve 1 dakika 12.000 rpm'de santrifüj

uygulandı. Kolonlara 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı solüsyon [*Inhibitor Removal Buffer*]; saf alkolde 5 M guanidin-HCL, 20 mM Tris-HCL, pH: 6.6 (25°C)] eklendi ve aynı şekilde santrifüj edildi. Daha sonra 450 µl yıkama solüsyonu [*Wash Buffer (WB)*]; saf alkolde 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCL, pH: 7.5 (25°C)] ile iki kez yıkanan kolonlara, önceden ısıtılmış ayrıştırma solüsyonu [*Elution Buffer*, 10 mM Tris-HCL, pH: 8.5 (25°C)] eklendi; 1 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildi ve nükleik asit eldesi gerçekleştirildi.

Saflaştırması tamamlanan örnekler, mutasyon analizi yapılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

b) İki Turlu (*Nested*) PCR

Bu yöntem HBV DNA'sında polimeraz gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla uygulandı. Direncin araştırılacağı hedef bölgeler ve bu bölgeler ile ilgili primer dizileri Bozdayı ve arkadaşlarının çalışmasından alındı (135) (Tablo 3.1).

Birinci tur PCR reaksiyonu için örnek başına, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, her bir primerden 25 pmol içerecek şekilde 1.5 ml'lik ependorf tüpünde PCR karışımı hazırlandı (Tablo 3.2). 5 µl 10x tampon (*buffer*), 0.5 µl Taq polimeraz ve 29.5 µl steril distile su eklendikten sonra oluşturulan karışım, vorteks cihazında (Velp® Rx3, İtalya) hafifçe karıştırılıp mikrosantrifüj (Hettich, Almanya) ile 3000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildikten sonra, her bir örneğe ait ve üzerinde numaraları yazılı steril 0.2 ml'lik PCR tüplerine 45 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Daha sonra üstlerine 5'er µl DNA örneği konulup ısı döngü cihazına (MyGenie32 Thermal Block, BIONEER, Kore) yerleştirildi (Tablo 3.2).

Tablo 3.1. İki Turlu PCR için Kullanılan Primer Dizileri

1. Tur	5' - CAC CTG CAG CCT CAT TTT GTG GGT CAC CAT A - 3' (S)
	5' - CAT AAG CTT CAC AAT TCG TTG ACA TAC TTT CCA AT - 3' (A)
2. Tur	5' - TCG CTG GAT GTG TCT GCG GCG TTT TAT - 3' (S)
	5' - ACC CCA TCT TTT TGT TTT GTT AGG - 3' (A)

Tablo 3.2. Birinci Tur PCR Bileşenleri ve Reaksiyon Koşulları

Bileşenler		Koşullar
10X Tampon	5 µl	94°C' de 15 dakika 94°C' de 1 dakika 45°C' de 2 dakika 72°C' de 2 dakika 72°C' de 7 dakika 35 döngü
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl	
dNTP (2 mM)	5 µl	
Primer1 (25 pmol)	1 µl	
Primer2 (25 pmol)	1 µl	
Taq Polimeraz	0.5 µl	
ddH ₂ O	29.5 µl	
Kalıp DNA	5 µl	
Toplam hacim	50 µl	

İkinci tur PCR reaksiyonu için ise örnek başına, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, her bir primerden 25 pmol içerecek şekilde 1.5 ml'lik ependorf tüpünde PCR karışımı hazırlandı (Tablo 3.3). 5 µl 10x tampon, 0.5 µl Taq polimeraz ve 33.5 µl steril distile su eklendikten sonra vorteks cihazında hafifçe karıştırılıp 3000 rpm'de 10 saniye santrifüj yapıldı ve 0.2 ml'lik PCR tüplerine 49 µl olacak şekilde dağıtıldı. Daha sonra üstlerine ilk tur PCR ürününden 1 µl eklendi ve ısı döngü cihazında birinci tur ile aynı reaksiyon koşullarında amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. İkinci Tur PCR Bileşenleri ve Reaksiyon Koşulları

Bileşenler		Koşullar
10X Tampon	5 µl	94°C' de 15 dakika 94°C' de 1 dakika 45°C' de 2 dakika 72°C' de 2 dakika 72°C' de 7 dakika 35 döngü
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl	
dNTP (2 mM)	5 µl	
Primer1 (25 pmol)	1 µl	
Primer2 (25 pmol)	1 µl	
Taq Polimeraz	0.5 µl	
ddH ₂ O	33.5 µl	
1. Tur PCR ürünü	1 µl	
Toplam hacim	50 µl	

Agaroz Jel Elektroforezi

İki turlu PCR ile elde edilen ürünlerin görüntülenmesi için önce %2'lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için 2 gr agaroz 100 cc 1X TAE [50x TAE: 242 gr Tris baz + 57.1 ml asetik asit + 100 ml 0.5M EDTA (pH: 8) + 600 ml distile su → pH 7.8'e ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve 50 kat sulandırılarak kullanıldı] solüsyonu ile karıştırılıp mikrodalga fırında (Arçelik MD551, Türkiye) homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı ve tarakların yerleştirildiği jel tepsisine yavaşça döküldü. Katılaşıncaya kadar oda ısısında bekletildi; daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PCR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirildi. Daha önce PCR işlemi yapılan ve 4°C'de bekletilen örneklerden 5'er µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl yükleme tamponu (100 mg Orange G + 55 ml gliserol + 45 ml 1x TAE ile hazırlanmış stok solüsyondan) ile iyice karıştırıldı. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra örnekler elektroforez cihazında (Consort EV243, Belçika) 50 mA akım verilerek 45 dakika yürütüldü. Ardından jel %1 etidyum bromür (10 mg/ml olacak şekilde hazırlanan etidyum bromür solüsyonundan 200 µl alınıp, 2000 ml 1xTAE çözeltisi içine eklendi) içeren solüsyonda 15 dakika

boyandı ve Biospectrum (Cambridge, İngiltere) görüntüleme cihazında incelendi. Bant gözlenen örnekler ile çalışmaya devam edildi.

c) Saflaştırma Aşaması

Bant gözlenen amplifikasyon ürünleri, Invisorb Rapid PCR® kiti (Invitek, Almanya) ile saflaştırıldı. Bu amaçla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. PCR ürünü üzerine 130 µl *Buffer P* eklenerek tüp içeriği spin filtre tüpüne aktarıldı ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
2. 10.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
3. Kolonlar temiz alt tüplere aktarıldı. Üzerlerine 700 µl yıkama tamponu eklendi ve 10.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
4. Kolonlar temiz alt tüplere aktarıldı ve 3 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi.
5. Son olarak kolonlar steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konuldu ve üzerlerine ayrıştırma solüsyonundan 30 µl eklendi. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildikten sonra 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Saflaştırma ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

d) Dizi Analizi Reaksiyonu

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, ABD) ile 2. tur sens primeri kullanılarak dizi reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, her örnek için 8 µl hazır reaksiyon karışımı, 0.5 µl *nested* PCR 2. tur sens primeri ve 8.5 µl ddH₂O PCR tüplerinde karıştırıldıktan sonra üzerlerine 3'er µl 2. tur PCR ürünlerinden konuldu ve ısı döngü cihazına yerleştirildi. Isı döngü cihazında 96°C'de 10 saniye, 50°C'de 5 saniye ve 60°C'de 4 dakika 25 döngü olacak şekilde tutuldu. Dizileme sonrası ürünler, artıklardan temizlemek için sodyum asetat (NaAc)/etanol presipitasyon yöntemiyle saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Bu işlem aşağıdaki şekilde uygulandı:

1. Elimizdeki PCR ürünü üzerine 3 mM NaAc (pH: 4.6)'dan 2 µl eklendi.
2. Bunun üzerine 50 µl %95'lik etanol eklenerek karışım 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı ve hafifçe elle vurularak karıştırıldı. Saflaştırma işleminin hiçbir aşamasında vorteks kullanılmadı.
3. Buz üzerinde 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hiç bekletilmeden 13.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.
4. Üst sıvı çekildi ve üzerine 250 µl %70'lik ETOH eklendi ve yine elle hafifçe karıştırıldı.
5. 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı tamamen atıldı ve oda ısısında kurumaya bırakıldı.
6. Kuruyan örnekler üzerine 20 µl formamid eklenerek vortekslendi. 95°C'de 5 dakika denatüre edilip hemen buza alındı, 1-2 dakika bekletildikten sonra cihaza yüklemeye hazır hale getirildi.

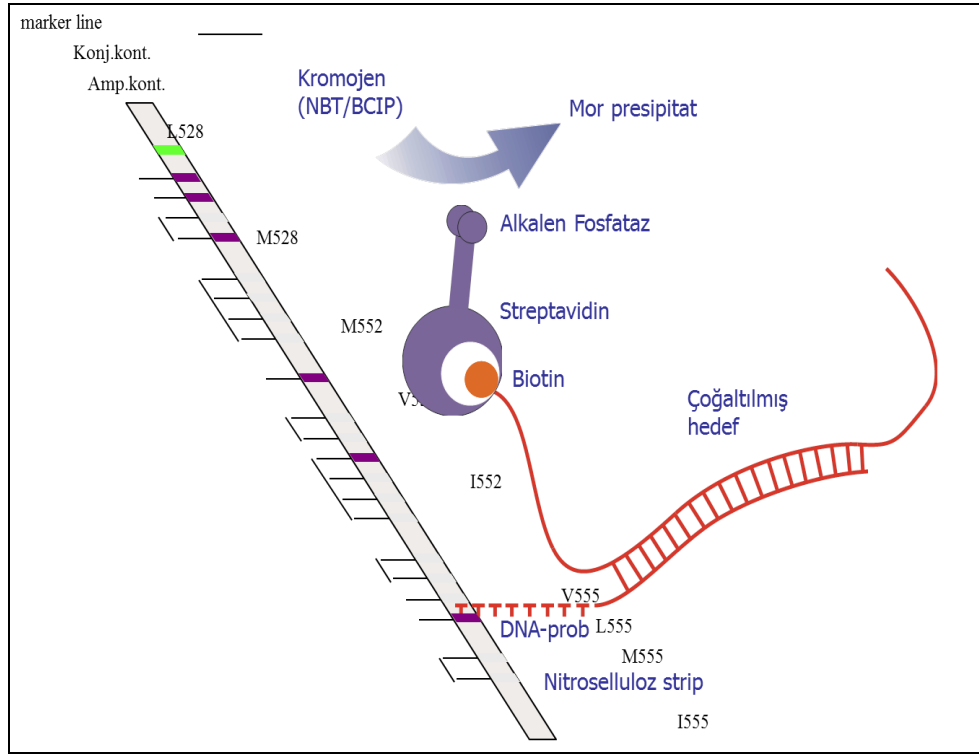
Saflaştırma işlemi sonrası dizileme reaksiyonu ürünleri ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, ABD) cihazında analiz edildi. HBV polimeraz geninin 470. nükleotid ile 720. nükleotidleri arasında yer alan 250 baz uzunluğundaki kısmı Bioedit yazılımı kullanılarak dizilendikten sonra referans dizi ile karşılaştırıldı ve dirençle ilişkili mutasyon varlığı araştırıldı.

3.3.2. Inno-Lipa HBV DR v2 İlaç Direnç Testi

3.3.2.1. Yöntemin Mekanizması

Line Prob hibridizasyon esasına dayanan Inno-Lipa (Innogenetics, Belçika), membrana bağlı sokak suşu dizileri ile bilinen ilaç dirençli mutantları ayırıcı oligonükleotid problemlere karşı özel hedeflerin hibridizasyonuna dayalı bir yöntemdir. Bir membran bandı üzerinde paralel olarak fikse edilmiş çok sayıda probdan oluşmaktadır. Bu yöntemde, biyotinlenmiş problemler kullanılarak bir PCR ürünü oluşturulur; çift iplikli PCR ürünü alkali ortamda denatüre edilir ve uygun hibridizasyon tamponu içerisinde banda eklenir. Hibridizasyon ve

kuvvetli yıkamanın ardından streptavidin konjugat ve substrat eklenerek prob hizasında açık mor ya da kahverengi rengin ortaya çıkması ile hibridler belirlenir (123, 136). Hibridizasyon paternleri kolorimetrik olarak gözle değerlendirilir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Line Prob Hibridizasyon Testinin Prensibi

3.3.2.2. Yöntemin Uygulanması

a) Amplifikasyon

Daha önce *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* kullanılarak elde edilen ve sonrasında saflaştırılan DNA örnekleri, biotinle işaretlenmiş primerler (bu primerler HBV *pol* geninin A-F kangalları arasında bulunan bölgeyi çoğaltmaktadır) kullanılarak amplifiye edildi. Amplifikasyon karışımı, her bir örnek için 2U HotStar Taq® polimeraz (Qiagen®), 5 µl 10X PCR tampon (Qiagen®), 0.2 mM dNTP, 0.5 Mm MgCl₂, 1 µl primer ve 22.2 µl steril distile suyun 1.5 ml'lik ependorf tüpünde karıştırılmasıyla hazırlandı. Bu karışım hafifçe vortekslendi ve 0.2 ml'lik PCR tüpleri numaralandırıldıktan sonra 30'ar

μl dağıtıldı. Tüplerin üzerine saflaştırılmış DNA örneklerinden 20 μl eklendi. Ayrıca 20 μl distile su içeren başka bir tüp, negatif kontrol olarak işaretlendi (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Inno-Lipa Testi PCR Bileşenleri

10X Tampon	5 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1 μl
dNTP (25 mM)	0.4 μl
Primer	1 μl
HotStarTaq DNA Polimeraz (5 U/ μl)	0.4 μl
ddH ₂ O	22.2 μl
Saflaştırılmış DNA	20 μl
Toplam hacim	50 μl

Tüpler amplifikasyon için ısı döngü cihazına yerleştirildi. 95°C'de 15 dakika ön denatürasyon işleminden sonra, 94°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye ve 72°C'de 40 saniye olacak şekilde 50 döngü uygulandı. Ardından DNA zincirinin uzaması için 72°C'de 10 dakika tutulduktan sonra, son olarak ısı 4°C'ye düşürülerek reaksiyon tamamlandı.

PCR reaksiyonu ile elde edilen ampikonların görüntülenmesi için ürünler %2'lik agaroz jelde yürütüldü. 867 baz çifti büyüklüğünde bant oluşturan ürünler hibridizasyon çalışmasına alındı.

b) Inno-Lipa HBV DRv2 Testinin Uygulanması

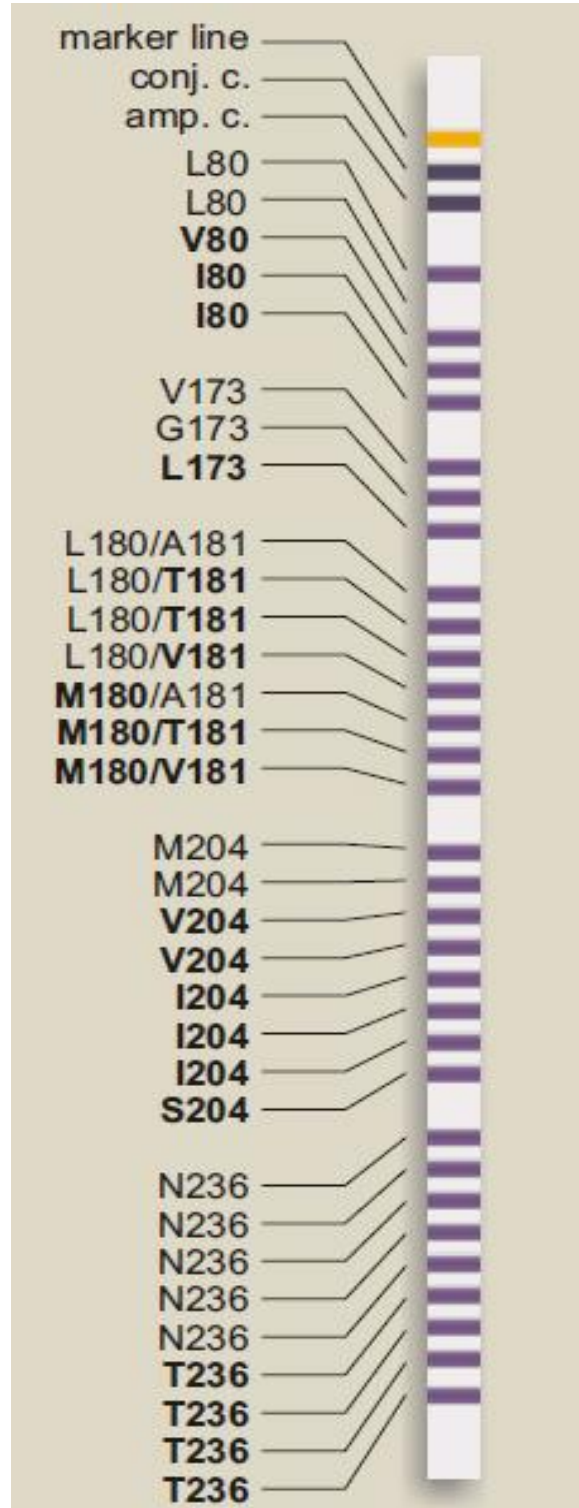
Testin tüm basamakları AutoBlot 3000 H (MedTEC, ABD) cihazında çalışıldı. Bunun için önce cihaz açıldı ve önceden hazırlanmış test protokolü seçildi. Hibridizasyon ve *Stringent Wash* solüsyonları yerlerine yerleştirildi ve çalışma öncesi 30 dakika ön ısıtma yapıldı. Ön ısıtma sırasında çalışma

solüsyonları hazırlandı (denatürasyon solüsyonu, hibridizasyon solüsyonu, *Stringent Wash* solüsyonu, konjugat 100x, konjugat dilüent, substrat solüsyonu 100x, substrat tamponu, *rinse* solüsyonu 5x) ve cihazın arkasında bulunan uygun pompalara yerleştirildi.

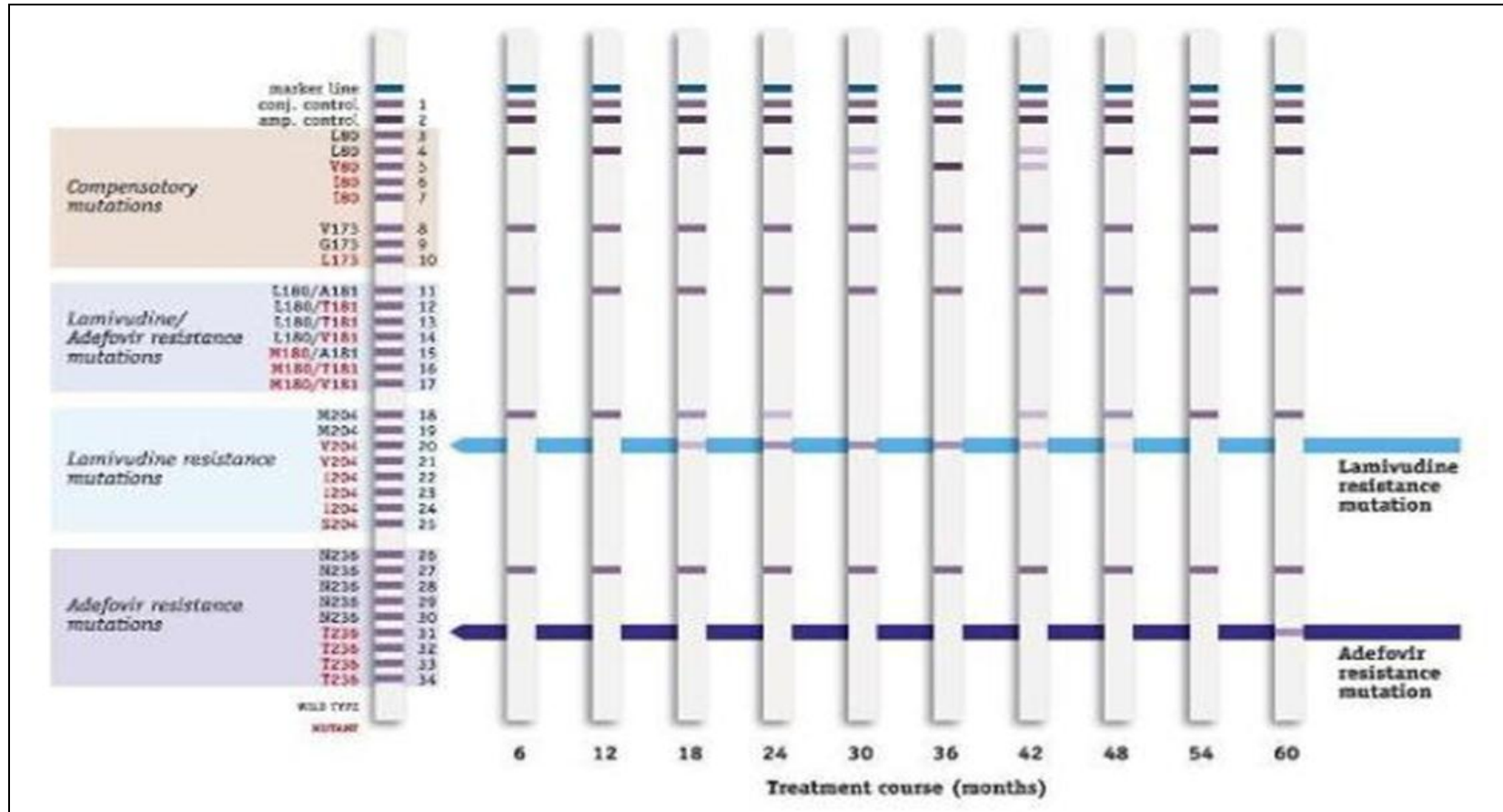
Ön ısıtma işleminden sonra özel tepsi (*tray*) içindeki bölmelere 10'ar µl denatürasyon solüsyonu dağıtıldı ve üzerlerine 10 µl PCR ürünlerinden konuldu. Ardından penset yardımı ile şeritler (*strip*) (Şekil 3.2) yerleştirildi ve 5 dakika oda ısısında bekletildi. Bu arada her pompa işlemi için başlatma (*prime*) işlemi yaptırıldı. Sisteme şerit sayısı girildikten sonra tepsi cihaza yüklendi ve reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon sonunda şeritler çıkarılıp temiz bir kağıt üzerine alındı. Üzerlerine örnek numaraları yazıldıktan sonra plastik okuma kartı (Şekil 3.3) kullanılarak açık mor ya da kahverengi bant oluşumları görsel olarak değerlendirildi.

c) Inno-Lipa HBV DRv2 Testinin Değerlendirilmesi

Test şeridi üzerinde, en üstte yer alan mavi gösterge çizgisi (*marker line*), şeridin doğru yerleştirildiğini göstermektedir (Şekil 3.2). Bunun altında 1'den 34'e kadar numaralandırılmış çizgiler bulunmaktadır. Birinci çizgi konjugat kontrol, 2. çizgi ise amplifikasyon kontrolü için kullanılmaktadır (Şekil 3.2). Konjugat kontrol çizgisi, test sırasında konjugat ve substrat solüsyonlarının çalışıp çalışmadığının kontrolünü sağlar. Bu çizgi çalışma sonunda daima pozitif olmalı ve aynı çalışma için her şerit üzerinde aynı yoğunlukta olmalıdır. İkinci pozitif çizgi olan amplifikasyon kontrol çizgisi, amplifiye ürünün hibridize olup olmadığını kontrol eder (Şekil 3.2). Eğer örnekte HBV DNA varsa ve örnek doğru işlenmişse amplifikasyon oluştuğunu gösterir ve sonra hedef ampikon bu kontrol çizgisinde hibridize olur. Üç numaradan 34'e kadar olan çizgiler ise prob çizgileridir (Şekil 3.2). Negatif kontrol için kullanılan şeritlerde, konjugat kontrol çizgisi dışında herhangi bir bant görülmemelidir. Bu çizgi, test sırasında oluşabilecek kontaminasyon olayının kontrol edilmesini sağlar.



Şekil 3.2. Inno-Lipa HBV DR v2 Test Şeridi (Innogenetics, Belçika)

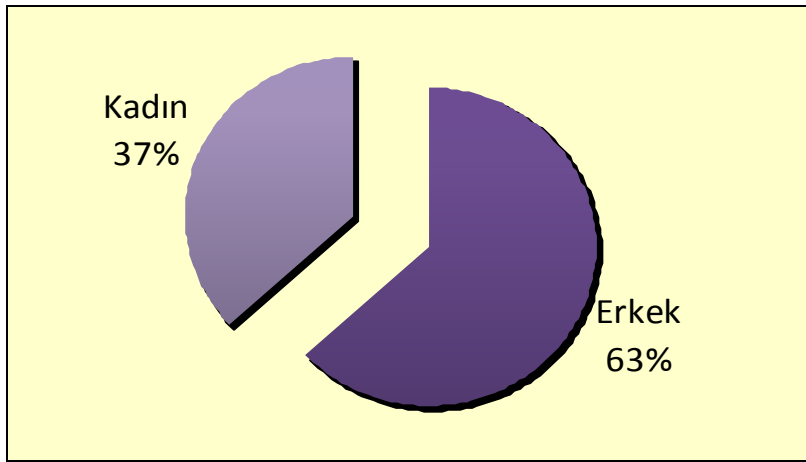


Şekil 3.3. Inno-Lipa HBV DR v2 Testi Okuma Kartı (Innogenetics, Belçika)

BULGULAR

4.1. Demografik Bulgular

Çalışmada, kronik hepatit B tanısı ile bir yıl ve daha uzun süre tedavi alan 38 hastada antiviral ilaca direnç oluşturan mutasyon varlığı, DNA dizi analizi ve INNO-LiPA HBV DR v2 testleri ile değerlendirilmiştir. Çalışmaya alınan hastaların 24'ü (%63) erkek, 14'ü (%37) kadın olup, yaşları 13-65 yıl arasında (yaş ortalaması 39.7 ± 2.51 yıl) değişmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Çalışmaya alınan hastaların cinsiyet dağılımı

4.2. Hastaların HBV Serolojik Göstergeleri, HBV DNA ve Karaciğer Enzim Düzeyleri ile İlgili Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 38 hastanın hepsinde HBsAg pozitif olup, bir hastada ek olarak anti-HBs pozitifliği (14.76 IU/ml) de saptanmıştır. Hastaların 10'unda (%26.3) HBeAg ve 27'sinde (%71) anti-HBe pozitifliği bulunurken, bir hastada HBeAg ve anti-HBe'nin her ikisi de negatif olarak belirlenmiştir. Anti-HBc total, hastaların 37'sinde (%97.4) pozitifken, bir hastada negatif bulunmuştur (Tablo 4.1).

Hastaların ortalama ALT düzeyleri 117.71 U/L (aralık: 12 - 835 U/L), ortalama HBV DNA düzeyleri ise 64431282.88 IU/ml (aralık: <12 - 579.000.000 IU/ml) olarak saptanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışmaya Alınan Hastaların Demografik Özellikleri ve Laboratuvar Bulguları*

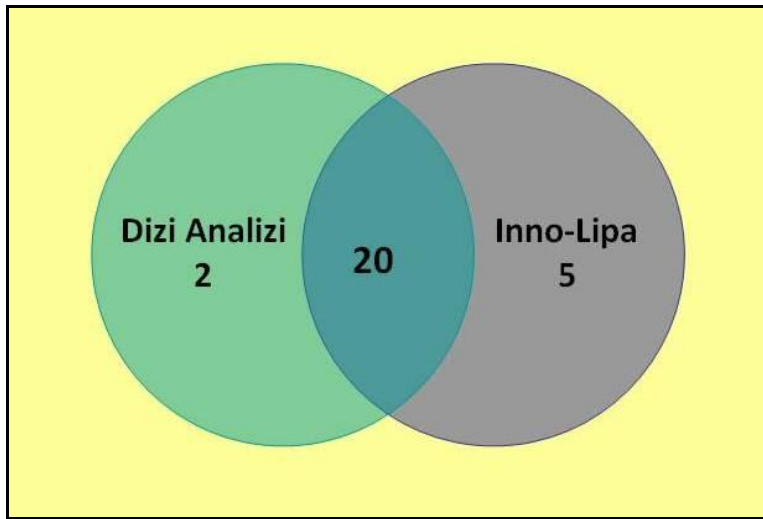
Sıra no	Cins/ Yaş	HBe Ag	Anti-HBe	Anti-HBc total	Anti-HBs	HBV DNA IU/ml	ALT Düzeyi (U/L)
1	E/45	N	P	P	N	399000000	815
2	E/62	N	P	P	P *	250	12
3	E/27	P	N	P	N	<12	45
4	K/32	P	N	P	N	279000000	25
5	K/13	N	P	P	N	246000	43
6	E/22	P	N	N	N	<12	17
7	E/51	N	P	P	N	22500	27
8	E/48	N	P	P	N	48000	113
9	E/45	N	N	P	N	<12	57
10	E/31	P	N	P	N	554000000	86
11	E/19	P	N	P	N	579000000	61
12	K/31	N	P	P	N	806	28
13	E/54	N	P	P	N	780	478
14	E/56	N	P	P	N	13.6	268
15	E/47	N	P	P	N	295	210
16	E/50	N	P	P	N	124000	76
17	K/58	N	P	P	N	172000	189
18	K/29	N	P	P	N	12	18
19	E/41	N	P	P	N	6380000	69
20	K/59	N	P	P	N	360000	65
21	K/44	N	P	P	N	1670	21
22	E/64	N	P	P	N	348	17
23	E/25	P	N	P	N	18.4	29
24	E/50	P	N	P	N	12600	56
25	K/33	P	N	P	N	1050000	835
26	E/65	N	P	P	N	151	103
27	E/65	N	P	P	N	8610	21
28	E/52	P	N	P	N	14000	48
29	K/59	N	P	P	N	25900	28
30	K/15	N	P	P	N	371000000	178
31	K/23	N	P	P	N	20	30
32	K/29	N	P	P	N	65800	14
33	K/29	N	P	P	N	674	22
34	E/30	N	P	P	N	128000	108
35	E/29	N	P	P	N	36.8	37
36	K/36	N	P	P	N	<12	15
37	E/21	P	N	P	N	811	25
38	E/20	N	P	P	N	322	184

*Tüm hastalarda HBsAg pozitifdir. 2 no'lu hastanın anti-HBs değeri 14.76 IU/ml'dir.

4.3. Antiviral İlaç Direncine Neden Olan Mutasyonların Saptanmasında Kullanılan Testlerin Bulguları

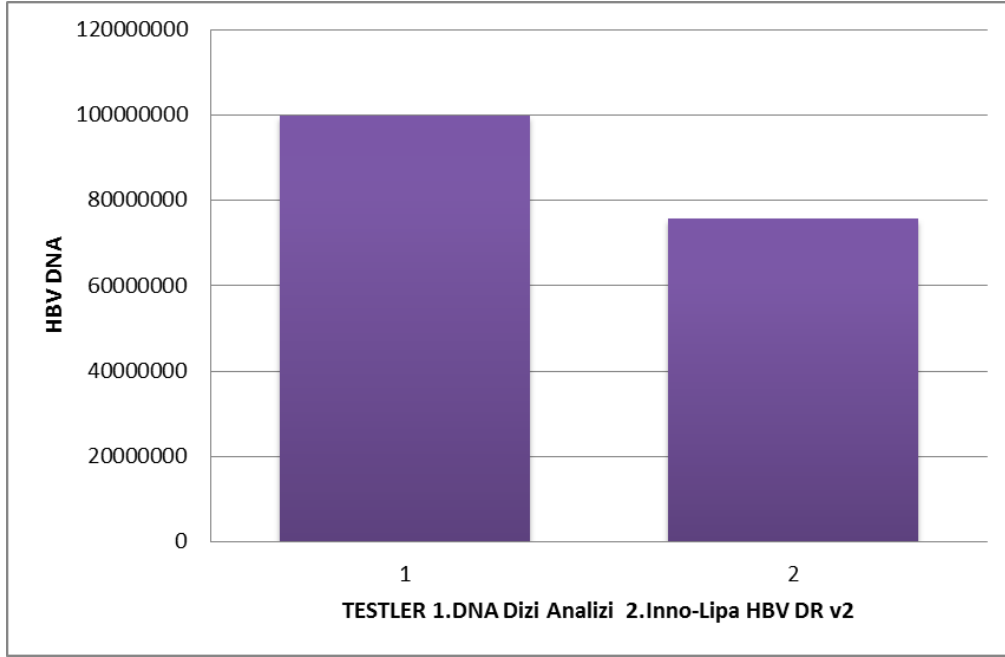
DNA dizi analizi çalışmasında, kit üreticisinin önerilerine uygun olarak HBV DNA düzeyi 1000 kopya/ml'nin altında olan 10 hasta örneği değerlendirme dışı bırakılırken, HBV DNA düzeyi 1000 kopya/ml'nin üzerinde olduğu halde sağlıklı kromatogram elde edilemeyen 6 hasta örneği (2, 15, 22, 33, 37, 38 no'lu örnekler) ise mutasyon analizine alınamamıştır. Bu nedenle 38 hasta örneğinin 22'si, antiviral ilaç direncine yol açan mutasyonları saptamak için dizi analizi ile değerlendirilebilmiştir (Şekil 4.2).

PCR sonrası 38 hasta örneğinden 25'inde 867 baz çifti (bç) büyüklüğünde bant oluşturan ürün saptanmış ve bu örnekler hibridizasyon ile değerlendirmek amacıyla Inno-Lipa HBV DR v2 testine alınmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Kullanılan yöntemlerde çalışmaya alınan hasta sayıları

DNA dizi analizi ile mutasyon araştırılan hasta örneklerinde ortalama HBV DNA düzeyi 99.575.484,82 IU/ml iken, Inno-Lipa HBV DR v2 testi ile çalışılan hasta örneklerindeki ortalama HBV DNA düzeyi 75.540.087,72 IU/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Mutasyon analizi yapılan hasta örneklerinin ortalama HBV DNA düzeyleri

4.3.1. HBV DNA Polimeraz Bölgesinin Dizi Analizi ile Elde Edilen Bulgular

Çalışmada, dizi analizi ile değerlendirilen 22 hasta örneğinin 7'sinde, antiviral ilaç direncine yol açtığı bilinen aminoasit değişiklikleri saptanmıştır. Aminoasit sembolleri ve nükleotid kodonları dikkate alınarak (Tablo 4.2) yapılan analiz sonunda aminoasit değişiklikleri belirlenmiştir.

Hasta örneklerinin 2'sinde adefovire dirençle ilişkilendirilen bir sekonder mutasyon, birinde adefovire direnç oluşturan bir primer mutasyon, birinde lamivudine direnç oluşturan bir primer mutasyon, 2'sinde lamivudine direnç oluşturan primer ve onarıcı mutasyonlar saptanırken, bir örnekte lamivudine direnç oluşturan primer ve onarıcı mutasyonlara ek olarak entekavire karşı dirence neden olan bir adet mutasyon tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

Tablo 4.2. Aminoasit Sembolleri ve Nükleotid Kodonları

Aminoasit	Üç Harfli Sembol	Tek Harfli Sembol	Kodon
Alanin	Ala	A	GCT, GCC, GCA, GCG
Arjinin	Arg	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Asparajin	Asn	N	AAT, AAC
Aspartik asit	Asp	D	GAT, GAC
Sistein	Cys	C	TGT, TGC
Glutamin	Gln	Q	CAA, CAG
Glutamik asit	Glu	E	GAA, GAG
Glisin	Gly	G	GGT, GGC, GGA, GGG
Histidin	His	H	CAT, CAC
İzolösin	Ile	I	ATT, ATC, ATA
Lösin	Leu	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Lizin	Lys	K	AAA, AAG
Metiyonin	Met	M	ATG
Fenilalanin	Phe	F	TTT, TTC
Prolin	Pro	P	CCT, CCC, CCA, CCG
Serin	Ser	S	AGT, AGC, TCT, TCC, TCA, TCG
Treonin	Thr	T	ACT, ACC, ACA, ACG
Triptofan	Trp	W	TGG
Tirozin	Tyr	Y	TAT, TAC
Valin	Val	V	GTT, GTC, GTA, GTG
<i>Stop</i>			TAA, TAG, TGA

162-187*	Ile	Ile	Leu	Gly	Phe	Arg	Lys	Ile	Pro	Met	Gly	Val	Gly	Leu	Ser	Pro	Phe	Leu	Leu	Ala	Gln	Phe	Thr	Ser	Ala	Ile
Referans ^b	ATC	ATC	CTG	GGC	TTT	CGG	AAA	ATT	CCT	ATG	GGA	GTG	GGC	CTC	AGC	CCG	TTT	CTC	CTG	GCT	CAG	TTT	ACT	AGT	GCC	ATT
Hst HBV7
Hst HBV8	A.
Hst HBV16
Hst HBV20	A.
Hst HBV25
Hst HBV27	A.
Hst HBV34
188-213*	Cys	Ser	Val	Val	Arg	Arg	Ala	Phe	Pro	His	Cys	Leu	Ala	Phe	Ser	Tyr	Met	Asp	Asp	Val	Val	Leu	Gly	Ala	Lys	Ser
Referans ^b	TGT	TCA	GTG	GTT	CGT	AGG	GCT	TTC	CCC	CAC	TGT	TTG	GCT	TTC	AGT	TAT	ATG	GAT	GAT	GTG	GTA	TTG	GGG	GCC	AAG	TCT
Hst HBV7
Hst HBV8	G.	...	G.
Hst HBV16
Hst HBV20
Hst HBV25
Hst HBV27
Hst HBV34
214-237*	Val	Gln	His	Leu	Glu	Ser	Leu	Phe	Thr	Ala	Val	Thr	Asn	Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Gly	Ile	His	Leu	Asn	Pro		
Referans ^b	GTA	CAG	CAT	CTT	GAG	TCC	CTT	TTT	ACC	GCT	GTT	ACC	AAT	TTT	CTT	TTG	TCT	TTG	GGT	ATA	CAT	TTA	AAC	CCT		
Hst HBV7	...	TC.		
Hst HBV8		
Hst HBV16	...	TC.		
Hst HBV20		
Hst HBV25		
Hst HBV27		
Hst HBV34		

Şekil 4.4. DNA dizi analizi ile hasta örneklerinde saptanan mutasyonlar (a. Aminoasit dizisi; b. Nükleotid dizisi. Referans dizi AY721609'dan alınmıştır. YMDD motifi 203, 204, 205 ve 206. aminoasitleri içermektedir)

Dizi analizi ile saptanan mutasyonlar ve neden oldukları etkiler Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

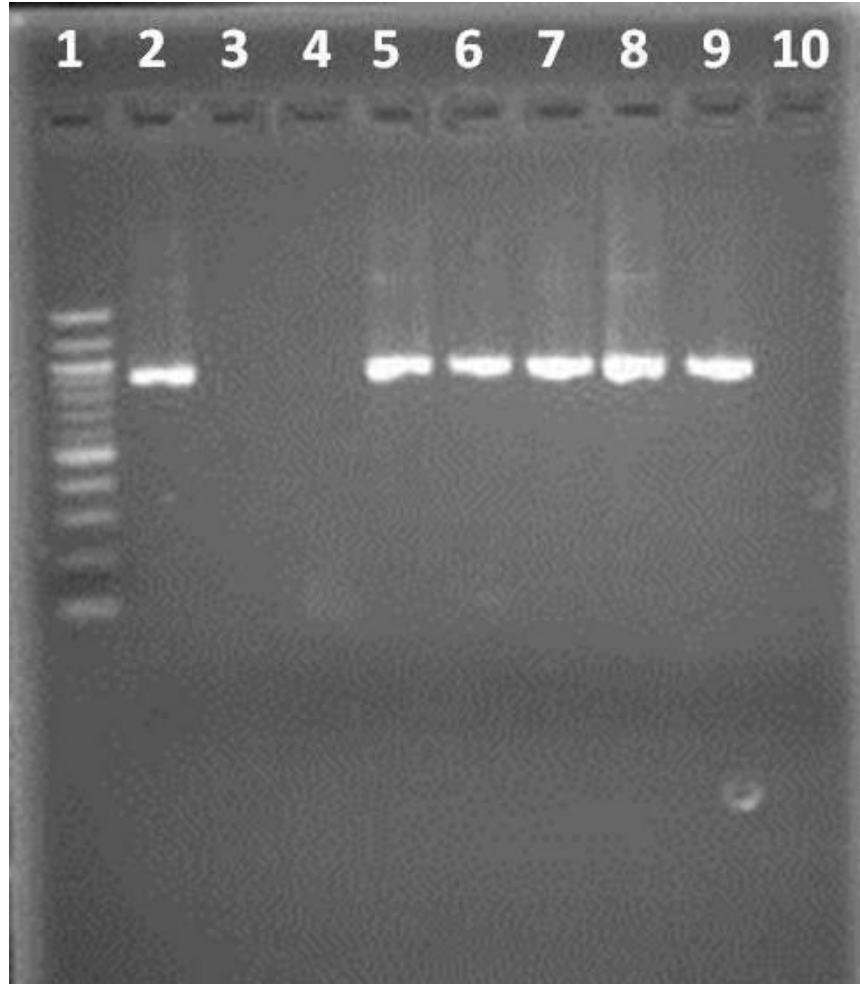
Tablo 4.3. DNA Dizi Analizi ile Saptanan Mutasyonlar ve Oluşturdukları Etkiler

Örnek No	Mutasyon	Etki
7	215 CAG/TCG (Q/S)	Adefovir direnci (sekonder)
8	180 CTG/ATG (L/M)	Onarıcı mutasyon
	204 ATG/GTG (M/V)	Primer lamivudin direnci
	202 AGT/GGT (S/G)	Entekavir direnci
16	215 CAG/TCG (Q/S)	Adefovir direnci (sekonder)
20	180 CTG/ATG (L/M)	Onarıcı mutasyon
	204 ATG/ATT (M/I)	Primer lamivudin direnci
25	236 AAC/ACC (N/T)	Adefovir direnci
27	180 CTG/ATG (L/M)	Onarıcı mutasyon
	204 ATG/ATT (M/I)	Primer lamivudin direnci
34	204 ATG/ATT (M/I)	Primer lamivudin direnci

4.3.2. Inno-Lipa HBV DR v2 Testi ile Elde Edilen Bulgular

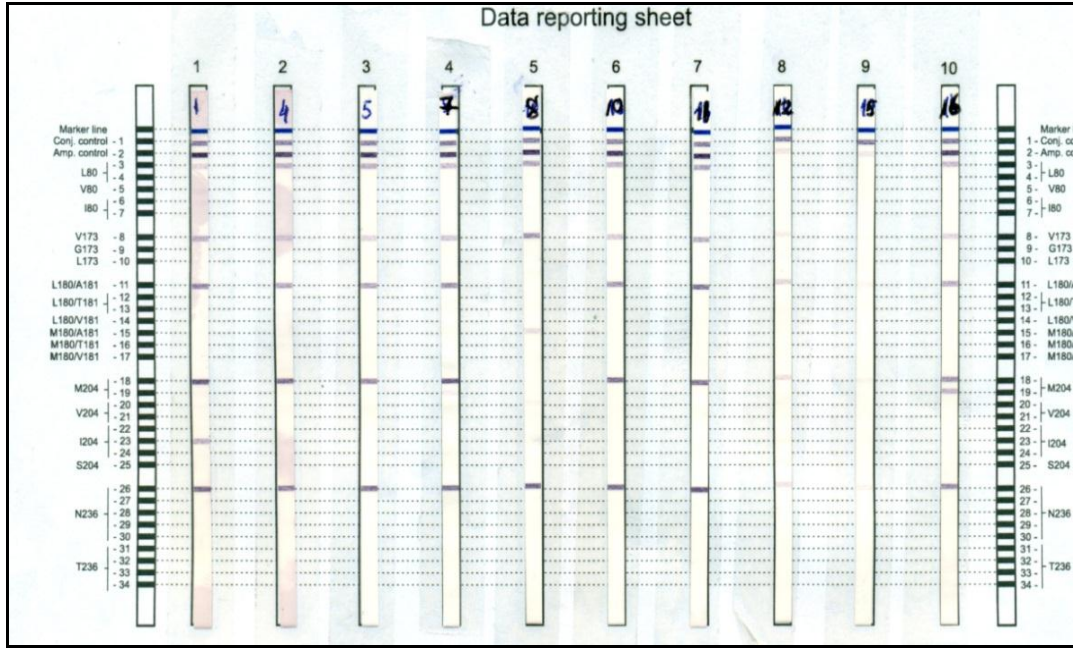
Inno-Lipa HBV DR v2 testi ile değerlendirmeye alınan 25 hasta örneği, PCR sonrası 867 bç büyüklüğünde bant oluşturan ürünlerin saptandığı örneklerdir (Şekil 4.5). Bu örneklerin 6'sında Inno-Lipa HBV DRv2 testi ile lamivudin için direnç oluşturduğu bilinen mutasyonlarla beraber onarıcı mutasyonlar saptanırken, bir hasta örneğinde lamivudin direnciyle

ilişkili bir primer mutasyon saptanmıştır. Hiçbir hasta örneğinde adefovir direncine neden olan mutasyon izlenmemiştir.

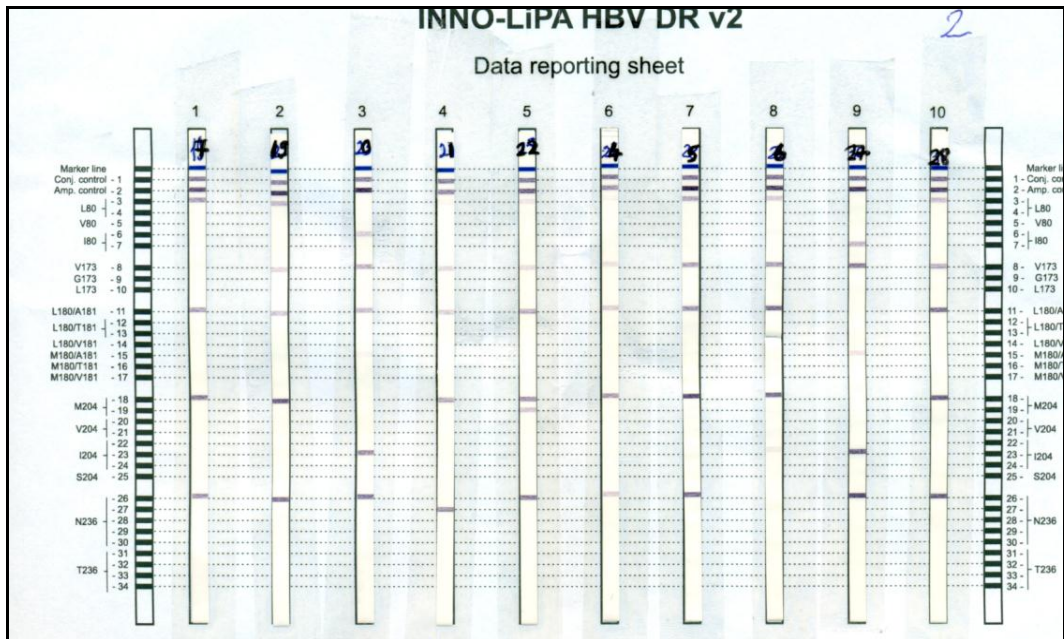


Şekil 4.5. Agaroz jel elektroforezi ile değerlendirmede 867 bp büyüklüğünde bant oluşturan örneklerden bazıları (Sıra 1: Moleküler belirteç, Sıra 2-9: Hasta örnekleri, Sıra 10: Negatif kontrol)

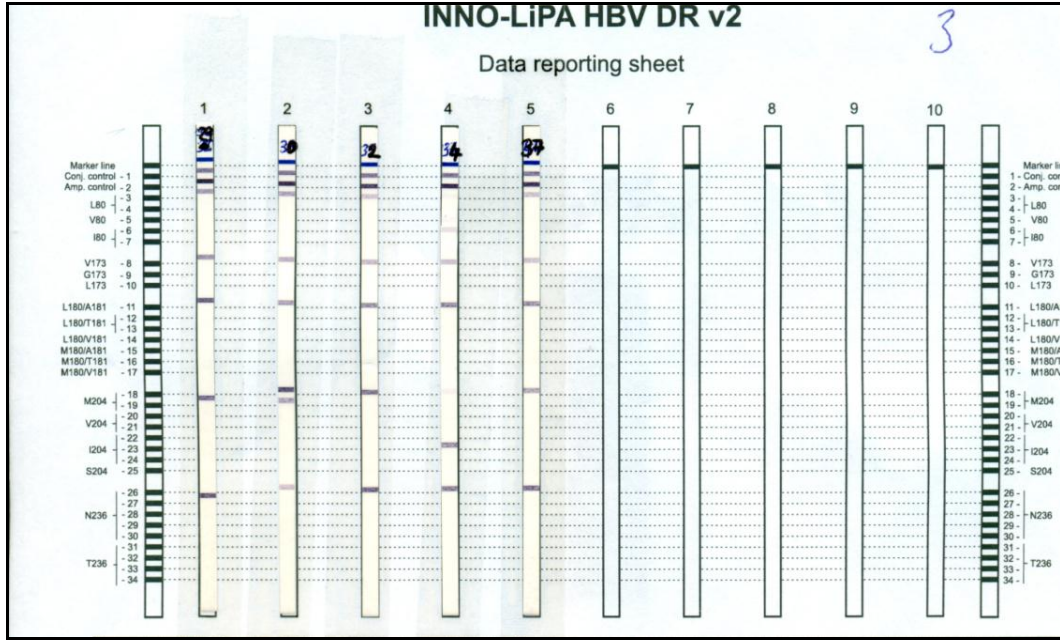
Inno-Lipa testi ile çalışılan örneklere ait şeritler, saklanmak amacıyla üretici firma tarafından temin edilen veri rapor kağıtlarına yapıştırılmış ve bunların görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6 (a). Inno-Lipa testi çalışma sonuçlarını gösteren 1 no'lu rapor kağıdı (1. ve 5. sırada bulunan şeritlerin ait olduğu sırasıyla 1 ve 8 no'lu hasta örneklerinde ilaç direnci ile ilişkili mutasyonlar saptanmıştır)



Şekil 4.6 (b). Inno-Lipa testi çalışma sonuçlarını gösteren 2 no'lu rapor kağıdı (3, 7, 8 ve 9. şeritlerin ait olduğu sırasıyla 20, 25, 26 ve 27 no'lu hasta örneklerinde ilaç direnci ile ilişkili mutasyonlar saptanmıştır)



Şekil 4.6 (c). Inno-Lipa testi çalışma sonuçlarını gösteren 3 no'lu rapor kağıdı (4. şeridin ait olduğu 34 no'lu hasta örneğinde ilaç direnci ile ilişkili mutasyonlar saptanmıştır).

Inno-Lipa testi ile mutasyon saptanan hasta örnekleri ve mutasyonların etkileri Tablo 4.4'de sunulmuştur.

Tablo 4.4. Inno-Lipa HBV DR v2 Testi ile Saptanan Mutasyonlar ve Etkileri

Örnek No	Saptanan Mutasyonlar	Etki
1	L80V, L80I	Onarıcı mutasyonlar
	M204I	Lamivudine direnç mutasyonu
8	L180M	Onarıcı mutasyon
	M204I	Lamivudine direnç mutasyonu
20	L80I, L180M	Onarıcı mutasyonlar
	M204I	Lamivudine direnç mutasyonu
25	M204V	Lamivudine direnç mutasyonu
26	L80I	Onarıcı mutasyon
	M204I	Lamivudine direnç mutasyonu
27	L80I, L180M	Onarıcı mutasyonlar
	M204I	Lamivudine direnç mutasyonu
34	L80V, L80I	Onarıcı mutasyonlar
	M204I	Lamivudine direnç mutasyonu

Çalışmamızda uygulanan her iki yöntem ile elde edilen bulgular ise karşılaştırmalı olarak Tablo 4.5’de görülmektedir.

Tablo 4.5. Dizi Analizi ve Inno-Lipa Testleri ile Saptanan Mutasyonların Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi

Örnek no.	Saptanan Mutasyonlar*	
	Dizi Analizi	Inno-Lipa
1	Negatif	L80V, L80I, M204I
7	Q215S	Negatif
8	L180M, M204V, S202G	L180M, M204I
16	Q215S	Negatif
20	L180M, M204I	L80I, L180M, M204I
25	N236T	M204V
26	Çalışılmadı	L80I, M204I
27	L180M, M204I	L80I, L180M, M204I
34	M204I	L80I, L80V, M204I

*Kırmızı renk ile belirtilen mutasyonlar lamivudin, mavi renk ile belirtilen mutasyonlar adefovir, yeşil renk ile belirtilen mutasyon entekavir direncini ifade etmektedir. Onarıcı mutasyonlar ise sarı renkle gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Viral enfeksiyonların tedavisinde antiviral ilaçların kullanımı, antibiyotiklerin çeşitlilik ve yaygınlığı ile karşılaştırıldığında oldukça sınırlıdır. Bunun en önemli nedeni, virusların yapısal özelliklerinin farklılığı ve replikasyon için hücreye bağımlı olmalarıdır. İyi bir antiviral ilacın, konak hücreye en az zarar ile mümkünse sadece virusa ait özgül bir fonksiyonu inhibe etmesi arzu edilmektedir (16). Bu amaç, gerek ökaryotik gerekse prokaryotik hücrelerde mevcut olmayan ve RNA'dan DNA sentezi yapan viral ters transkriptaz (*Reverse transcriptase*; RT) enziminin tanımlanması ile gerçekleşmiştir. Ters transkripsiyon fonksiyonuna sahip viral polimerazları hedef alan antiviral ajanların keşfi ve kullanıma girmesi, HIV ve kronik HBV enfeksiyonu olan hastaların tedavisinde bir devrim yaratmıştır. Ancak bu tedavilerin klinik yararı, polimeraz geninde özgün mutasyonlar taşıyan dirençli viral suşların ortaya çıkması ile tehlikeye düşmüştür (128).

Bir DNA virusu olmasına rağmen HBV replikasyonunun en olağandışı özelliği, viral DNA'nın pregenomik bir RNA molekülünden ters transkripsiyon ile sentezlenmesidir (18). Bu olayda yüksek hata oranına sahip RT enziminin görev alması nedeniyle, hepadnavirusların yıllık mutasyon hızlarının $10^4 - 10^5$ baz değişimi/bölge olduğu tahmin edilmektedir. Bu hız diğer DNA viruslarından 100 kat fazla, RNA viruslarından ise 100-1000 kat daha azdır (51). Genotipik farklılıklara göre mutasyon hızları da farklılıklar göstermektedir. Bazı mutasyonlar virusun çoğalması için sorun oluştururken, bazıları gerek virülans artışı gerekse antiviral ilaç direnci açısından virusa avantaj sağlayabilmektedir (58, 60).

Antiviral ilaçlara karşı direnç gelişiminde virusa ait farklı fonksiyonlar etkili olabilmektedir. Bunlar arasında; viral replikasyon hızı, viral mutasyon hızı, antivirallerin hedef bölgesindeki mutasyona yatkınlık, ilaçların seçici baskısı, replikasyon uyumu veya ilaca dirençli mutant suşların doğal tip (*wild type*) virusa göre sahip oldukları replikasyon kapasitesi ve replikasyon bölgesinin uygunluğu sayılabilir (60). Bunlardan örneğin, yüksek virus yüküne

(10^{11} - 10^{12}) sahip bireylerde günlük %50'ye varan döngü (*turnover*) oranı söz konusudur. Bu olgularda her ters transkripsiyon döngüsünde 10^4 - 10^5 mutasyon beklenmekte ve tek nokta mutasyonlarının yanında, 2-3 noktada mutasyonlar gelişebilmektedir (60). Sonuçta HBV ile enfekte bir hastanın hepatositlerinde, genomlarının değişik yerlerinde değişik mutasyonlara sahip HBV varyantları bir arada bulunmaktadır. Hepatositlerde bulunan bu viral genetik çeşitlilik "türümsü" (*quasispecies*) olarak adlandırılmaktadır. Dolayısıyla ilaca dirençli türümsülerin tedavi öncesi dönemde de bulunması kuvvetle muhtemeldir (60, 136).

Kronik hepatit B tedavisinde kullanılan antiviral ilaçların temel hedefi, aktif replikasyon basamağının yani uzayan zincirin sonlandırılmasıdır. Bu ajanların varlığında HBV replikasyonunun baskılanabilmesine karşın, enfekte hepatositlerin çekirdeğinde bulunan ve viral mRNA'ların transkripsiyonunda kalıp görevi gören cccDNA havuzunun temizlenmesi söz konusu değildir (21, 43). Dolayısıyla kronik hepatit B'li hastalarda, virus replikasyonunun sürekli olarak baskılanabilmesi için uzun süreli tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Uzun süreli tedavinin en büyük dezavantajı ise, viral polimerazın hata düzeltme aktivitesinin olmaması nedeniyle ilaca dirençli mutantların ortaya çıkması ve seçilebilmesidir. Bu nedenle HBV enfeksiyonlarının kontrolünde, tedavi rejiminin değişmesiyle birlikte viral havuzda seçilebilecek ve majör HBV varyantı konumuna geçebilecek olası direnç mutasyonlu minör HBV varyantlarının, tedavi öncesinde ve sürecinde saptanması büyük önem taşımaktadır (51, 137).

İlaca dirençli HBV suşlarının tanımlanması, serumda HBV DNA'yı tespit eden duyarlı moleküler yöntemlerin geliştirilmesi ile ivme kazanmıştır. Bu yöntemlerle, antiviral tedavinin etkisiyle vireminin çok düşük olduğu zamanlarda dahi HBV DNA düzeylerinde minör değişikliklerin ($<0.5 \log_{10}$) olabileceği gösterilmiştir (128). İlaç direnci, vireminin kalıcı olması ya da ilerleyen artışı olarak tanımlanmakta ve bu da tedavi sırasında serum HBV DNA düzeylerinde en az $1 \log_{10}$ artış olarak ifade edilmektedir. Tedaviye

uyumun doğrulanması şartıyla bu gibi durumlarda direnç testlerinin yapılması önerilmektedir (111, 128). Viral polimeraz inhibitörlerine karşı HBV direncinin gösterilmesinde, RT geninde direnç ile ilişkili mutasyonları saptayan genotiplendirme yöntemleri [Direkt DNA dizi analizi, klonal analiz, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), DNA hibridizasyonu, ilaç varlığında virusun replikasyon yeteneğinin inhibisyonunu değerlendiren fenotiplendirme yöntemleri ya da indirekt yöntemler (Kantitatif HBV DNA) kullanılmaktadır (3, 6, 88, 128).

Sunulan bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Ünitesi'nde kronik hepatit B tanısı ile takip edilen ve bir yıl ve daha uzun süredir lamivudin (LVD) tedavisi alan 38 hastada, ilaç direncinden sorumlu ana mutasyonların saptanması amacıyla, genotipik yöntemler olan DNA dizi analizi ve ters hibridizasyon temeline dayalı ticari bir *Line Prob* yöntemi (Inno-Lipa HBV DRv2) kullanılmıştır. HBV genom dizi analizi, yeni testlerin geliştirilme çalışmalarında altın standart olarak kabul edilmektedir (88, 110). Bu yöntem, hedeflenen viral gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonundan sonra, elde edilen gen dizilerinin analizi ile viral genotip, prekor/kor, bazal kor promotor ve polimeraz bölge mutasyonları hakkında bilgi edinilmesini sağlar (6). Inno-Lipa testi ise, hedef bölgenin PCR ile amplifikasyonundan sonra, ilgilenilen mutasyonlar için tasarlanmış özgül probolar kullanılarak, bu mutasyonların saptanmasına olanak vermektedir. Bu yöntemin birinci kuşak testleri, polimeraz geninin sadece B ve C kangallarındaki LVD' ye direnç mutasyonlarını saptarken, geliştirilen ikinci kuşak testleri (Inno-Lipa HBV DRv2; version 2), HBV polimerazın A kangalından F kangalına kadar olan bölgesinde bulunan LVD direnç mutasyonlarını ve ek olarak adefovire (ADV) direnç oluşturan özgün mutasyonları da saptayabilmektedir. Bu test L80V/I, V/G173L, L180M, A181T/V, M204V/I/S ve N236T kodonları için yeni ve klinikle ilişkili doğal tip ve mutant motifleri içermektedir (136).

Çalışmamızda uygulanan DNA dizi analizi yöntemi ile, viral polimeraz bölgesinin 470 ile 720. nükleotidleri arasında kalan 250 baz çiftlik bölgesi, antiviral ilaç direnci oluşturan mutasyonların saptanması amacıyla değerlendirilmiştir. Bu bölge, lamivudin, adefovir, entekavir ve tenofovir direnci ile ilişkilendirilen primer mutasyon bölgelerini içermektedir. Çalışmada, HBV DNA düzeyi 1000 kopya/ml ($IU/ml \times 5.82 = \sim 172 IU/ml$)'nin altında olan 10 hasta örneği değerlendirme dışı bırakılmış; HBV DNA düzeyi 1000 kopya/ml'nin üzerinde olan 28 hasta örneğinin ise altısında tekrarlayan uygulamalarda sağlıklı kromatogram elde edilemediğinden, mutasyon analizi sadece 22'si için yapılabilmektedir.

Çalışmada uyguladığımız diğer yöntem olan Inno-Lipa HBV DRv2 testi ile, HBV DNA düzeyi 1000 kopya/ml'nin altında olan 10 örnekten dokuzunda amplifikasyon sonrası jel elektroforez görüntüsünde 867 bp büyüklüğünde bant tespit edilmemiş, ancak HBV DNA düzeyi 151 IU/ml olan 26 numaralı örnekte özgül bant oluşumu izlenmiştir (Tablo 4.1). Bu örnek, mutasyon analizi için hibridizasyon çalışmasına alınmış ve çalışma sonunda antiviral direnç ile ilişkili iki mutasyon saptanmıştır (Tablo 4.4). HBV DNA düzeyi 1000 kopya/ml'nin üzerinde (ortalama $450 IU/ml = 2619$ kopya/ml) olduğu halde, DNA dizi analizi ile mutasyon analizi yapılamayan altı hasta (2, 15, 22, 33, 37, 38 no'lu örnekler) örneğinden üçünde (15, 22, 37 no'lu örnekler) Inno-Lipa testi ile değerlendirme yapılabilmektedir. HBV DNA düzeyi 780 IU/ml (4540 kopya/ml) olan 13 numaralı hasta örneğinin ise jel elektroforez incelemesinde bant görüntüsü elde edilmediğinden Inno-Lipa HBV DRv2 testi ile analizi yapılamamıştır. Bu durumda, çalışmaya alınan toplam 38 hastanın 22'si dizi analizi ile ve 25'i Inno-Lipa testi ile değerlendirilebilmiştir (Şekil 4.2). Inno-Lipa testi ile değerlendirilen hasta örneklerinin ortalama HBV DNA düzeyleri, dizi analizi ile değerlendirilen hasta örneklerinin ortalama HBV DNA düzeyleri ile karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur (Şekil 4.3). Nitekim Lupu ve arkadaşlarının LVD ve ADV'e dirençli suşların kantitasyonunun belirlenmesinde seçici RT-PCR (*selective Real-Time PCR*, sPCR) yöntemini

değerlendirdikleri bir çalışmada, viral yükün 10^4 kopya/ml'nin altında olduğu durumlarda Inno-Lipa HBV DRv2 testinin, dizi analizi ve sPCR yöntemlerine göre daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (138).

Çalışmamızda, dizi analizi ile değerlendirilen 22 hasta örneğinin yedisinde, antiviral ilaç direncine yol açtığı bilinen aminoasit değişiklikleri saptanmıştır. Aminoasit sembolleri ve nükleotid kodonları dikkate alınarak (Tablo 4.2) yapılan analiz sonunda aminoasit değişiklikleri belirlenmiştir. Hasta örneklerinin üçünde ADV' e direnç ile ilişkilendirilen mutasyon saptanmıştır. Bunlardan ikisi, 7 ve 16 numaralı örneklerde saptanan Q215S mutasyonudur (Tablo 4.3, Şekil 4.4). Ancak çalışmamızda kullanılan Inno-Lipa HBV DRv2 test şeridi, Q215S mutasyonunu kapsamadığından, 7 ve 16 numaralı örneklerde bu mutasyon gösterilememiş ve bu örneklerde başka mutasyonlar da saptanmamıştır (Tablo 4.5).

Q215S mutasyonu, 215. kodonda bulunan glutamin aminoasidinin yerini serin aminoasidinin alması ile oluşmaktadır (3). Yapılan çalışmalarda, ADV alan hastalarda önemli bir oranında gösterilmesine rağmen, bu mutasyonun klinikle ilişkisi henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır (139-141). Dolayısıyla Q215S mutasyonu, primer ilaç direncinden ziyade LVD ve ADV direnciyle ilişkili sekonder mutasyon olarak tanımlanmaktadır (138, 139). Amini-Bavil-Olyae ve arkadaşları, bu mutasyonun moleküler ve fonksiyonel etkilerini in vitro olarak değerlendirmişler ve sonuçta bu mutasyonun virusun replikasyon yeteneğini etkilemediğini ve LVD ve ADV' e olan duyarlılığı da değiştirmedini göstermişlerdir (141). Araştırmacılar ayrıca, Q215S mutasyonunun D genotipi ile enfekte hastalarda sıklıkla görüldüğünü ve hatta hiç tedavi almamış hastalarda da ortaya çıktığını belirtmişler, dolayısıyla klinikle ilişkili direnç mutasyonlarından ziyade arka planda bulunan polimorfizmleri temsil ettiğini ifade etmişlerdir (141). Ülkemizde Sayan ve arkadaşlarının tedavi alan ve hiç tedavi almamış kronik hepatit B'li hastalarda direnç mutasyonlarını araştırdıkları çalışmada; tedavi alan grupta ilaç direnci

mutasyonları %7.7 oranında bulunurken, tedavi almamış grupta bu oran %3.8 olarak saptanmıştır (140).

Adefovire direnç ile ilişkilendirilen bir diğer mutasyon, viral polimerazın 236. kodonunda bulunan asparajin aminoasidinin treonine dönüşmesi ile oluşmakta ve N236T olarak gösterilmektedir. Bizim çalışmamızda, 25 numaralı hasta örneğinde dizi analizi yöntemi ile bu mutasyonun varlığı saptanmış; ancak bu örnekte Inno-Lipa HBV DRv2 testi ile saptanan mutasyon, LVD direnci ile ilişkili primer mutasyon olan M204V olmuştur (Tablo 4.5).

Adefovir dipivoksil (ADV), kronik HBV enfeksiyonunun tedavisinde etkili bir antiviral ajandır. Uzun süren LVD tedavisi sırasında ortaya çıkan direnç oranının yüksek olması nedeniyle kronik hepatit B'li hastaların tedavisinde iyi bir seçenek olmuştur (60,79). Bununla birlikte ADV için de, tedavinin ilk yılında %1-2 olan direnç oranlarının, beşinci yılda %29'a kadar ulaşabildiği görülmüştür (142). ADV direncine neden olan primer mutasyonlar rtA181V/T ve rtN236T olarak tanımlanmıştır ve bunlar sırasıyla viral polimeraz geninin B ve D kangallarında yer almaktadır (123).

Osiowy ve arkadaşlarının ADV'e direnç mutasyonlarını saptamak için yaptıkları çalışmada, ADV ile tedavi edilen 38 kronik hepatit B hastasından 6 aylık aralar ile 124 örnek alınmış ve hem dizi analizi hem de Inno-Lipa HBV DRv2 testi ile değerlendirilmiştir (123). Araştırmacılar, altı hastada rtA181V/T ve rtN236T mutasyonlarını birlikte saptamış; üç hastada rtA181V/T ve üç hastada da rtN236T tekli mutasyonlarının varlığını göstermişlerdir. Bu çalışmada rtN236T mutasyonu saptanan toplam dokuz hastadan yedisinin daha önce LVD tedavisi aldığı belirlenmiş ve bu hastalarda ADV tedavisine başlamadan önce LVD'ye karşı gelişen direnç genotipik ve fenotipik olarak doğrulanmıştır (123). Inno-Lipa sonuçlarına göre araştırmacılar, rtN236T ve rtM204V/I/S mutasyonlarının LVD tedavisinin ADV ile değiştirilmesinden sonra birlikte ortaya çıktığını düşünmüşlerdir. Ayrıca, LVD'ye dirençli yedi hastadan alınan 16 örneğin 13'ünde Inno-Lipa ile rtN236T mutasyonunun da saptanmış

olması, ardışık olarak gelişen genotipik LVD ve ADV direnci ile ilgili daha önceki raporları desteklemektedir (143).

Adefovir tedavisi alan 38 hastanın dahil edildiği Osiowy ve arkadaşlarının çalışmasında, Inno-Lipa ile dizi analizi sonuçları arasındaki uyumun değerlendirilmesi sonucu, 236. kodon mutasyonunu saptamada her iki test arasında %90.5 oranında tam uyum tespit edilmiştir (123). Çalışmada, bir hastadan alınan tek zamanlı bir örnekte dizi analizi ile rtA181V ve rtN236T mutasyonları birlikte saptanırken Inno-Lipa ile mutasyon belirlenmemiş; altı aylık ardışık örnekleri olan -üç hasta hariç- diğer hastalarda ise her iki testin sonuçları tam olarak uyumlu bulunmuştur. Bu araştırmacılar, Inno-Lipa HBV DRv2 testinin ADV direnci ile ilişkili rtN236T mutasyonunu saptamada çok özgül ve duyarlı bir yöntem olduğunu belirtmişler ve ayrıca bu testin rtN236T mutasyonunu dizi analizine göre 6 ay önceden belirleyebildiğini vurgulamışlardır (123). Niesters ve arkadaşlarının çalışmasında da, Inno-Lipa HBV DRv2 testinin tanısal duyarlılık ve doğruluğu değerlendirilmiştir (136). Bu araştırmada tanısal duyarlılık, Lipa şeritleri üzerinde pozitif amplifikasyon bandının tespiti olarak tanımlanmış ve Inno-Lipa HBV DRv2 yönteminin tanısal duyarlılığı başlangıç testinden sonra %94.8, birinci tekrar testinden sonra ise %96.3 olarak bulunmuş; ikinci tekrar testinden sonra bu oran %100'e ulaşmıştır (136). Bizim çalışmamızda da viral yükü düşük (151 IU/ml = 879 kopya/ml) olan 26 numaralı örnekte Inno-Lipa testi ile pozitif bant elde edilebilmiş; ancak HBV DNA düzeyi 780 IU/ml olduğu halde amplifikasyon sonrası bant izlenmeyen 13 numaralı hasta örneğinin tekrar çalışılması mümkün olamamıştır.

Çalışmamızda dizi analizi ile 8, 20 ve 27 numaralı hasta örneklerinde LVD direnciyle ilişkili primer ve onarıcı mutasyonlar birarada tespit edilirken, 34 numaralı örnekte LVD direnciyle ilişkili bir adet primer mutasyon saptanmıştır (Tablo 4.3, Şekil 4.4). Bu mutasyonlar 8 numaralı hasta örneğinde L180M+M204V olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu örnekte, dizi analizi ile entekavir ilaç direnci ile ilişkili S202G (202. kodonda serin → glisin

değişimi) olarak ifade edilen bir başka mutasyon da gösterilmiştir. 20 ve 27 numaralı hasta örneklerinde ise L180M+M204I mutasyonlarının varlığı saptanmıştır.

Hepatit B virusu polimeraz enziminin C bölgesinde 203-206. kodonların yer aldığı YMDD (tirozin-metiyonin-aspartat-aspartat) motifinde metiyoninin valin, lösin ya da nadiren serin ile yer değiştirmesi sonucu oluşan ve rtM204V/I/S olarak ifade edilen mutasyonların (YVDD, YIDD, YSDD) LVD' ye karşı direnç gelişimine neden olduğu bilinmektedir (3, 60, 121, 135). Bunların dışında, LVD' ye dirençli HBV mutantlarının genotiplendirilmesi ile polimeraz proteininde çok sayıda başka aminoasit değişiklikleri de ortaya konulmuştur (126, 138, 142). Ancak bu mutasyonların çoğunun ilaç direncine önemli bir katkıda bulunmadığı, büyük olasılıkla dirençle ilişkili enzimatik eksiklikleri telafi etmeye yönelik işlev (*compensatory*) gördükleri ifade edilmektedir (3). Örneğin, bunlardan biri olan ve 180. kodonda lösin aminoasidinin metiyonin ya da sistein ile yer değiştirmesi (L180M/C) sonucu oluşan mutasyonun, tek başına LVD direnci oluşturmada yeterli olmadığı, ancak rtM204V/I/S ile birlikte bulunduğu hem replikasyonu hem de LVD direncini artırdığı gösterilmiştir (135). Bizim çalışmamızda L180M mutasyonu hiçbir örnekte tek başına saptanmamış; dizi analizi ile 8 numaralı hasta örneğinde L180M mutasyonu YVDD motifi ile birlikte bulunurken, 20 ve 27. örneklerde YIDD mutasyonu ile birarada tespit edilmiştir. 34 numaralı hasta örneğinde ise dizi analizi ile tek başına YIDD mutasyonunun varlığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, YVDD mutasyonuna hemen daima L180M mutasyonunun eşlik ettiği, YIDD tipi mutasyonların ise tek başına da görülebileceği bildirilmektedir (144). Inno-Lipa HBV DRv2 testi ile alınan sonuçlarımız değerlendirildiğinde; 1, 8, 20, 26, 27 ve 34 numaralı hasta örneklerinde LVD direnciyle ilişkili primer ve onarıcı mutasyonlar birarada bulunurken, 25 numaralı örnekte tek başına YVDD mutasyonu saptanmıştır (Tablo 4.4). Bu durum, YVDD mutasyonu için yukarıda bahsedilen bilgiyle çelişkili görünmektedir. Ancak ülkemizden bildirilen iki çalışmada da YVDD mutasyonu tek başına bulunmuş

ve bu mutasyonlara ilerde L180M mutasyonunun eşlik edebileceği belirtilmiştir (145,146).

Geniş gen dizileri içeren veri tabanlarının analizi ile rtL80V/I mutasyonunun LVD direnci ile ilişkili olduğu ve LVD' ye dirençli izolatların %85'inin rtL80I kodladığı tespit edilmiştir (61). Warner ve arkadaşları, rtL80I mutantının doğal virus tipi (*wild type*) ile karşılaştırıldığında, kendi başına daha az etkinlikte replike olduğunu ve LVD' ye aşırı duyarlı olmakla birlikte, LVD direncini etkilemeden rtM204V/I mutantlarının replikasyon yeteneğini artırdığını göstermişlerdir (61). Başka bir çalışmada da, rtL80V/I mutasyonlarının LVD' ye dirençli hastalarda ADV' in antiviral etkisini değiştirebileceği bildirilmiştir (147). Bizim çalışmamızda, DNA dizi analizi yönteminde 80. kodon bölgesi değerlendirme alanımız içinde bulunmadığından, bu bölgedeki mutasyonlar belirlenememiştir. Buna karşın Inno-Lipa HBV DRv2 ile yaptığımız değerlendirmede; 1 ve 34 numaralı örneklerde L80V/I mutasyonu YIDD mutasyonu ile birarada saptanmış, 26 numaralı örnekte YIDD mutasyonuna sadece L80I mutasyonu eşlik etmiştir (Tablo 4.4). 20 ve 27 numaralı örneklerde ise mutasyon paterni L80I+L180M+M204I olarak bulunmuştur. Dizi analizi ile L180M+M204V+S202G mutasyon paterni saptanan 8 numaralı hasta örneğinde L180M+M204I mutasyonları Inno-Lipa testi ile de belirlenmiş; ancak entekavir direnci ile ilişkili olan S202G mutasyonu, çalışmada kullandığımız ikinci kuşak Inno-Lipa testi içeriğinde yer almadığından gösterilememiştir (Tablo 4.5).

Yeni bir deoksiguanozin analogu olan entekavir (ECV), daha önce hiç tedavi almamış ya da LVD' ye dirençli kronik hepatit B hastalarının tedavisinde kullanılması önerilen bir antiviral ajandır (4,115). Yapılan in vitro ilaç duyarlılık ve klinik çalışmaların sonuçlarına göre, primer LVD direncinden sorumlu rtM204V/I mutasyonunun seçilmesi ile ECV'e karşı çapraz direnç gelişmektedir (3,60). Bu nedenle, ECV'in tedavi seçeneği olarak düşünüldüğü durumlarda, LVD' ye dirençli varyantların varlığı önem kazanmaktadır. Sayan

ve arkadaşları, LVD tedavisi almış ve LVD direnç mutasyonlarının (rtM204V/I+L180M) geliştiği ECV naif kronik hepatit B hastalarında ECV'e karşı direncin gelişebildiğini belirtmişlerdir (148). Çalışmamızda da LVD tedavisi alan 8 numaralı hasta örneğinde S202G mutasyonu, LVD direnci oluşturan rtM204V/I+L180M mutasyon profili ile birlikte saptanmıştır (Tablo 4.5).

Libbrecht ve arkadaşlarının 2007 yılında yayınlanan çalışmasında, 1-3 yıl süre ile LVD alan 80 kronik hepatit B hastasına ait 336 serum örneğinde LVD' ye direnç oluşturan mutasyonlar Inno-Lipa HBV DRv2 testi ile araştırılmış ve sonuçlar dizi analizi verileri ile karşılaştırılmıştır (149). Çalışmada, 336 örneğin 328'inde PCR ile amplifikasyon sonrası 867 baz çifti büyüklüğünde özgül bantlar gözlenmiş; HBV DNA düzeyi 1000 kopya/ml'nin altında olan 43 örneğin 37'sinin pozitif bant verdiği tespit edilmiştir. Bant oluşumu izlenmeyen sekiz örnekten altısında viral yükün 1000 kopya/ml'nin altında olduğu; bir örnekte 1430 kopya/ml olarak belirlenen HBV DNA düzeyinin bir diğer örnekte 2000 kopya/ml'den düşük olarak saptandığı izlenmiştir (149). Bu çalışmada dizi analizi yöntemi altın standart olarak kabul edilmiş ve buna göre sonuçlar "tam uyumlu", "kısmi uyumlu", "kısmi uyumsuz" ve "tamamen uyumsuz" olarak 4 grupta irdelenmiştir. Araştırmacılar, Inno-Lipa ve dizi analizi yöntemleri arasında %90.9 oranında tam uyumlu, %8.2 oranında kısmi uyumlu ve %0.2 oranında kısmi uyumsuz sonuçlar elde etmiş, tamamen uyumsuz sonuca ise rastlamamışlardır. Bu veriler ışığında Inno-Lipa HBV DRv2 testinin, lamivudine direnç oluşturan primer ve onarıcı mutasyonların yanında ADV direncine yol açan mutasyon gelişiminin de saptanmasında ve klinik açıdan önemli bilgilerin sağlanmasında kullanılabilecek duyarlı ve özgül bir test olduğu sonucuna varılmıştır (149). Libbrecht ve arkadaşlarının çalışmasında dikkat çekici olan diğer bulgu, ADV tedavisi almadığı halde altı hastada ADV direnç mutasyonlarının gösterilmiş olmasıdır (149). Dolayısıyla LVD monoterapisi uygulanan hastalarda dahi adefovire direnç oluşturan mutasyonların var olabileceği akılda tutulmalı ve

ileride LVD başarısızlığı nedeniyle tedavinin adefovire değiştirilmesi düşünüldüğünde bu durum göz önüne alınmalıdır.

HBV tedavisinin optimizasyonu için, HBV suşlarına replikasyon kapasitesi kazandıran mutasyonlar ortaya çıkmadan önce, en erken dönemde ilaç direncini tespit etmeyi sağlayan duyarlı yöntemlere gereksinim vardır (150). Genotipik direncin izlenmesi, fenotipik direncin gelişimini önceden tahmin etmek ve doğrulamak, sonuçta yeni tedavi seçeneklerini belirleyebilmek açısından büyük önem taşımaktadır. Genotipik direncin belirlenmesinde kullanılan DNA dizi analizinin en önemli avantajı, henüz direnç mutasyonunun bilinmediği yeni antiviral ilaç alan hastalarda herhangi bir yeni mutasyonu saptayabilmesidir (6). Bu yöntemin majör dezavantajı ise zaman alıcı olması ve yoğun emek gerektirmesidir. Ayrıca dizi analizi sırasında, fenotipe etkisi olmayan tek nükleotid polimorfizmlerinin prob bağlanmasını bozabileceği ve yanlış negatif sonuçlar oluşturabileceği belirtilmektedir (88). Bu yöntemin aynı zamanda, tüm HBV popülasyonunda %30'dan az oranda görülen minör türleri tespit etmede yetersiz kaldığı da vurgulanmaktadır (3). Inno-Lipa testi ise viral popülasyonda %5 kadar az oranda ortaya çıkan mutantları da tespit edebilen, özgüllüğü, duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği yüksek bir test olarak tanımlanmaktadır (136, 138). Ancak, sadece bilinen mutasyonları saptayabilmesi ve bu nedenle de her yeni antiviral ilaç direnci tanımlandığında güncelleştirilmeye gereksinim duyması, bu yöntemin en önemli dezavantajıdır (3). Çalışmamızda bu testin hibridizasyon, yıkama ve renk gelişim basamaklarının tümü tam otomatik olarak yapılmış, bu da önemli ölçüde çalışma kolaylığı sağlamıştır. Bunun dışında, sonuçların objektif olarak değerlendirilmesi ve doğru olarak yorumlanması için, bilgisayar destekli bir tarama programının eklenmesi ile test yönteminin standardize edilmesi, veri toplanmasına yardımcı olabilir ve kişisel hataya bağlı olarak gelişebilecek belirsiz ya da negatif sonuçları önleyebilir.

DNA dizi analizi ve Inno-Lipa HBV DRv2 yöntemleri ile HBV'nun antiviral ilaçlara karşı direnç geliştirmesine yol açan mutasyonların araştırıldığı bu çalışmada elde ettiğimiz veriler karşılaştırmalı olarak Tablo 4.5'te sunulmuştur. Buna göre; dizi analizi ile 7 ve 16 numaralı örneklerde saptanan Q215S ve 8 numaralı örnekte saptanan S202G mutasyonlarının Inno-Lipa testinin değerlendirme kapsamı içinde olmadığı göz önünde bulundurularak, mutasyon çeşitliliğinin saptanmasında Inno-Lipa testinin daha başarılı olduğu görülmektedir. Uyumsuz sonuçlar irdelendiğinde; 8 numaralı hasta örneğinde dizi analizi ile saptanan YVDD mutasyonuna karşılık Inno-Lipa ile YIDD mutasyonunun tespit edildiği izlenmektedir. Lok ve arkadaşlarının çalışmasında, bir hastada YIDD mutasyonunun YVDD'ye dönüşüm gösterdiği ve bu hastanın aynı zamanda L180M mutasyonu taşıdığı bildirilmiştir (150). Çalışmamızın bir diğer ilgi çekici bulgusu, HBV DNA düzeyinin çok düşük (<1000 kopya/ml) olduğu 26 numaralı örnekte Inno-Lipa testi ile pozitif sonucun elde edilmiş olmasıdır. Göze çarpan en uyumsuz sonuç ise, 25 numaralı örnekte dizi analizi ile ADV direncine neden olan bir mutasyon (N236T) gözlenirken, Inno-Lipa testi ile LVD direnci oluşturan primer mutasyonun (M204V) saptanmasıdır (Tablo 4.5).

Çalışmamızın sınırlamaları arasında, mutasyon analizlerinin her hastadan alınan tek bir serum örneğinde yapılabilmesi, sonuçların doğrulanması ve takibi için ardışık örneklerin alınamaması ve uyumsuz sonuçların tekrar test edilmemiş olması sayılabilir. Ayrıca diğer önemli bir sınırlama da, hastalar ile ilgili klinik bilgilere ve uygulanan antiviral tedavi protokollerinin ayrıntılarına ulaşamamış olmasıdır. Bu sınırlamaların nedenleri ise, dizi analizi ve özellikle de ticari Inno-Lipa testinde kullanılan kit ve sarf malzemelerinin teminindeki ekonomik sıkıntılar, hastaların poliklinik izlemleri sırasındaki sorunlar ve düzenli izlemin yapılamaması, poliklinik dışında özel olarak izlenen hastaların bilgi ve dosyalarına erişilememesi olarak sıralanabilir.

Sonuç olarak sunulan bu çalışmada, bir yıl ve/veya daha uzun süreli lamivudin tedavisi alan hastalarda, antiviral ilaç direnci oluşturan mutasyonların saptanmasında dizi analizi ve Inno-Lipa HBV DRv2 yöntemleri, bir hasta örneği dışında uyumlu sonuçlar vermiştir. Çalışmamızda ilaç direncine neden olan mutasyon profilleri, literatürdeki veriler ile benzerlik göstermiştir. Dizi analizi ile, bu çalışmada kullanılan ikinci kuşak Inno-Lipa testinin kapsamında olmayan, ancak güncellenmiş üçüncü kuşak teste eklenmiş olan bir mutasyon daha saptanabilmiştir. Buna karşın Inno-Lipa testinin uygulama ve değerlendirme basamakları, dizi analizine göre daha hızlı, kolay ve pratiktir. Çalışmamız, üniversitemizde bu konuda yapılan ilk çalışma olup, bundan sonraki araştırmalar için veri sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Weinbaum CM, Williams I, Mast EE, Wang SA, Finelli L, Wasley A, et al; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendations for identification and public health management of persons with chronic hepatitis B virus infection. *MMWR Recomm Rep* 2008; 57 (RR-8): 1-20.
2. Emekdaş G, Çavuşlu Ş, Öncül O, Artuk Ç, Aksoy A. Trends in hepatitis B and hepatitis C virus among blood donors over 16 years in Turkey. *Eur J Epidemiol* 2006; 21(4): 299-305.
3. Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S. HBV drug resistance: mechanisms, detection, and interpretation. *J Hepatol* 2006; 44(3): 593-606.
4. Shaw T, Locarnini S. Entecavir for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004; 2(6): 853-71.
5. Kuo A, Dienstag JL, Chung RT. Tenofovir disoproxil fumarate for the treatment of lamivudine resistant hepatitis B. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2(3): 266-72.
6. Yeon JE. Technique for the early detection of drug-resistant HBV DNA during antiviral therapy. *Intervirology* 2008; 51 (Suppl 1): 7-10.
7. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(2): 351-66.
8. Havens WP. Period of infectivity of patients with experimentally induced infectious hepatitis. *J Exp Med* 1946; 83(3): 251-8.
9. MacCallum FO, Bauer DJ. Homologous serum hepatitis *Lancet* 1947; ii: 691-2.
10. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965; 191: 541-6.

11. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1 (7649): 695-8.
12. Krugman S, Giles JP, Hammond J. Viral hepatitis type B MS-2 strain: studies on active immunization. *JAMA* 1971; 217(1): 41-5.
13. Magnus LO, Espmark JA. New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. *J Immunol* 1972; 109(5): 1017-21.
14. Vyas GN, Yen TSB. Hepatitis B virus - Biology, pathogenesis, epidemiology, clinical description, and diagnosis, p: 35. In: Specter S (ed), *Viral Hepatitis: Diagnosis, Therapy, and Prevention*. 1999, Humana Press, New Jersey.
15. Wasmuth JC. Hepatitis B - Epidemiology, transmission, and natural history, pp: 25-36. In: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H (eds), *Hepatology* 2009. Available from: www.HepatologyTextbook.com
16. Zarski JP, Ganem D, Wright TL. Hepatitis B virus, pp: 623-57. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (eds), *Clinical Virology*. 2002, 2nd ed. Washington DC, USA.
17. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 2007; 13(1): 14-21.
18. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Bio Rev* 2000; 64(1): 51-68.
19. Lüsebrink J, Schildgen V, Schildgen O. HBV - Virology, pp: 55-74. In: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H (eds), *Hepatology* 2009. Available from: www.HepatologyTextbook.com

20. Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E.coli*. *Nature* 1979; 281(5733): 646-50.
21. Seeger C, Zoulim F, Mason WS. Hepadnaviruses, pp: 2977-3029. In: Knipe DM, Howley PM (eds), *Fields Virology*. 2007, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
22. Crowther R, Kiselev N, Bottcher B, Berriman J, Borisova G, Ose V, Pumpens P. Three dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 1994; 77(6): 943-50.
23. Nassal M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol* 1992; 66(7): 4107-16.
24. Kimura T, Ohno N, Terada N, Rokuhara A, Matsumoto A, Yagi S, et al. Hepatitis B virus DNA negative Dane particles lack core protein but contain a 22-kDa precore protein without C terminal arginine-rich domain. *J Biol Chem* 2005; 280(23): 21713-9.
25. Ustaçelebi Ş, Ergünay K. Hepatit B virusunun moleküler virolojisi, s: 96-106. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (editörler), *Viral Hepatit 2007*. 2007, Viral Hepatit Savaşım Derneği, Ankara.
26. Robinson WS, Greenman R. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 1974; 13(6): 1231-6.
27. Nassal M. Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology* 1999; 42(2-3): 100-16.
28. Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 2004; 24 (Supp1): 3-10.

29. Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2003; 38(5): 1075-86.
30. Okamoto H, Imai M, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *J Virol* 1987; 61(10): 3030-4.
31. Kramvis A, Kew M, François G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 2005; 23(19): 2409-23.
32. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* 2007; 13(1): 65-73.
33. Paran N, Geiger B, Shaul Y. HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment. *EMBO J* 2001; 20(16): 4443-53.
34. Schulze A, Gripon P, Urban S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* 2007; 46(6): 1759-68.
35. Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol* 2008; 10(1): 122-33.
36. Taylor JM, Han Z. Purinergic receptor functionality is necessary for infection of human hepatocytes by hepatitis delta virus and hepatitis B virus. *PLoS One* 2010; 5(12): e15784.
37. Zhang X, Lin SM, Chen TY, Liu M, Ye F, Chen YR, et al. Asialoglycoprotein receptor interacts with the preS1 domain of hepatitis B virus in vivo and in vitro. *Arch Virol* 2011 Jan 5. [Epub ahead of print]
38. Neurath AR, Seto B, Strick N. Antibodies to synthetic peptides from the preS1 region of the hepatitis B virus (HBV) envelope (env) protein are virus-neutralizing and protective. *Vaccine* 1989; 7(3): 234-6.

39. Paran N, Cooper A, Shaul Y. Interaction of hepatitis B virus with cells. *Rev Med Virol* 2003; 13(3): 137-43.
40. Le Seyec J, 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(7): 5573-8.
41. Barrera A, Guerra B, Notvall L, Lanford RE. Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition. *J Virol* 2005; 79(15): 9786-98.
42. Cooper A, Paran N, Shaul Y. The earliest steps in hepatitis B virus infection. *Biochem Biophys Acta* 2003; 1614(1): 89-96.
43. Sohn JA, Litwin S, Seeger C. Mechanism for cccDNA synthesis in hepadnaviruses. *Plos One* 2008; 4(11): 1-6.
44. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2007; 13(1): 48-64
45. Chang HK, Ting LP. The surface gene promoter of the human hepatitis B virus displays a preference for differentiated hepatocytes. *Virology* 1989; 170(1): 176-83.
46. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 23-61.
47. Junker Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J* 1990; 9(10): 3389-96.
48. Liu N, Ji L, Maguire ML, Loeb DD. Cis-acting sequences that contribute to the synthesis of relaxed-circular DNA of human hepatitis B virus. *J Virol* 2004; 78(2): 642-9.
49. Huovila APJ, Eder AM, Fuller SD. Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* 1992; 118(6): 1305-20.

50. Chisari FV, Filippi P, Buras J, McLachlan A, Popper H, Pinkert CA, et al. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(19): 6909-13.
51. Jazayeri SM, Alavian SM, Carman WF. Hepatitis B virus: origin and evolution. *J Viral Hepat* 2010; 17(4): 229-35.
52. Tacke F, Gehrke C, Luedde T, Heim A, Manns MP, Trautwein C. Basal core promoter and precore mutations in the hepatitis B virus genome enhance replication efficacy of lamivudine resistant mutants. *J Virol* 2004; 78(16): 8524-35.
53. Liu Y, Zhong Y, Zou Z, Xu Z, Li B, Ren X, et al. Features and clinical implications of hepatitis B virus genotypes and mutations in basal core promoter/precore region in 507 Chinese patients with acute and chronic hepatitis B. *J Clin Virol* 2010; 47(3): 243-7.
54. Pawlotsky JM. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J Clin Virol* 2005; 34(Suppl 1): 125-9.
55. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, et al. Vaccine induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336(8711): 325-9.
56. Carman WF, Trautwein C, van Deursen FJ, Colman K, Dornan E, McIntyre G, et al. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1996; 24(3): 489-93.
57. Gunther S, Fischer L, Pult I, Sterneck M, Will H. Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv Virus Res* 1999; 52: 25-137.
58. Sheldon J, Rodes B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2006; 13(7): 427-34.

59. Fan W, Shi B, Wei H, Du G, Song S. Comparison of hepatitis B X gene mutation between patients with hepatocellular carcinoma and patients with chronic hepatitis B. *Virus Genes* 2010 Dec 16 [Epub ahead of print].
60. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009; 137(5): 1593-608.
61. Warner N, Locarnini S, Kuiper M, Bartholomeusz A, Ayres A, Yuen L, Shaw T. The L80I substitution in the reverse transcriptase domain of the hepatitis B virus polymerase is associated with lamivudine resistance and enhanced viral replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(7): 2285-92.
62. Baumert TF, Thimme R, von Weizsäcker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13(1): 82-90.
63. Foo NC, Ahn BY, Ma X, Hyun W, Yen TS. Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein. *Hepatology* 2002; 36(6): 1400-7.
64. Chirillo P, Pagano S, Natoli G, Puri PL, Burgio VL, Balsano C, Levrero M. The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(15): 8162-7.
65. Su F, Theodosis CN, Schneider RJ. Role of NF-kappaB and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol* 2001; 75(1): 215-25.
66. Kim KH, Seong BL. Pro-apoptotic function of HBV X protein is mediated by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing signal. *EMBO J* 2003; 22(9): 2104-16.
67. Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet* 2002; 2(1): 43-50.

68. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999; 284(5415): 825-9.
69. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; 77(1): 68-76.
70. Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol* 2005; 79(15): 9369-80.
71. Webster GJ, Reignat S, Maini MK, Whalley SA, Ogg GS, King A, et al. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 2000; 32(5): 1117-24.
72. Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest* 1997; 99(7): 1472-7.
73. Penna A, Artini M, Cavalli A, Levrero M, Bertoletti A, Pilli M, et al. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest* 1996; 98(5): 1185-94.
74. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 65-91.
75. Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, et al. The role of virus specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000; 191(8): 1269-80.
76. Rehmann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(3): 215-29.

77. Boni C, Penna A, Ogg GS, Bertolotti A, Pilli M, Cavallo C, et al. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. *Hepatology* 2001; 33(4): 963-71.
78. Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol (Paris)* 2010; 58(4): 258-66.
79. Liang TJ. Hepatitis B: The virus and disease. *Hepatology* 2009; 49 (Suppl 5): 13-21.
80. Calabrese LH, Zein NN, Vassilopoulos D. Hepatitis B virus (HBV) reactivation with immunosuppressive therapy in rheumatic diseases: assessment and preventive strategies. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(8): 983-9.
81. Chang MH. Hepatitis B virus infection. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 12(3): 160-7.
82. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50(2): 227-42.
83. Hoofnagle JH, Doo E, Liang TJ, Fleischer R, Lok AS. Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop. *Hepatology* 2007; 45(4): 1056-75.
84. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45(2): 507-39.
85. Martinot-Peignoux M, Boyer N, Colombat M, Akremi R, Pham BN, Ollivier S, et al. Serum hepatitis B virus DNA levels and liver histology in inactive HBsAg carriers. *J Hepatol* 2002; 36(4): 543-6.
86. Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34(4 Pt 1): 617-24.

87. Knoll A, Pietrzyk M, Loss M, Goetz WA, Jilg W. Solid organ transplantation in HBsAg-negative patients with antibodies to HBV core antigen: low risk of HBV reactivation. *Transplantation* 2005; 79(11): 1631-3.
88. Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(3): 426-39.
89. Chaudhuri V, Tayal R, Nayak B, Acharya SK, Panda SK. Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full length genom and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterology* 2004; 127(5): 1356-71.
90. Hollinger FB, Sood G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation. *J Viral Hepat* 2010; 17(1): 1-15.
91. Custer B, Sullivan SD, Hazlet TK, Iloeje U, Veenstra DL, Kowdley KV. Global epidemiology of hepatitis B virus. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38(10 Suppl 3): S158-68.
92. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004; 11(2): 97-107.
93. Özacar T. Hepatit B virusu, s: 1882-904. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (editörler), *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 2002, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
94. Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *Int J Med Sci* 2005; 2(1): 50-7.
95. Sentürker Güldas N, Abacioğlu YH. S-gene sequences and genotype-related restriction sites in hepatitis B virus carriers in Turkey. *Infection* 2004; 32(6): 344-9.
96. Sunbul M, Leblebicioglu H. Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. *World J Gastroenterol* 2005; 11(13): 1976-80.

97. Bozdayi G, Türkyilmaz AR, Idilman R, Karatayli E, Rota S, Yurdaydin C, Bozdayi AM. Complete genome sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus isolated from Turkish patients with chronic HBV infection. *J Med Virol* 2005; 76(4): 476-81.
98. Aksoy A, Ozdarendeli A. Genotyping of hepatitis B virus by restriction enzyme analysis. *Mikrobiyol Bul* 2006; 40(3): 215-23.
99. Kaya S, Cetin ES, Aridogan BC, Onal S, Demirci M. Distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes among HBV carriers in Isparta. *Iran Biomed J* 2007; 11(1): 59-63.
100. Sertoz RY, Erensoy S, Pas S, Ozacar T, Niesters H. Restriction fragment length polymorphism analysis and direct sequencing for determination of HBV genotypes in a Turkish population. *New Microbiol* 2008; 31(2): 189-94.
101. Sayiner AA, Ozcan A, Sengonul A. Naturally occurring MHR variants in Turkish patients infected with hepatitis B virus. *J Med Virol* 2008; 80(3): 405-10.
102. Külah C, Cirak MY. Determination of hepatitis B virus genotypes by DNA sequence analysis in patients from Ankara, Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44(2): 245-53.
103. Polizzotto MN, Wood EM, Ingham H, Keller AJ. Reducing the risk of transfusion-transmissible viral infection through blood donor selection: the Australian experience 2000 through 2006. *Transfusion* 2008; 48(1): 55-63.
104. Shang G, Seed CR, Wang F, Nie D, Farrugia A. Residual risk of transfusion-transmitted viral infections in Shenzhen, China, 2001 through 2004. *Transfusion* 2007; 47(3): 529-39.
105. Davis LG, Weber DJ, Lemon SM. Horizontal transmission of hepatitis B virus. *Lancet* 1989; 1(8643): 889-93.

106. Gunson RN, Shouval D, Roggendorf M, Zaaijer H, Nicholas H, Holzmann H, et al. Hepatitis B virus HBV and hepatitis C virus HCV infections in health care workers (HCWs): guidelines for prevention of transmission of HBV and HCV from HCW to patients. *J Clin Virol* 2003; 27(3): 213-30.
107. Dickson RC, Everhart JE, Lake JR, Wei Y, Seaberg EC, Wiesner RH, et al. Transmission of hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibody to hepatitis B core antigen. The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Gastroenterology* 1997; 113(5): 1668-74.
108. Krajden M, McNabb G, Petric M. The laboratory diagnosis of hepatitis B virus. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005; 16(2): 65-72.
109. Schildgen O. Acute and chronic hepatitis B - Diagnostic tests, pp: 113-8. In: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H (eds), *Hepatology* 2009. Available from: www.HepatologyTextbook.com
110. Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. *J Hepat* 2006; 44 (1 Suppl): S71-6.
111. Bowden S. Serological and molecular diagnosis. *Semin Liver Dis* 2006; 26(2): 97-103.
112. Ponde RA, Cardoso DD, Ferro MO. The underlying mechanisms for the 'anti-HBc alone' serological profile. *Arch Virol* 2010; 155(2): 149-58.
113. Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, et al. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: an Update. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(8): 936-62.
114. Fung SK, Lok AS. Hepatitis B virus genotypes: do they play a role in the outcome of HBV infection? *Hepatology* 2004; 40(4): 790-2.

115. Jafri SM, Lok AS. Antiviral therapy for chronic hepatitis B. *Clin Liver Dis* 2010; 14(3): 425-38.
116. Beşışık F. Kronik B hepatiti tedavisinde nükleozid analogları, s: 192-202. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (editörler), *Viral Hepatit 2007*. 2007, Viral Hepatit Savaşım Derneği, Ankara.
117. Takkenberg RB, Weegink CJ, Zaaijer HL, Reesink HW. New developments in antiviral therapy for chronic hepatitis B. *Vox Sanguinis* 2010; 98(4): 481-94.
118. Chang TT, Suh DJ. Current approaches for treating chronic hepatitis B: when to start, what to start with, and when to stop. *Hepatology* 2008; 47(Suppl 1): S19-27.
119. Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2007; 132(4): 1574-85.
120. Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, et al. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999; 341(17): 1256-63.
121. Enomoto M, Tamori A, Kohmoto MT, Morikawa H, Habu D, Sakaguchi H, et al. Mutational patterns of hepatitis B virus genome and clinical outcomes after emergence of drug-resistant variants during lamivudine therapy: analyses of the polymerase gene and full-length sequences. *J Med Virol* 2007; 79(11): 1664-70.
122. Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, et al. Long term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years. *Gastroenterology* 2006; 131(6): 1743-51.
123. Osioy C, Villeneuve JP, Heathcote EJ, Giles E, Borlang J. Detection of rtN236T and rtA181V/T mutations associated with resistance to

- adefovir dipivoksil in samples from patients with chronic hepatitis B virus infection by the INNO-LiPA HBV DR line Probe Assay (Version 2). *J Clin Microbiol* 2006; 44(6): 1994-7.
124. Heathcote EJ, Marcellin P, Buti M, Gane E, De Man RA, Krastev Z, et al. Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2011; 40(1): 132-43.
125. Gish RG, Lok AS, Chang TT, de Man RA, Gadano A, Sollano J, et al. Entecavir therapy for up to 96 weeks in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2007; 133(5): 1437-44.
126. Brunelle MN, Jacquard AC, Pichoud C, Durantel D, Carrouée-Durantel S, Villeneuve JP, et al. Susceptibility to antivirals of a human HBV strain with mutations conferring resistance to both lamivudine and adefovir. *Hepatology* 2005; 41(6): 1391-8.
127. Delaney WE 4th, Ray AS, Yang H, Qi X, Xiong S, Zhu Y, Miller MD. Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(7): 2471-7.
128. Durantel D, Brunelle MN, Gros E, Carrouee-Durantel S, Pichoud C, Villet S, et al. Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing. *J Clin Virol* 2005; 34(Suppl 1): S34-43.
129. World Health Organization. WHO/CDS/CSR/LYO/2002.2: Hepatitis B. Available from: http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_who.cdscsr.lyo2002_2.pdf
130. Mast EE, Weinbaum CM, Fiore AE, Alter MJ, Bell BP, Finelli L, et al. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the

- Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part II: Immunization of adults. *MMWR Recomm Rep* 2006; 55(RR-16): 1-33.
131. Michel ML, Tiollais P. Hepatitis B vaccines: protective efficacy and therapeutic potential. *Pathol Biol (Paris)* 2010; 58(4): 288-95.
 132. Brown TA. Studying gene location and structure, pp: 197-216. In: *Gene cloning and DNA analysis*. 2002, 4th ed. Blackwell Science, Manchester.
 133. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74(12): 5463-7.
 134. Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, et al. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 1987; 238(4825): 336-41.
 135. Bozdayi AM, Uzunalimoğlu O, Türkyılmaz AR, Aslan N, Sezgin O, Sahin T, et al. YSDD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J Viral Hepat* 2003; 10(4): 256-65.
 136. Niesters HG, Zoulim F, Pichoud C, Buti M, Shapiro F, D'Heuvaert N, et al. Validation of the INNO-LiPA HBV DR Assay (version 2) in monitoring hepatitis B virus-infected patients receiving nucleoside analog treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 1283-9.
 137. Zhu Y, Curtis M, Snow-Lampart A, Yang H, Delaney W, Miller MD, Borroto-Esoda K. In vitro drug susceptibility analysis of hepatitis B virus clinical quasispecies populations. *J Clin Microbiol* 2007; 45(10): 3335-41.
 138. Lupo J, Larrat S, Hilleret MN, Germi R, Boyer V, Nicod S, et al. Assessment of selective real-time PCR for quantitation of lamivudine and adefovir hepatitis B virus-resistant strains and comparison with direct sequencing and line probe assays. *J Virol Methods* 2009; 156(1-2): 52-8.

139. Gallego A, Sheldon J, Garcia-Samaniego J, Margall N, Romero M, Hornillos P, et al. Evaluation of initial virological response to adefovir and development of adefovir-resistant mutations in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2008; 15(5): 392-8.
140. Sayan M, Sentürk O, Akhan SÇ, Hülagü S, Cekmen MB. Monitoring of hepatitis B virus surface antigen escape mutations and concomitantly nucleos(t)ide analog resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis* 2010; 14(Suppl 3): e136-41.
141. Amini-Bavil-Olyae S, Herbers U, Mohebbi SR, Sabahi F, Zali MR, Luedde T, et al. Prevalence, viral replication efficiency and antiviral drug susceptibility of rtQ215 polymerase mutations within the hepatitis B virus genome. *J Hepatol* 2009; 51(4): 647-54.
142. Chen CE, Lee CM, Tung WC, Wang JH, Hung CH, Hu TH, et al. Evolution of full-length HBV sequences in chronic hepatitis B patients with sequential lamivudine and adefovir dipivoxil resistance. *J Hepatol* 2010; 52(4): 478-85.
143. Villeneuve JP, Durantel D, Durantel S, Westland C, Xiong S, Brosgart CL, et al. Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient. *J Hepatol* 2003; 39(6): 1085-9.
144. Eyigün CP. Hepatit B virusu mutasyonlarının klinik önemi ve tedaviye etkileri, s: 131-44. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (editörler), *Viral Hepatit 2007*. 2007, Viral Hepatit Savaşım Derneği, Ankara.
145. Arslan U, Ural O, Fındık D. Lamivudin tedavisi alan kronik hepatit B olgularında Inno-Lipa HBV DR yöntemi ile saptanan YMDD motif değişiklikleri. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(3): 445-50.
146. Akarsu M, Şengönül A, Tankurt E, Sayiner AA, Topalak O, Akpınar H, Abacıoğlu YH. YMDD motif variants in inactive hepatitis B carriers detected by Inno-Lipa HBV DR assay. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(12): 1783-8.

147. Lee YS, Chung YH, Kim JA, Kim SE, Shin JW, Kim KM, et al. Hepatitis B virus with the rtL80V/I mutation is associated with a poor response to adefovir dipivoxil therapy. *Liver Int* 2009; 29(4): 552-6.
148. Sayan M, Hülagü S, Akhan SÇ, Şentürk Ö, Meriç M, Çekmen M. Lamivudin tedavisi uygulanmış ve entekavir naif kronik hepatit B' li hastalarda entekavir ilaç direnci. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(3): 425-32.
149. Libbrecht E, Doutrelouigne J, Van De Velde H, Yuen MF, Lai CL, Shapiro F, Sablon E. Evolution of primary and compensatory lamivudine resistance mutations in chronic hepatitis B virus-infected patients during long-term lamivudine treatment, assessed by a line probe assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45(12): 3935-41.
150. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Mangia A, Niro G, Decraemer H, et al. Monitoring drug resistance in chronic hepatitis B virus (HBV)-infected patients during lamivudine therapy: evaluation of performance of INNO-LiPA HBV DR assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40(10): 3729-34.