

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

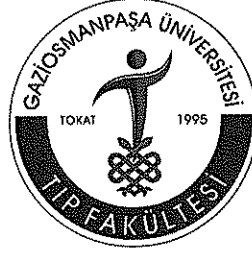
**KRONİK HEPATİT B HASTALARINDA MDR GEN
POLİMORFİZMİNİN KLİNİK SEYRE ETKİSİ**

Dr. Hakan ŞİVGİN

UZMANLIK TEZİ

TOKAT

2013



T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**KRONİK HEPATİT B HASTALARINDA MDR GEN
POLİMORFİZMİNİN KLİNİK SEYRE ETKİSİ**

Dr. Hakan ŞIVGIN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Abdulkerim YILMAZ

TOKAT

2013

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile yetişmemde emeği geçen, kendileri ile çalışmaktan onur duyduğum başta tez danışmanım ve İç Hastalıkları AD Başkanımız Doç. Dr. Abdülkerim YILMAZ, değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Faruk KUTLUTÜRK, Yrd. Doç. Dr. Türker TAŞLIYURT, Doç. Dr. Berna YELKEN, Yrd. Doç. Dr. Pelin AYTAN'a, tez hazırlığım süresince yardımlarını ve fedakârlıklarını esirgemeyen Doç. Dr. Banu ÖZTÜRK'e ve Yrd. Doç. Dr. Şafak ŞAHİN'e, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD hocalarımızdan Yrd. Doç. Dr. Aydın RÜSTEMOĞLU'na sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Rotasyon eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Enfeksiyon Hastalıkları AD, Kardiyoloji AD ve Göğüs Hastalıkları AD'da sayın hocalarım Doç. Dr. Serhat ÇELİKEL, Doç. Dr. Handan İNÖNÜ, Doç. Dr. Şener BARUT, Yrd. Doç. Dr. Dursun Ali SAĞLAM, Yrd. Doç. Dr. Fazilet DUYGU, Yrd. Doç. Dr. Sibel DORUK, Yrd. Doç. Dr. Özgür Günal ve asistan arkadaşlara teşekkür ederim.

Başta İç hastalıkları sorumlu hemşiresi Alev ÖZER olmak üzere tüm hemşire ve personel arkadaşlara teşekkür ederim.

İç hastalıkları kliniğinde birlikte çalışmaktan ve yorulmaktan çok keyif aldığım asistan arkadaşlarım Dr. Mustafa BARUT, Dr. Nilgün SAVAŞ, Dr. Hasan GÜVEN, Dr. Harun AYSAL, Dr. İbrahim TAŞTAN, Dr. Ahmet DEMİRTAŞ, Dr. Tuğba ARSLAN'a ve onlarla tanıştığım için kendimi şanslı saydığım kıdemli asistan arkadaşlarım Dr. Süleyman YÜCE, Dr. İsmail Cem YILDIR, Dr. Fatma SAKINCI, Dr. Süheyla KAYA, Dr. Binnur ŞENGEZER'e, zor günlerimde bana zaman ayıran ve hayatımın her anında yardımına koşan kendisinden çok şey öğrendiğim Dr. Emrah BAŞTUĞ'a, kendisi ile geçirdiğim her andan keyif aldığım, Dr. Abdülkadir Geylani ŞAHAN'a, tezin her anında yardımını esirgemeyen Dr. Yeliz BİLİR'e, asistanlığımın ilk gününden itibaren omuz omuza verdiğim kader arkadaşım can dostum Dr. Mustafa SAĞCAN'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Beni her zaman destekleyen eşimin ailesine ve bugünlere gelmemde en büyük payı olan ve hiçbir fedakârlığı esirmeyen canım annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu süreçte hiçbir zaman yanımdan ayrılmayan, desteğiyle daima yanı başımda olduğunu bildiğim canım eşim Sevditem'e sonsuz teşekkür ederim.

Hakan ŞIVGIN

ÖZET

Kronik Hepatit B enfeksiyonu; karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinom riski nedeniyle morbidite ve mortalitesi yüksek bir hastalıktır. Hastalığın tedavisi ve tedaviye direnç gelişimi güncel araştırma konularıdır. İlaç direncini açıklayan birçok hücrenel mekanizma vardır. Multidrug Rezistans Gen (MDR) ürünü olan P-glikoprotein (P-gp)'nin artmış salınımı, MDR fenotipini oluşturan mekanizmalar içinde en iyi araştırılmış olanıdır. MDR geni C1236T polimorfizmi azalmış P-gp fonksiyonu ile ilişkilidir. MDR gen mutasyonu, hepatit B'li hastalarda tedaviye yanıt oranları ve hastalığın klinik seyrini etkileyebilir. Çalışmamızda lamivudin kullanan Kronik Hepatit B hastalarında MDR gen polimorfizminin tedaviye yanıt ve klinik seyri üzerindeki etkilerini araştırmak amaçlandı.

Çalışmaya kronik hepatit B tanısı almış 90 (E/K:69/21) hasta alındı. Yaş ortalamaları 49.8 ± 12.6 (aralık:22-75) yılıdır. Hastalar lamivudin tedavisi sırasında 24. haftada HBV-DNA negatifleşen tedaviye yanıtı (Grup 1) ve 24. hafta ve sonrasında HBV-DNA pozitif olan tedavi dirençli (Grup 2) hastalar olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Grup 1, 51 (E/K:38/13) ve grup 2, 39 (E/K:31/8) hastadan oluşuyordu. İki grubun yaş ortalamaları ve cinsiyet dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Grup 2'deki hastaların histolojik aktivite indeksleri (HAI), total bilirübin, AST ve ALT düzeyleri, HBV-DNA titreleri Grup 1'den anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.05$). Tedaviye dirençli hastaların bir kısmında (n:19) YMDD mutasyonu bakıldı. YMDD mutasyonu tedaviye dirençli 11 hastada saptandı. Hasta grupları, MDR-1 geninde C1236T allel sıklığı ve CC, CT, TT genotip dağılımı açısından karşılaştırıldı.

Genotip dağılımları; Grup 1'de 8 (%15.7) hastada CC, 37 (%72.5) hastada CT, 6 (%11.8) hastada TT, grup 2'de 13 (%33.3) hastada CC, 21 (%53.8) hastada CT, 5 (%12.8) hastada TT gen mutasyonları saptandı. Gruplar arasında MDR-1 gen polimorfizminde genotipik dağılım açısından anlamlı fark bulundu ($p = 0.044$). Tedaviye dirençli olan grupta, yanıtı gruba kıyasla daha fazla oranda CC genotipi saptanmıştır. Grup 1 ve 2'de C ve T allel sıklıkları sırasıyla; %51.96 ve %60.26, %48.04 ve %39.74 olarak saptandı ($p > 0.05$).

Tedaviye dirençli grupta YMDD mutasyonu bakılan ve pozitif olan 5 (% 45) hastada CC, 5 (% 45) hastada CT, 1 (% 9) hastada TT; YMDD negatif olan 3 (%37)

hastada CC, 5 (%63) hastada CT gen mutasyonları saptandı. Tedaviye dirençli YMDD mutasyonu pozitif hastalarda tedavi yanıtı gruba göre CC genotipi daha fazlaydı ($p=0.043$). Tedavinin 12. ayında tedaviye yanıtı kabul edilen grup ile tedaviye yanıtı grup karşılaştırıldığında CC genotipi açısından gruplar arası fark anlamlı bulundu ($p=0.042$).

Sonuç olarak MDR-1 gen ve ürünü P-glikoproteinde görülen polimorfizmler kronik hepatit B seyrinde tedavi yanıtını etkileyen önemli faktörlerdir. Çalışmamızda MDR C1236T CC genotipi lamivudin dirençli grupta daha sık görülmüştür. Gelecekte kronik hepatit B tedavisinde MDR gen polimorfizmleri tedavi seçiminde ve süresinde klinisyenlere yön verecektir. Bu konuda yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B, lamivudin direnci, MDR 1 gen polimorfizmi.

Destekleyen kurumlar: GOÜ-BAP 2012/32

The effects of MDR-1 gene polymorphisms on the clinical course of chronic hepatitis B infection.

SUMMARY

Chronic HBV infection is associated with high morbidity and mortality rate due to increased risk of hepatic cirrhosis and hepatocellular cancer. Treatment modalities and resistance is currently investigated. Several mechanisms were underlying in drug resistance. P-glycoprotein (P-gp), the product of multidrug resistance gene (MDR-1), is well-known mechanism of MDR phenotype. MDR gene C1236T polymorphism is associated with decreased p-gp function. The mutation of MDR gene can affect the clinical course of disease and response rate to treatment. It was aimed to investigate the relationship between MDR gene polymorphism and clinical course and treatment responses in chronic HBV infection in our study.

A total of 90 (male/female:69/21) patients with chronic HBV infection under Lamivudine treatment was enrolled in this study. Mean ages were 49.8 ± 12.6 (range:22-75) years. The patients were categorized as: Treatment responded (group 1: HBV-DNA is negative at 24th week) and treatment refractory (group 2: HBV-DNA is still positive after 24th week). Group 1 was consisted of 51 (M/F: 38/13) and group 2 was consisted of 39 (M/F: 31/9) patients. There was no significant difference between ages and genders of two groups. Histologic activity indexes (HAI), total bilirubin, AST and ALT levels, HBV-DNA titers were significantly higher in the patients in group 2 than group 1 ($p < 0.05$). YMDD mutation was investigated in a total of 19 patients of group 2. YMDD mutation was positive in 11 patients. MDR-1 gene C1236T alleles' frequencies and CC, CT, TT genotype distributions were investigated in two groups.

Genotype distributions; homozygous CC genotype was in 8 (15.7 %), heterozygous CT genotype was in 37 (%72.5), homozygous TT genotype was in 6 (11.8%) in patients at group 1. Homozygous CC genotype was in 13 (33.3%), heterozygous CT genotype was in 21 (53.8%), homozygous TT genotype was in 5 (12.8%) in patients at group 2. CC genotype was more common in group 2 than group 1 ($p = 0.044$). C and T alleles' frequencies in the group 1 and 2 were 51.96% and 60.26%, 48.04% and 39.74%, respectively ($p > 0.05$).

The patients with YMDD mutation positive at group 2 (n:11), 5 (45%) had have CC genotype, 5 (45%) had have CT, 1 (9%) had have TT genotype. The patients with YMDD mutation negative at group 2 (n:8), 3 (37%) patients had have CC and 5 (63%) patients had have CT genotype. CC genotype was more common in the patients with YMDD mutation positive than group 1 ($p=0.043$). Moreover, CC genotype was more common in the patients with HBV-DNA positive at 12nd month of Lamivudine treatment than group 1 ($p=0.042$).

Consequently; MDR-1 and p-gp polymorphisms are important factors in the clinical course of chronic HBV infection and may influence the treatment responses. In the current study, it was found that the CC genotype of MDR-1 gene C1236T was more common in the patients with lamivudine resistant HBV infection. In the future, MDR gene polymorphisms will help to the clinicians to determine the treatment choice and duration. It must be investigated in the further studies.

Key words: Hepatitis B, Lamivudine resistance, MDR-1 gene polymorphism.

The effects of MDR-1 gene polymorphism on clinical course of chronic hepatitis B infection.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Hepatit B Virüsü.....	3
2.1.1 Hepatit B Virüsü Yapısı ve Özellikleri	3
2.1.2 Epidemiyoloji	5
2.1.2.1 Dünyada HBV Enfeksiyonu Prevalansı	6
2.1.2.2 Türkiye’de HBV Enfeksiyonu Prevalansı	8
2.1.3 HBV Genotipleri ve Serotipleri	8
2.1.4 Hepatit B nin Doğal Seyri ve Klinik Özellikleri	9
2.2 Hbv Enfeksiyonunun Mikrobiyolojik Tanısı	13
2.2.1 Serolojik Tanı Yöntemleri.....	13
2.2.1.1 Akut Enfeksiyon	14
2.2.1.2 Kronik Enfeksiyon.....	16
2.2.2 Moleküler Tanı Yöntemleri.....	17
2.3 Kronik Hepatit B’de Klinik Bulgular.....	18
2.4 Kronik Hepatit B Güncel Tedavisi.....	20
2.4.1 İnaktif Hbsag Taşıyıcılarında İzlem Nasıl Olmalıdır?	21
2.4.2 Kronik Hepatit B Enfeksiyonunda Kimler Tedavi Edilmelidir?21	
2.4.2.1 Siroz Olmayan Hastalarda Tedavi	22
2.4.2.2 Siroz Olan Hastalarda Tedavi	23
2.4.3 Kronik Hepatit B’de Tedavi Önerileri.....	23
2.5 Kronik Hepatit B Tedavisinde Nükleozid Analogları.....	24

2.6 Tedavi Yanıtının Takibi ve Direnç Yönetimi	30
2.7 Tedavi Süresi	32
2.8 Multi-Drug Rezistans Gen Polimorfizmi	35
3. MATERYAL METOD	39
3.1. Materyal ve Metod	39
3.2. Olguların Seçimi	40
3.3. Genetik Analiz	41
3.3.1. Kullanılan cihaz ve kimyasallar	41
3.3.2. DNA İzolasyonu	42
3.3.3. Kan Dokusundan DNA İzolasyonu Protokolü	42
3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	43
3.3.5. Agaroz Jel Elektroforezi	44
3.3.6. Revers-Hibridizasyon (Southern Blot)	44
3.3.7. Revers Hibridizasyon Basamakları ve Kullanılan Solüsyonlar	44
3.3.8. Striplerin Değerlendirilmesi	45
3.4. İstatistiksel Analiz	45
4.BULGULAR	47
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
7. KAYNAKLAR	58

KISALTMALAR

ABC	: ATP bağlayan kaset (ATP binding cassette)
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ALT	: Alanin aminotransferaz
BKİ	: Beden-kitle indeksi
CccDNA	: Kovalent bağlı sirküler DNA
dk	: Dakika
EIA	: Enzyme Immuno Assay
ELİSA	: Enzyme linked immunosorbent assay
ER	: Endoplazmik retikulum
FDA	: Food and Drug Administration
HAİ	: Histolojik aktivite indeksi
HBsAg	: Hepatit B yüzey antijeni
HBV	: Hepatit B virüsü
HBV-DNA	: Hepatit B virüsü DNA'sı
HCC	: Hepatoselüler Karsinom
HCV	: Hepatit C virüsü
HDV	: Hepatit D virüsü
HIV	: Human Immunodeficiency Virüs
IgM	: İmmunoglobulin M
IgG	: İmmunoglobulin G
INFα	: İnterferon alfa
IU	: International Unit
kb	: Kilobaz
LHBs Ag	: Büyük hepatit B yüzey antijeni
LMV	: Lamivudin
MDR	: Multi drug resistans geni
MRP	: Multi drug resistans ilişkili protein
mg	: Miligram
MHBs Ag	: Orta hepatit B yüzey antijeni
mIU	: Mili International Unit

mL	: Mililitre
NCSS	: Number Cruncher Statistical System
nm	: Nanometre
NTR	: Nontranslated region
NÜS	: Normalin üst sınırı
ORF	: Open Reading Frame (Açık okuma çerçevesi)
PCR	: Polimerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
peg INFα	: Pegile interferon alfa
P-gp	: P-glikoprotein
rcDNA	: Pozitif iplikli çembersel DNA
RIBA	: Recombinant immüno blot assay
RNaz	: Ribo Nükleaz
S. B.	: Sağlık Bakanlığı
SHBs Ag	: Küçük hepatit B yüzey antijeni
Std. IFN	: Standart interferon
TGA	: Timin -Guanin –Adenin
TGG	: Timin -Guanin –Guanin
UTR	: Untranslated region
YMDD	: Tirozin-Metionin-Aspartat-Aspartat

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1: HBV'nun genomik organizasyonu ve sentezlenen RNA'lar	4
Şekil 2: Kronik hepatit B prevalansı.....	7
Şekil 3: Hepatit B virüs enfeksiyonunda kliniğin doğal seyri	11
Şekil 4: KHB enfeksiyonunun seyrinde dört dönem görülür: immun tolerans, immun klirens (HBeAg pozitif KHB), inaktif taşıyıcılık, reaktivasyon (HBeAg negatif KHB).....	13
Şekil 5: Akut HBV enfeksiyonunda tanısal belirteçler	15
Şekil 6: Oral antivirallere dirençli hastalarda tedavi yaklaşımı	32
Şekil 7: Hasta grupları arasında C1236T genotip dağılımı.	49

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. Kronik Hepatit B nin dönemlerine göre virolojik parametrelerin gösterilmesi	13
Tablo 2. Nükleozid/Nükleotid analogları için antiviral direnç tanımları	28
Tablo 3. Kronik Hepatit B algoritması (2011 UpToDate)	34
Tablo 4. P-gp'in dokulardaki hücresel lokalizasyonu ve fonksiyonları	37
Tablo 5. Hasta gruplarının tedavi öncesi klinik ve labaratuvar özellikleri.....	48
Tablo 6. Lamuvidin yanıtı ve dirençli hastalarda C1236T genotipik dağılımı	49
Tablo 7. YMDD mutasyonu pozitif ve negatif grubun lamuvidin kullanım süresi ve C1236T genotipik dağılımı	50
Tablo 8. Tedavi yanıtı ve tedavi dirençli olup lamuvidin kullanım süresine 12 ay'ın altında ve üstünde olan hastaların genotipik dağılımı.....	51

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik hepatit B, bu gün dünyada 400 milyon kişiyi ilgilendiren önemli bir sağlık problemi ve en yaygın enfeksiyon hastalıklarından biridir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, dünya nüfusunun üçte biri hepatit B virusu ile enfektedir ve bunların % 5'i kronik Hepatit B hastasıdır. Kronik hepatit B hastalarının %25'inde ölümcül karaciğer hastalıkları olan karaciğer sirozu ve karaciğer kanseri gelişmektedir. Hepatit B virusuna bağlı tüm dünyada yılda 1 milyon kişi hayatını kaybetmektedir (1, 8).

Önemli bir morbidite ve mortaliteye sahip kronik hepatit B gelişimini önlemek için yapılan araştırmalar sonucu % 95 koruma etkinliği olan ve güvenilir bir aşı gündeme gelmiştir. Doksandan fazla ülkede, yenidoğanların aşılınması kural olarak kabul edilmiştir.

Hepatit B virüsü ile enfeksiyon neticesinde meydana gelen kronik hepatit hastalığı, yıllar içerisinde karaciğer yetersizliğine ve hepatoselüler kansere ilerlemektedir. Karaciğer kanseri olguları incelendiğinde; hastaların % 82'sinde viral etioloji görülmekte, bunların da 2/3'ünü hepatit B oluşturmaktadır. Kronik hepatit B de, kronik hepatit C'ye benzer şekilde parenteral yollardan insanlara bulaşmaktadır. Hepatit B enfeksiyonunun edinilme yaşı arttıkça kronikleşme riskinin azalır, yenidoğan ve ilk 1 yaşta geçirilen enfeksiyon % 90 kronikleşmekte, bu oran 1-5 yaş arasında % 30'a inmekte, daha erişkin yaşlar için % 2 civarında bulunmaktadır (1, 2).

Bilinen olası hepatit B virüsü bulaş yolları, anneden bebeğe doğum esnasında geçiş, seksüel temas, intravenöz ilaç kullanımı, akupunktur yöntemleri uygulaması ve kan transfüzyonları sırasında meydana gelen geçişlerdir. Aile içi temas ile de bulaşabildiği tahmin edilmektedir.

Lamivudin (beta- L- 2',3'-dideoksi thiacytidine), kronik hepatit B tedavisinde onay alan ilk nükleozid analogudur. Hastalar tarafından iyi tolere edilir ve kullanımını kısıtlayacak önemli ve sık görülen yan etkileri de yoktur. Hepatit B virüs DNA'sının replikasyonunu sağlayan "revers transkriptaz" enzimini bloke ederek virüsün replike olmasını önler. Lamivudin ile tedavi edilen kronik hepatit B'li hastaların karaciğer enzim düzeyleri normalleşir, serumda HBV-DNA yükü azalır ve hepatitin nekroinflamatuvar aktivitesi geriler.

Ancak; tedavi kesildikten ortalama 3-6 ay sonra hastalığın relaps gösterebilmesi ve ilaca karşı direnç gelişimi, lamivudin tedavisinin olumsuz özellikleri olarak karşımıza çıkmaktadır (1).

MDR1 gen mutasyonu, hepatit B'li hastalarda tedaviye yanıt oranlarını ve klinik seyri etkileyebilir. İlaçlara yanıt ve ilaçlara bağlı yan etkiler ilaç metabolize eden enzimlerdeki genetik değişikliklere bağlı olarak aynı toplumdaki bireyler arasında farklılık gösterir. Bu fark ilaç direnci oluşturan MDR genlerinin artmış ekspresyonuna bağlı olabilir. P-glikoprotein (P-gp) insanda MDR1 geni tarafından kodlanmaktadır ve MDR' in bir ürünüdür (9).

MDR1 geninde gösterilmiş olan tekli nükleotid polimorfizmlerinden C3435T, C1236T ve G2677T polimorfizmlerinin P-gp ekspresyonunda ve/veya fonksiyonunda değişimlere neden olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (10).

MDR1 gen ürünü olan P-gp'nin artmış salınımı, MDR fenotipini oluşturan mekanizmalar içinde en iyi araştırılmış olanıdır. P-gp ekspresyonunu P-gp polimorfizmi etkilemektedir ve en sık C3435T, C1236T polimorfizmlerine rastlanmaktadır. Bazı allellerde P-gp ekspresyonunun yüksek olduğu, bu durumun ilaçlara ve bazı maddelere karşı oluşan dirençten sorumlu olduğu düşünülmektedir (11). P-gp çeşitli organlarda exprese edilmektedir ve intestinal eritrositlerde, beyin kapillerlerinin endotel hücrelerinde, böbrek proksimal tübül hücrelerinde ve karaciğer kanaliküler hücrelerde ilaç dağılımı ile ilişkilidir (12).

P-gp'nin kronik hepatit B tedavisinde kullanılan nükleozid analogu ilaçların dağılımında ve bu ilaçlara karşı oluşan dirençte rolü olabilir. MDR gen mutasyonu, hepatit B'li hastalarda tedaviye özellikle nükleozid analoglarına yanıt oranlarını etkileyebilir.

Bu çalışmada, kronik hepatit B hastalarında tedaviye yanıt oranları ile MDR1 gen polimorfizmi arasındaki ilişki araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatit B Virüsü

2.1.1. Hepatit B Virüsü Yapısı ve Özellikleri

Hepatit B virüsü ilk defa 1965 yılında Bulumberg ve arkadaşları tarafından "Avusturalya Antijeni" adı verilen bir serum proteini olarak rapor edilmiş, 1970 yılında tüm virionun elektron mikroskopi görüntüleri saptanarak, HBV'nün esas enfeksiyöz partikülü olan "Dane Partikülleri" adını almıştır. HBV'nün 42 nm büyüklüğündeki Dane partikülleri dışında, 22 nm büyüklüğünde sferik ve 22x100-200 nm büyüklüğünde filamantöz partikülleri de elektron mikroskobunda tarif edilmiş, bunu izleyen yıllarda çeşitli çalışmalarda virüsün genomik yapısı ve proteinleri karakterize edilmiştir (13).

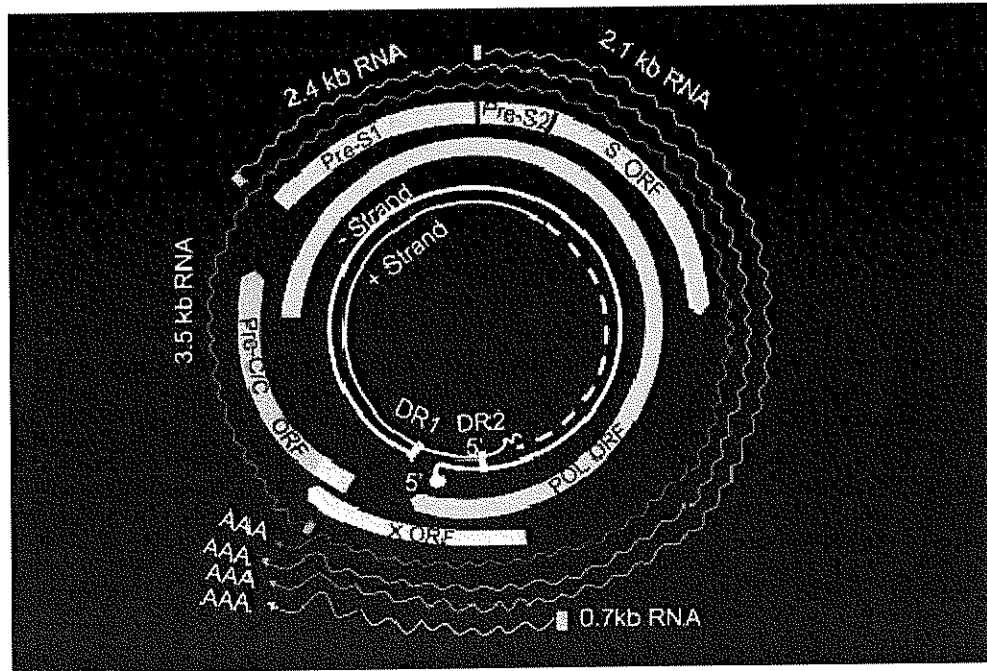
Hepatit B virüsü, Hepadnaviridae ailesinin orthohepadnavirüs cinsi içinde yer alan hepatotropik, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir deoksi ribonükleik asit (DNA) virüsüdür. Sadece, 3200 nükleotidden oluşan genomik yapısı nedeniyle, bilinen tüm DNA virüsleri içinde en küçük olanıdır. Hepadnaviridae ailesinin üyeleri içinde insanlarda enfeksiyon oluşturan tek tür HBV'dir. Enfekte hücrelerde üç farklı HBV partikülü gösterilmiştir. Dane partikülü olarak isimlendirilen, yaklaşık 42 nm çapındaki küresel şekilli partikül enfektif özelliktedir. 22 nm çapındaki küresel partikül ile tübüler partiküller ise nükleik asit içermeyip enfektif değildirler (14). Dane partikülünün çekirdeğinde bulunan viral genom çember şeklinde ve kısmen çift iplikçikli DNA yapısındadır. İplikçiklerden uzun olanı L veya negatif zincir, kısa olanı ise S veya pozitif zincir olarak isimlendirilir. Genetik bilginin tamamı uzun sarmal üzerinde kodlanmış olup bu sarmal üzerinde S, C, X ve P kısaltmaları ile gösterilen dört değişik protein kodlayan nükleik asit dizisi (Open Reading Frame=ORF) tanımlanmıştır (15, 16).

1.S geni: Pre-S1, pre-S2 ve S bölgelerinden oluşup, virüs yüzey antijenini (hepatit B yüzey antijeni-HBsAg) kodlayan genidir. HBsAg'nin a, d, y, w ve r aminoasitlerinden a antijenik yapısı tüm HBsAg pozitif bireylerde mevcut olup, buna karşın oluşan anti-HBs nötralizan antikoru bağışıklığı sağlar.

2.C geni: Kor ve nükleokapsid genidir. Kor partikülü içinde toparlanan hepatit B kor antijenini (HBcAg) kodlar. HBcAg, sadece karaciğer hücresinde tespit edilebilir. Bu antijenin karboksi terminalinin bir bölümünden hepatit B e antijen (HBeAg)'i kodlanarak extrasellüler bölgeye salınır. HBeAg, replikasyon ve enfeksiyözitenin göstergesidir. C gen organizasyonu pre C bölgesinden başlarsa HBeAg, C bölgesinden başlarsa HBcAg sentezlenmektedir.

3.P geni: P proteini=polimeraz (Pol) geni, viral genomun büyük bir kısmını (3/4) kaplar. DNA bağımlı DNA polimeraz ve ribonükleik asit (RNA) bağımlı revers transkriptaz aktivitesindeki temel bir polipeptidi kodlar.

4.X geni: Viral replikasyon için önemli olan iki transkripsiyon aktivatörünü kodladığı düşünülen küçük bir gendir (17). Şekil 1'de HBV genomunun organizasyonu ve sentezlenen RNA'lar görülmektedir.



Şekil 1: HBV'nun genomik organizasyonu ve sentezlenen RNA'lar (3)

Hepatit B virüsünün konak hücreye bağlanmasında bazı konak doku faktörlerinin rol oynadığı düşünülmektedir. Fibronektin, transferrin reseptörü, apolipoprotein H, insan serum albumini, pre S2 glikan ve HBV bağlayan faktör gibi birçok reseptör adayı tanımlanmıştır (18). Hücre yüzey reseptörü yolu ile HBV hepatosite girer ve sonra HBV zarfı soyularak HBV cccDNA formu ortaya çıkar. cccDNA, hepatositin nükleosunun içine hareket eder ve viral replikasyon sırasında

RNA'nın kopyalanması için kalıp görevi yapar. Kor virüs partikülleri HBsAg ile sarılır ve HBV virionu salınır (17).

2.1.2. Epidemiyoloji

Hepatit B virüs enfeksiyonu halen tüm dünyada en önde gelen sağlık sorunlarından biridir. Dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri serolojik olarak eski veya yeni enfeksiyon delillerine sahiptir (1,7). Hepatit B Virüsü akut hepatit, kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinomun en önemli etkenlerinden biridir. Değişik bölgelerden yapılan prevalans ve hastalık sonuçları ile ilgili çalışmalar HBV'nün tüm siroz vakalarının %30' undan, tüm hepatoselüler kanser (HCC) vakalarının ise % 53 ünden sorumlu olduğunu göstermektedir (19). Tüm dünyada 400 milyonu aşkın sayıda kişinin HBV ile kronik olarak enfekte olduğu ve her sene global olarak izlenen 530.000 hepatoselüler karsinom olgusunun 316.000'inin HBV ile ilişkili olduğu bilinmektedir. KHB dünyada tüm kıtalarda görülür, fakat prevalansı farklı coğrafik bölgelerde endemikten (>%8) düşük seviyelere (<%2) kadar değişir. HBV'nün dünya üzerindeki prevalansı ülkelerin gelişmişlik düzeyi ile ilgili özellikler gösterir (19). Her yıl dünyada 1.000.000'a yaklaşan sayıda kişi, HBV enfeksiyonu ile ilgili komplikasyonlardan kaybedilmektedir. Etkili bir aşısı olan HBV enfeksiyonu ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak önemini sürdürmektedir (20 - 22).

Kronik Hepatit B Türkiye'de de halen önemini koruyan ciddi bir sağlık sorunudur. Ülkemiz nüfusunun yaklaşık %5-6'sı HBV taşıyıcısı ve en az 3 kişiden birisi de HBV enfeksiyonu ile karşılaşmıştır. Türkiye'de HBsAg (HBV yüzey antijeni) seroprevalansı %3,9-12,5 arasında olup yaklaşık 3-4 milyon insanın HBV'nü taşıdığı tahmin edilmektedir. Anti-HBs pozitifliği ise %20,6 ile %56,3 arasındadır (23, 24). Türkiye HBsAg taşıyıcılığı bakımından dünyada orta derecede endemik sayılabilecek durumda olup bulaş daha çok çocukluk çağında olmaktadır ve çocukluk çağında alınan enfeksiyonun kronikleşme oranı daha fazladır. Ülkemizde en sık kronik viral hepatit etkeni hepatit B virüsüdür ve kronik hepatitli hastaların %45'inde, karaciğer sirozlu hastaların ise %35'inde etyoloji tek başına HBV'dir (24, 25). HBV'nin bulaşmasında taşıyıcıların yanısıra, akut ve kronik enfeksiyonlu bireylerin kan ve vücut sıvıları önemli rol oynar (26, 27). İnsan vücut sıvılarından kan, semen ve vajinal sekresyonlarda önemli oranda HBV bulunurken (HBsAg ve

HBV DNA pozitifliği) ter, gözyaşı, tükürük, süt ve diğer vücut sıvılarında da virüs tespit edilmiş olup, bu sıvılar da potansiyel olarak enfeksiyöz kabul edilmektedir. Bununla birlikte enfeksiyöz HBV partikülleri yalnızca serum, tükürük ve semende kesin olarak gösterilebilmiştir (27, 28). -20 °C'de uzun süre saklanabilir ve 60 °C'de 4 saat yaşayabilir. 100 °C'de ve sodyum hipokloritle muamele ile 10 dakikada inaktive olur. HBV enfeksiyonunun başlıca bulaşma yolları ve bulaşma yollarına göre risk grupları aşağıda özetlenmiştir (26).

1- Parenteral (perkütan) bulaşma

- Çoğul transfüzyon yapılan hastalar
- Hemodiyaliz hastaları
- Damar içi uyuşturucu bağımlıları
- Dövme (tatuaj) yaptırınlar
- Sağlık personeli

2- Cinsel temasla bulaşma

- Erkek eş cinseller
- HBV taşıyıcılarının cinsel partnerleri
- Multipartneri olanlar
- Çok partnerli heteroseksüeller

3- Perinatal-vertikal bulaşma

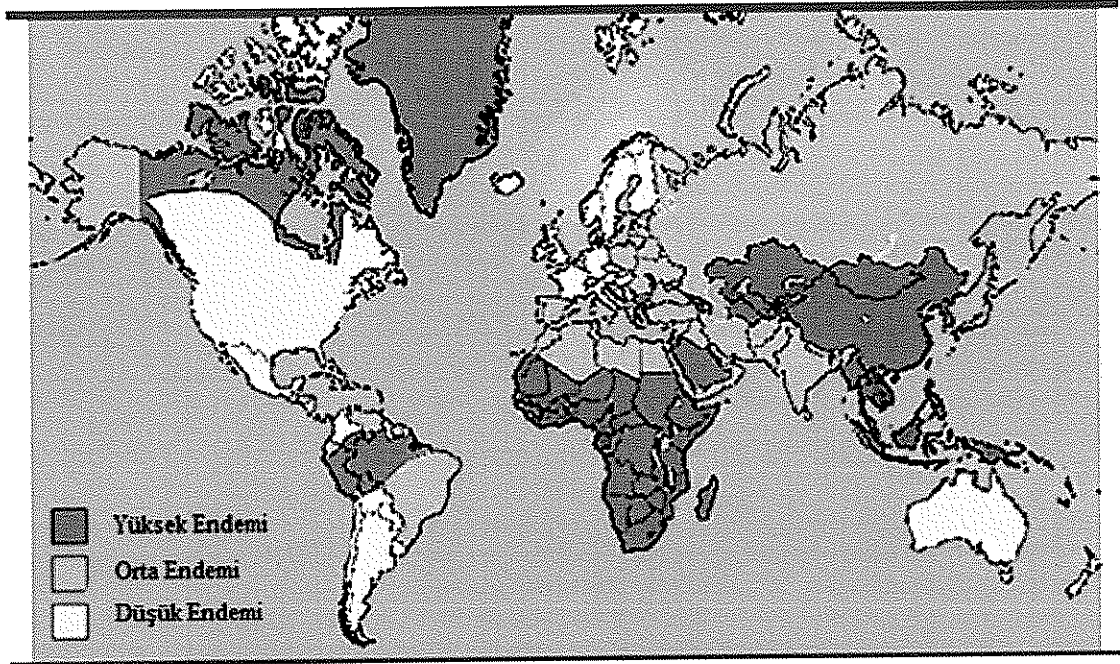
- HBV taşıyıcısı annenin bebekleri

4- Horizontal bulaşma

- Kötü hijyen ve düşük sosyoekonomik durum
- Mental özürölüler

2.1.2.1. Dünyada HBV Enfeksiyonu Prevalansı

HBV enfeksiyonu prevalansı tüm dünyada oldukça iyi araştırılmıştır. HBsAg ve anti-HBs pozitifliği oranları, enfeksiyonun alınma yaşı, en sık görülen bulaşma yolu gibi kriterler gözönüne alınarak dünya, şekil 2' de olduğu gibi düşük, orta ve yüksek endemisite bölgelerine ayrılmıştır (26).



Şekil 2: Kronik Hepatit B prevalansı (2006 UptoDate)

1. Düşük Endemi: HBsAg prevalansının $< \%2$ olduğu coğrafik bölgelerdir: Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa, Yeni Zelanda, Avustralya gibi gelişmiş ülkelerdir (26). Bu ülkelerde genel popülasyonda hepatit B insidansı düşük olup cinsel temas en önemli bulaş yoludur. Bu bölgelerde, genç erişkin dönemde parenteral yolla, özellikle ortak enjektörle intravenöz ilaç kullanımı ve yüksek riskli-güvenli olmayan cinsel temasla gelişen enfeksiyon neticesinde kronikleşmenin daha ön planda olduğu görülmektedir. İntravenöz ilaç bağımlılığı, homoseksüeller, kronik böbrek yetmezlikli hastalar ve bunlara hizmet veren diyaliz personeli, çok sayıda cinsel partneri olan kişiler, kronik HBV enfeksiyonu olan kişilerle aynı evde yaşayanlar, bakımevlerinde izlenen mental retarde bireyler, sağlık personelleri riskli grubu oluşturmaktadır (15).

2. Orta endemi: HBsAg prevalansı $\%2-7$ oranındadır. Yetişkinlerin $\%20- 60$ 'ında anti-HBs pozitifdir. Doğu Avrupa, Fransa hariç Akdenize kıyısı olan Güney Avrupa ülkeleri, Rusya, İspanya, İsrail, İran, Suriye, Irak, Hindistan'ın yer aldığı Güney Orta ve Güney Batı Asya orta endemisiteye sahiptir. Enfeksiyon çoğunlukla çocukluk, ergenlik ve genç erişkinlik döneminde alınır. Başlıca bulaş yolu horizontaldir. Perinatal bulaş $\% 10-20$ oranında görülmektedir (15, 30).

3. Yüksek endemi: Afrika, Güneydoğu Asya, Çin, Alaska'da HBsAg pozitifliği %5-20 oranındadır ve yetişkinlerin %70'ten fazlası enfeksiyona karşı bağışıktır. Perinatal ve horizontal bulaş ana bulaş yoludur. Asya'da perinatal bulaşma, Afrika'da horizontal bulaşma ön plandadır (15, 29). Çocukluk dönemindeki enfeksiyonların çoğu asemptomatiktir ve bu dönemde hepatit B ile ilgili akut enfeksiyon belirtileri siliktir, fakat erişkinlerde kronik karaciğer hastalığı ve karaciğer kanseri oranı yüksektir (30).

2.1.2.2. Türkiye'de HBV Enfeksiyonu Prevalansı

Türkiye, yaklaşık %6 (%3.9-12.5) prevalansla (yaklaşık 3.5 milyon kişi) orta endemisiteye sahip bölgeler arasında yer almaktadır. Ülkemizde yapılan epidemiyolojik çalışmalar HBV'nün çocukluk ve gençlik çağında aile ve toplum içinde horizontal yolla alındığını ve 18-20 yaşlarında toplumun taşıyıcılık oranına ulaşıldığını göstermektedir (26).

2.1.3. HBV Genotipleri ve Serotipleri

Coğrafik ve etnik orjine göre HBV'nin farklı genotipleri vardır. Bunlar A-H arasında 8 farklı genotip olup, Türkiye'de genotip D hakimdir. Genotip A, Kuzey Amerika, Afrika ve Kuzey Avrupa'da; B ve C, Asya-Pasifik'te; D, Akdeniz ülkeleri ve Hindistan yarımadası'nda; E, Sahra altı Afrika'da; F, Orta ve Güney Amerika'da yaygın görülmektedir. Genotip G'nin yoğunlaştığı bölgeler bilinmemek ile birlikte, Kuzey Amerika ve Fransa'da tesbit edildiği, Tayvan'da hepatosellüler kanserli hastalarda genotip C ile kombine olarak saptandığına dair yayınlar mevcuttur (31). Genotip H'nin dağılımı henüz anlaşılamamıştır. S geninde % 4, diğer tüm genom dizisinde de % 8 oranında görülen varyantlar HBV'nün genotipleri olarak tanımlanır. Genotiplerin tahmin edilen prevalansı genotip A için % 35; genotip B için % 22; genotip C için % 31; genotip D için % 10 ve geriye kalanlar için % 2 civarındadır (31).

Hepatit B virüsü, HBs antijeninin yapısal farklılıklarına göre ise serotiplere ayrılmıştır. Bu serotipler 9 adet olup her biri ortak "a" determinantı taşımaktadırlar. Virusun coğrafi dağılımı ile genotip arasında uyumluluk görülmektedir. Farklı genotipler ile ko-enfeksiyonun mümkün olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Genotipler arasında rekombinasyon olasılığı da mümkündür (1, 2, 34). Türkiye'de

yapılan bir çalışmada akut hepatit B etkenlerinin tümünün genotip D olduğu tesbit edilmiştir (4).

2.1.4. Hepatit B nin Doğal Seyri ve Klinik Özellikleri

Hepatit B virüsü ile enfeksiyon sonrası, 6 aydan uzun süren HBsAg pozitifliği kronik hepatit B'ye işaret eder. Bu durum, karaciğerde viral replikasyonun devam ettiği, hem karaciğer hem de kanda titreleri farklı olmak kaydı ile viremi olduğu anlamına gelmektedir. Karaciğerde hepatosit ölümüne eşlik eden inflamatuvar infiltratların varlığı, kronik viral hepatit için karakteristiktir (32). HBV enfeksiyonunun kronikleşme olasılığı, enfeksiyonun bulaşma yolu ve bulaşma yaşına göre değişkenlik gösterir. Yüksek endemik alanlarda infekte anneden yenidoğana perinatal enfeksiyon ve erken çocukluk döneminde HBsAg pozitif aile üyelerine temas sonucu horizontal enfeksiyon HBV bulaşındaki ana yolları oluşturur (32). Enfeksiyon; yenidoğan ve süt çocukluğu döneminde kazanıldığında % 95 civarında kronikleşme görülürken, bu dönemden itibaren ilk 6 yaş içerisinde kazanıldığında ise kronikleşme oranı % 30 civarına inmektedir. Erişkin dönemde infekte olunması durumunda kronikleşme riski % 5-10 civarında görülmektedir (1, 32-34).

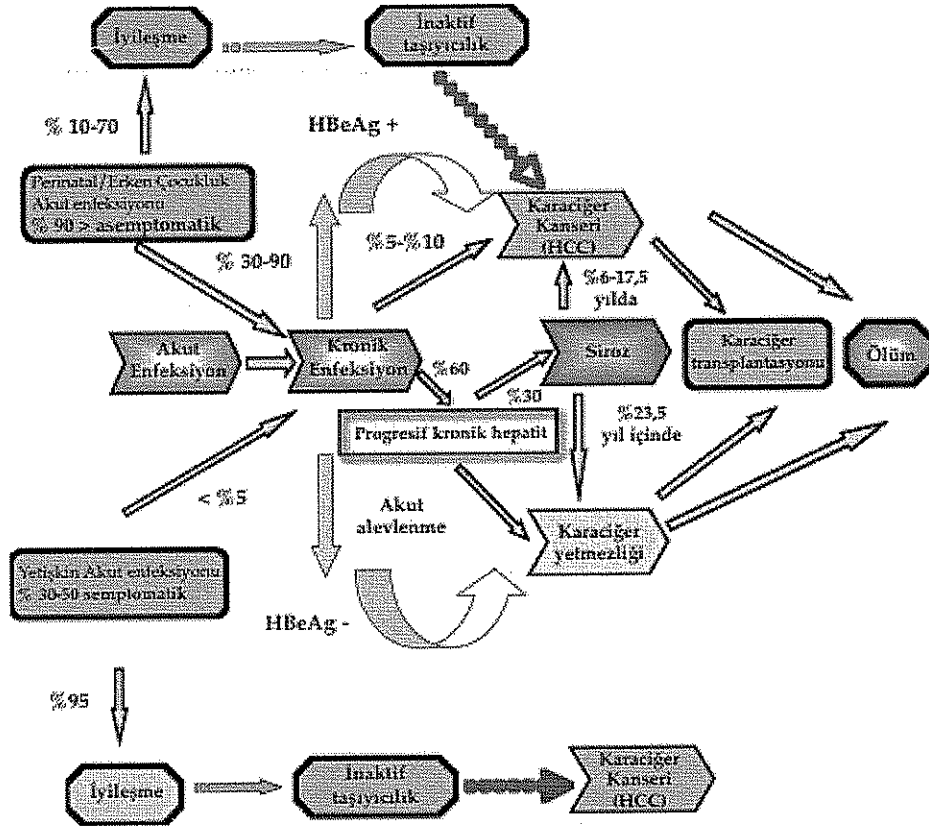
Viral hepatitlerde virüsün karaciğerde direk sitopatik etkisinin olmadığı, hastalık tablosunun immünolojik olduğu görüşü hakimdir (35, 36). HBV'ye bağlı olarak karaciğerdeki hasar ve HBV'nin temizlenmesi immün sistem ile ilgilidir (37, 38). Konağın HBV'ye karşı immün yanıtı klinik patolojinin ve virüsten kurtulmanın temel nedenidir. HBV virüsüne karşı konakçının immün yanıtı karaciğerde hasara neden olmaktadır. Hücresel immün yanıt iki yolla olmaktadır (39, 20, 40):

1. Human leucocyte antigen (HLA) class I CD8+ zayıf sitotoksik T lenfosit (CTL) kontrolündeki yoldur. Bu yoldaki hücresel immün yanıtta hepatit B virüsünün küçük proteinleri (özellikle HBcAg) CD8+'e sunulmak için hepatosit içinde belirli süreçlerden geçirilir. Bu süreçlerden sonra oluşan süreç hepatosit yüzey membranına getirilir. Hepatosit yüzey membranındaki bu süreçler direkt olarak CD8+ sitotoksik T lenfositler ile birleşir ve enfekte hücrenin ölümüne neden olur (39). HBV proteinlerin residü peptidlerini düzenlemek sınırlı olduğundan, class I deki bağlanma olduğunda değişiklik yapılarak, bu residü peptidlerin bağlanmaları sağlanabilir. Günümüzde Major-Histokompatibilite-Kompleks (MHC)'deki bağlanma

alanlarının polimorfik natürde olması bunu desteklemektedir ve bu immüdominant hepatit B virüs peptidlerinin çok çeşitli bağlanmalara afinitesi olduğundan akut HBV enfeksiyonu sonrasında, virüse karşı gelişen immün yanıtın şeklini belirler.

2. Hepatosit dışındaki viral proteinlerin peptid parçacıkları karaciğere özgü olmayan antijen sunan hücreler (özellikle makrofajlar) tarafından hücre içine alınır. Bu antijen sunan hücrelerin sitoplazmasında yine benzer şekilde süreçler oluşturulur ve bu süreçler hücre membranına getirilir. Bu süreçler CD4+ T hücreleri ile birleşir, bu birleşim T hücre çoğalmasını, T hücreleri tarafından sitokin (bu sitokinler hepatositlerde hasara ve antijen sunan hücrenin ölümüne neden olur) salgılanmasını ve B hücrelerinin uyarılmasını tetikler (20). Bu farklı immün yanıtlar sonrasında virüs başarılı şekilde temizlenir, virüsün başarılı şekilde temizlenmesi için konakta MHC molekülü, spesifik T hücrelerine antijen sunumu ve T hücreleri arasındaki uyuma (yani konakta hiçbir immün yetmezlik durumunun olmamasına) bağlıdır. Eğer bu tanınmada ve aktive olmada yetmezlik olursa, enfekte tüm hücreler parçalanır, viral replikasyon ürünleri açığa çıkar ve HBsAg'e karşı oluşan antikor hepatositlerin yeniden enfekte olmasını önleyemediğinden, başka hepatositler enfekte olur. Yani, yeterli immün yanıt olmazsa enfeksiyon devam ederek, enfekte hepatositleri öldürmeden HBV'yi inaktive ederler (40).

HBV enfeksiyonunun klinik spektrumu hem akut hem de kronik hastalıkta değişkenlik göstermektedir. Akut fazda subklinik veya anikterik hepatitten ikterik hepatite, bazı vakalarda ise fulminan hepatite kadar değişik klinik ile seyredebilmektedir. Kronik faz sırasında ise asemptomatik taşıyıcı durumundan, kronik hepatit, siroz, hepatosellüler karsinoma kadar değişen bir seyir çizebilmektedir. Ekstrahepatik belirtiler akut ve kronik enfeksiyonların her ikisinde de görülebilmektedir (41-43) (Şekil 3).



Şekil 3: Hepatit B virüs enfeksiyonunda kliniğin doğal seyri
(Viral Hepatitle Savaşım Derneği - Hepatit B 2009)

HBV' nün replikasyonunu hücreye entegre olarak gerçekleştirmesi onun sitopatik etkinliğini göstermekte ancak HBV taşıyıcılarının birçoğunun bu yoğun virüs replikasyonuna rağmen minimal karaciğer hasarı ile birlikte asemptomatik olmaları HBV' nün doğrudan sitopatik olmadığını desteklemektedir (41-43). Hepatosellüler hasarın ciddiyeti, konakçı immün yanıtın gücü ile belirlenmektedir. Fulminan HBV enfeksiyonu olan hastalarda şiddetli bir immün yanıt ve hızlı viral klirens ölümcül tablolara yol açabilmektedir. Oysa ki immatür bir immün sisteme sahip yenidoğanda HBV maruziyeti sıklıkla minimal akut karaciğer hasarına neden olmakta ancak % 90 dan fazla kronik enfeksiyon olma ihtimali mevcuttur (44-46). Önceleri HBV enfeksiyonu geçirip viral antijenleri kaybolmuş anti viral antikor ve spesifik sitotoksik T lenfosit oluşturmuş ve virüsten kurtulmuş olduğu düşünülen kişilerin serumlarında HBV DNA tespitine yönelik hassas yöntemlerin geliştirilmesi ile 10 – 15 yıl sonra bile HBV genomu izlerine rastlanması; kemoterapi veya organ transplantasyon sonrası immün süpresif tedavi alan bu gibi hastalarda HBV

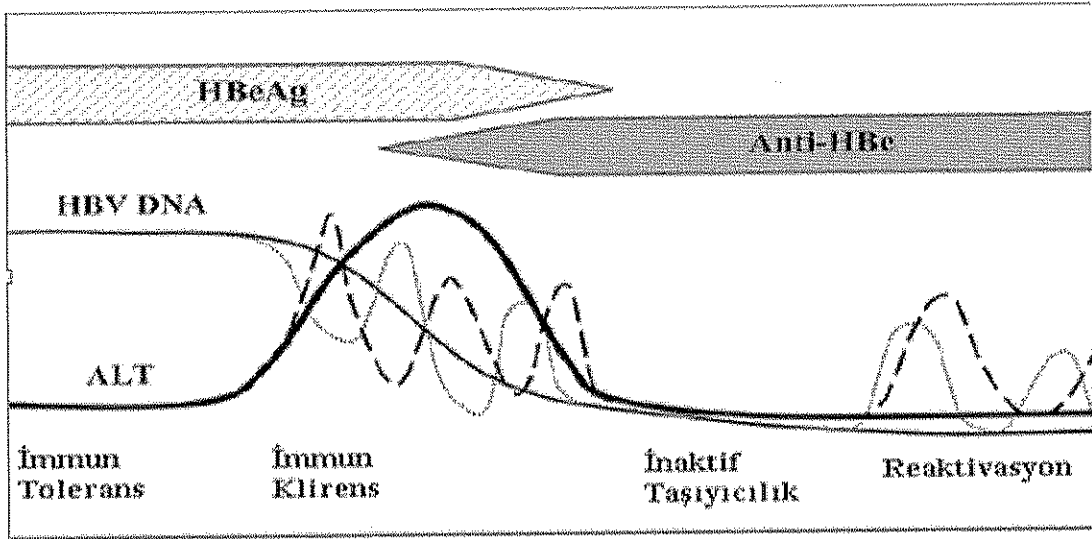
replikasyonunun reaktive olması HBV' nün akut enfeksiyon sonrası nadiren tamamen eradike olduğunu düşündürmektedir (47, 48). Virüsün hepatosite girmesinden sonra HBV enfeksiyonu bazı immünolojik belirleyicilerin belirlediği, birbirini izleyen dört evrede gelişir ve sonlanır (28, 20) (Şekil 4).

- **Evre 1 İmmüntoleran Faz:** Enfeksiyonun semptomsuz inkübasyon dönemine uyar. Bu dönemde virüs replikasyonuna rağmen, oluşan immüntolerans nedeniyle karaciğer hasarı ortaya çıkmaz. HBsAg, HBeAg ve HBV-DNA yüksek titrelerde saptanırken, transaminaz seviyeleri normaldir. Karaciğer biyopsisi normaldir veya minimal hepatit bulguları gösterir (49).

- **Evre 2 İmmünklerens Faz (HBeAg + Kronik Hepatit B):** Aktif hepatit ile karakterize olup HBsAg, anti-HBc IgM ve IgG pozitif ve transaminazlar yüksektir. HBV-DNA miktarı azalmıştır. Bu evre kronik hastalarda yıllarca sürer, hastalık siroz ve hepatosellüler kanserle sonuçlanabilir. Karaciğer biyopsisinde belirgin enflamatuvar aktivite tespit edilir. Sonunda anti-HBe serokonversiyonu gelişebilir (20).

- **Evre 3 Düşük veya Nonreplikatif Faz (İnaktif HBs Taşıyıcısı):** Konak immün yanıtının gelişmesi ile karakterize olan bu evrede HBsAg pozitif olmakla birlikte HBV-DNA negatifleşmiştir. Normal ya da normale yakın transaminaz seviyeleri olup karaciğer biyopsisinde nekroinflamatuvar aktivitenin azalmış olduğu görülür. Birçok taşıyıcı hayatları boyunca HBeAg negatif, anti-HBe pozitif olarak yaşar (50).

- **Evre 4 Reaktivasyon faz (Reaktivasyon Dönemi):** İnaktif HBV taşıyıcılarının 1/3'ünde HBe Ag'nin tekrar pozitifleşmesi gözlenmeden kronik hepatit oluşabilir. Bu taşıyıcıların bir kısmı HBV varyantlarından birini taşımakta olup HBV genomunun prekor ve kor-promotor bölgelerinde oluşan mutasyonlardan dolayı HBeAg salgılanmamaktadır. Hastaların bir kısmı HBeAg negatif kronik hepatitten direkt olarak HBeAg pozitif kronik hepatite geçerken çoğu bu döneme değişken süreli bir inaktif taşıyıcılık durumundan sonra girmektedir. Bu dönem HBeAg yokluğu ve anti-HBe antikorları varlığı, saptanabilir düzeylerde HBV-DNA mevcudiyeti, serum ALT düzeyleri yüksekliği ve histolojik olarak karaciğerde devam eden nekroinflamasyon ile karakterizedir (51).



Şekil 4: KHB enfeksiyonunun seyri dört dönem görülür: immün tolerans, immün klirens (HBeAg pozitif KHB), inaktif taşıyıcılık, reaktivasyon (HBeAg negatif KHB).

Tablo 1: Kronik Hepatit B nin dönemlerine göre virolojik parametrelerin gösterilmesi

	İmmün tolerant faz	HBeAg pozitif KHB	İnaktif HBsAg taşıyıcısı	HBeAg negatif KHB*
HBsAg	+	+	+	+
HBeAg	+	+	-	-
Anti-HBe	-	-	+	+
ALT	Normal	Yüksek	Normal	Yüksek/Dalgalı
HBV DNA	>10 ⁵ kopya/mL	>10 ⁵ kopya/mL	<10 ⁴ kopya/mL	>10 ⁴ kopya/mL
Histoloji	Normal/Hafif	Aktif	İnaktif	Aktif

*Precore mutant IUU: 5 kopya/mL

2.2. HBV Enfeksiyonunun Mikrobiyolojik Tanısı

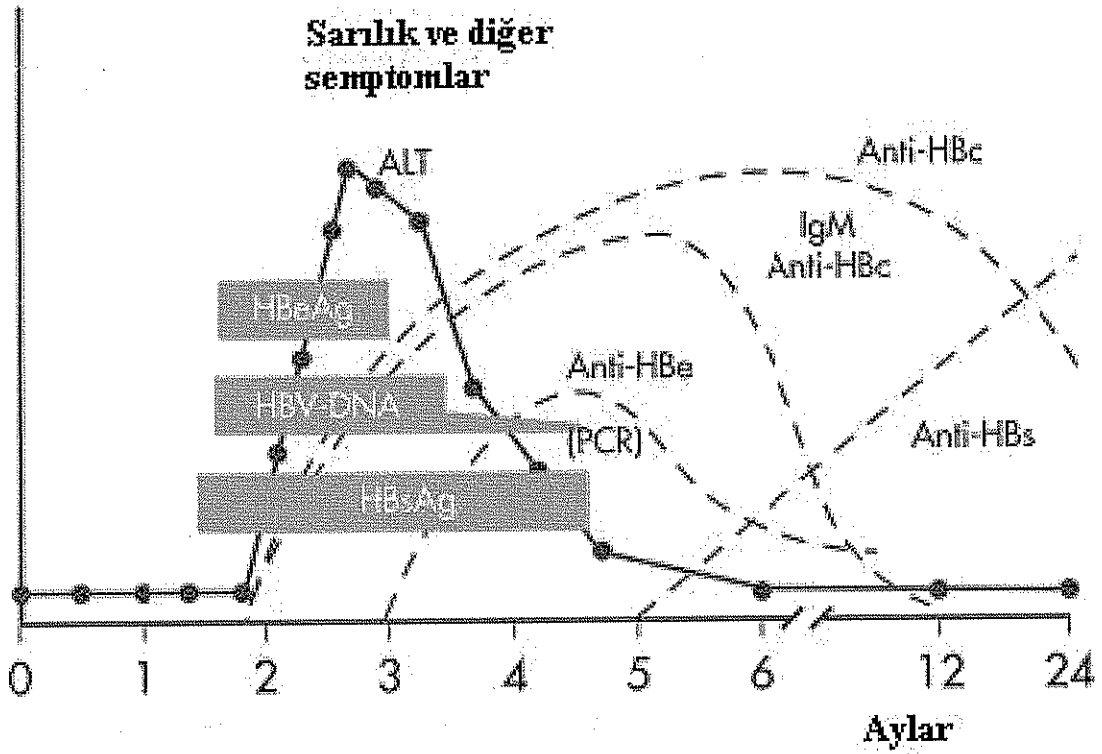
2.2.1. Serolojik Tanı Yöntemleri

HBV'nün serolojik tanısı, virüs tarafından kodlanan antijen ve bu antijenlere karşı konak savunma mekanizması tarafından oluşturulmuş antikorların saptanmasına dayanır. HBsAg'ye karşı anti-HBs, HBeAg'ye karşı anti-HBe ve serumda serbestçe dolaşmayan HBeAg'ye karşı anti-HBe saptayabildiğimiz

belirteçlerdir (52). Şekil 5' te hastalığın dönemlerine göre saptanabilen antijen ve antikorlar belirtilmektedir.

2.2.1.1. Akut Enfeksiyon

Akut HBV enfeksiyonu sırasında virusa ait ilk saptanan antijen HBsAg'dir. Hastalık semptomları ortaya çıkmadan 3-5 hafta önce serumda HBsAg saptanır düzeye ulaşmakta, seviyesi giderek yükselerek akut enfeksiyon sırasında en üst seviyeye çıkmaktadır. İyileşme ile sonlanan olgularda 2-6 ay içinde azalarak ortadan kaybolmaktadır. Kaybolduktan bir müddet sonra serumda HBsAg'ye karşı oluşan koruyucu anti-HBs antikorları ortaya çıkmakta ve genellikle hayat boyu saptanabilir bir düzeyde kalmaktadırlar. Akut dönemde anti-HBs antikorlarının daha erken oluştuğu ancak çok fazla miktarda HBsAg bulunması dolayısıyla oluşan immün komplekslerin bunları maskelediği düşünülmektedir. HBsAg'nin ortadan kaybolduğu ve henüz anti-HBs antikorlarının saptanamadığı bu döneme "pencere dönemi" ismi verilmektedir. Bu dönemde hem HBsAg hem de anti-HBs antikorları negatif olarak bulunmaktadır. Akut HBV enfeksiyonundan sonra anti-HBs antikorlarının oluşması, hastalığın iyileşme ile sonlandığını ve bağışıklık oluştuğunu göstermektedir. Kronik HBV enfeksiyonlarında ise genellikle anti-HBs antikorları saptanamamaktadır. Akut HBV enfeksiyonu dışında hepatit B aşılama sonrası da anti-HBs serumda tespit edilebilir. Hepatit B immunoglobülin verilmesi, kan transfüzyonu ve anneden bebeğe pasif olarak geçiş sonrasında da serumda anti-HBs saptanabilmektedir. Pasif olarak alınan bu antikorlar birkaç ay içinde ortadan kaybolmaktadırlar. Serumda anti-HBs seviyesinin 10 mIU/mL'nin üzerinde olması bağışıklık seviyesinin üzerinde bir antikor titresinin var olduğunu ve kişinin bağışık olduğunu gösterir. Akut HBV enfeksiyonundan sonra 6 aydan daha uzun süre serumda HBsAg pozitif olarak kalıyor ise hastalığın kronikleştiği düşünülmektedir (52).



Şekil 5: Akut HBV enfeksiyonunda tanısal belirteçler (Piccini & Nilsson: The Osler Medical Handbook, 2. edisyon'dan alınmıştır)

Akut enfeksiyon sırasında HBsAg'nin ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra serumda HBeAg ortaya çıkmakta, HBsAg ortadan kaybolmadan önce ortadan kaybolmaktadır. Serumda HBeAg'nin varlığı bulaşıcılık, enfektivite ve aktif viral replikasyon ile ilişkilidir. HBeAg'nin kaybindan kısa bir süre sonra anti-HBe antikorları ortaya çıkmaktadır. Anti-HBe antikorlarının serumda tespit edilmesi viral replikasyonun azaldığı ve hastalığın iyileşmeye doğru gittiği anlamına gelmektedir. Ancak prekor bölgesinde mutasyon sonucu oluşan mutant suşların meydana getirdiği enfeksiyon sırasında hasta serumunda anti-HBe pozitif olmasına rağmen aktif viral replikasyon ve enfeksiyon tablosu devam etmektedir. Bunun dışında oluşan bir diğer farklı durum ise serumda HBeAg pozitif olmasına rağmen viral replikasyonun göstergesi olan HBV-DNA'nın saptanamamasıdır. HBeAg'nin serumdaki varlığının 3-4 aydan uzun sürmesi kronik enfeksiyona gidişi göstermektedir. Kronik enfeksiyonda HBeAg'nin pozitifliğinin sürmesi ise ağır karaciğer hastalığı gelişme riskini artırmaktadır (52).

Serolojik tanıda kor bölgesi ile ilgili kullanılan gösterge anti-HBc antikorlarıdır. Anti-HBc antikorları serumda HBsAg tespit edildikten kısa süre sonra ve anti-HBs ortaya çıkmadan önce görülmektedirler. İlk başta anti-HBc, immunoglobülin M sınıfındadır. Anti-HBc IgM enfeksiyon başladıktan birkaç hafta sonra en üst seviyelere ulaşır, daha sonra titresini azalmaya başlar ve ortalama 6-8 ay sonra tespit edilemez hale gelir. Buna göre HBsAg pozitif olan bir olguda, anti-HBc IgM negatif bulunuyor ise o kişide akut enfeksiyon olasılığı söz konusu değildir. Anti-HBc IgM sınıfı antikorların görülmesinden kısa bir süre sonra IgG sınıfı antikorlar da ortaya çıkar ve bunlar genellikle hayat boyu tespit edilebilir düzeyde kalır. Anti-HBc IgM antikorunun en önemli özelliği, enfeksiyonun pencere döneminde tek ölçülebilir belirteç olmasıdır. Diğer önemli özelliği ise kronik enfeksiyonun akut alevlenmeleri sırasında, çok düşük bir titrede de olsa pozitifleşebilmesidir (52).

Bütün serolojik göstergeler negatif olmasına karşılık, tek başına anti-HBc IgG pozitifliği şu durumlarda saptanabilir :

- a) Hepatit B enfeksiyonu iyileşmiş ancak serum anti-HBs düzeyi saptanamayacak kadar azalmış olan kişiler.
- b) HBsAg düzeyi saptanamayacak kadar düşük olan kronik enfeksiyonlu kişiler.
- c) Uzamış pencere dönemi.
- d) Yalancı pozitiflik.
- e) Pasif olarak anti-HBc IgG kazanılması.

2.2.1.2. Kronik Enfeksiyon

Kronik enfeksiyonlu hastalarda, HBV replikasyonunun seviyesini ve enfektivite potansiyelini saptamak için serumda HBeAg ve anti-HBe düzeyleri incelenmektedir. HBeAg pozitif olan kronik hasta serumları, anti-HBe pozitif serumlara göre belirgin olarak daha fazla konsantrasyonlarda virüs içermektedirler. Yani, HBeAg pozitif hastaların cinsel ilişki yoluyla, aile içi temas yoluyla ve perinatal olarak HBV'nü bulaştırma ihtimalleri çok daha fazladır. (52).

2.2.2. Moleküler Tanı Yöntemleri

HBV enfeksiyonunun tanısında moleküler tanı yöntemleri HBV-DNA düzeyi, HBV genotipi, tedavi etkinliğinin izlenmesi, HBV mutasyonlarının saptanması ve serolojik yöntemlerle tanı koymakta zorlandığımız bazı durumların aydınlatılmasında bize yardımcı olan yöntemlerdir. Geçmişten günümüze bu konuda çeşitli araştırma yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemler başlangıçta kalitatif veriler elde etmemizi sağlamakta iken, teknolojinin gelişmesi ile birlikte kantitatif veriler de elde edilmesine olanak vermektedirler. Moleküler tanı konusundaki en önemli gelişme HBV-DNA testlerinin sensitivitesini arttıran “real time PCR” tekniğinin ortaya çıkması ve gelişmesidir. Bu yöntem sayesinde sonuçlar kantitatif olarak daha kısa zamanda verilmekte ve farklı HBV genotiplerini saptamak mümkün olmaktadır. Ancak çeşitli kantitatif test sonuçları arasında standardizasyon sorunu bulunmaktadır. Moleküler yöntemlerin en çok kullanım alanları şunlardır (52, 53):

- a) Serolojik tanının yetersiz kaldığı ve moleküler yöntemlerle HBV-DNA’sının araştırıldığı durumlar.
- b) Tedavi etkinliğinin izlenmesi.
- c) Mutant virüsün tanısı.
- d) Antiviral ilaç direncinin saptanması

a) Serolojik tanının yetersiz kaldığı ve moleküler yöntemlerle HBV-DNA’sının araştırıldığı durumlar

- HBsAg negatif HBV enfeksiyonunun tanısı
- HBeAg negatif / anti-HBe pozitif HBV enfeksiyonunun tanısı : Normalde bu durum HBeAg serokonversiyonunu düşündürmektedir. Ancak HBV’nin prekor bölgesindeki mutasyonlar sonucu oluşan mutant suşlarla meydana gelen enfeksiyon sırasında HBeAg üretimi kesintiye uğramaktadır. Anti-HBe varlığına rağmen HBV-DNA pozitif tespit edilmektedir.

- Anti-HBs pozitif HBV enfeksiyonunun tanısı

b) Tedavi etkinliğinin izlenmesi

HBV-DNA miktarının kantitatif olarak ölçülmesi, kullanılan tedavi şemasının etkili olup olmadığını anlamamıza, tedavi süresini ve dozunu belirlememize ve gerektiği durumlarda tedavi protokolünü değiştirmemize yardımcı olmaktadır.

c) Mutant virusun tanısı

HBV-DNA'nın sekans analizi ile, ilgili gen bölgelerindeki mutasyonlar saptanabilmektedir.

d) Antiviral ilaç direncinin saptanması

HBV ilaç dirençlilik testleri; tek veya çoklu mutasyonları saptayan genotipik testler veya viral genomun ilgili vektörlerle hücre içerisine konulması ve ilaç varlığında HBV'nün replikasyonunu direkt olarak ölçen fenotipik testlerdir. Duyarlı testler kullanılarak yapılan HBV direnç tayininin, HBV-DNA miktarının ve transaminaz düzeylerinin yükselmesinden daha önce belirlenebileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. İlaç direnci geliştiğinde hastalığın aktivitesinde artış kaydedildiğinden, ilaç direncinin bu aktivite görülmeden saptanması önem arz etmektedir.

2.3. Kronik Hepatit B'de Klinik Bulgular

HBV ile enfeksiyon sonrası, 6 aydan uzun süren HBsAg pozitifliği kronik hepatit B'ye işaret eder. Bu durum, karaciğerde viral replikasyonun devam ettiği, hem karaciğer hem de kanda titreleri farklı olmak kaydı ile viremi olduğu anlamına gelmektedir. Karaciğerde hepatosit ölümüne eşlik eden inflamatuvar infiltratların varlığı, kronik viral hepatit için karakteristiktir (32).

HBV enfeksiyonunun kronikleşme olasılığı, enfeksiyonun bulaşma yolu ve bulaşma yaşına göre değişkenlik gösterir. Yüksek endemik alanlarda enfekte anneden yenidoğana perinatal enfeksiyon ve erken çocukluk döneminde HBsAg pozitif aile üyelerine temas sonucu horizontal enfeksiyon HBV bulaşındaki ana yolları oluşturur (32). Enfeksiyon yenidoğan ve süt çocukluğu döneminde kazanıldığında % 95 civarında kronikleşme görülürken, bu dönemden itibaren ilk 6 yaş içerisinde kazanıldığında ise kronikleşme oranı % 30 civarına inmektedir. Erişkin dönemde enfekte olunması durumunda kronikleşme riski % 5-10 civarında görülmektedir (1, 32, 33).

Kronik viral hepatitli hastaların büyük çoğunluğu asemptomatiktir, bu nedenle de hastalar genellikle enfekte olduklarının farkında değildirler. Bazı hastalarda halsizlik, yorgunluk, bulantı, üst abdominal ağrı, kas ve eklem ağrıları gibi nonspesifik şikayetler oluşabilir. Bununla birlikte anksiyete başta olmak üzere bir

takım psikiyatrik semptomlar, endişe hali, düşüncelerini yoğunlaştırmada güçlük, kas gerginliği, uyku bozuklukları ve depresyon görülebilir. Bu bulguların hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkilediği, mental ve genel sağlık skorlarında normal insanlara göre daha düşüklüğe sebep olduğu gösterilmiştir (32).

Bazı faktörler kronik hepatit B kliniğinin ağırlığını tahmin etmek için ön belirleyici olarak kabul edilmiştir. Enfekte kişinin ileri yaşta olması, HBV genotip C ile enfekte olması, HBV-DNA düzeylerinin yüksek olması, alkol alışkanlığının olması ve HCV, HDV ya da HIV ile koenfeksiyon olması, siroza ilerleme riskinin yüksek olduğunun göstergeleridir. Hepatoselüler karsinoma ilerleyişi için risk faktörleri ise; erkek cinsiyet, ailede hepatoselüler karsinom öyküsü, ileri yaş, anti-HBe'nin HBeAg'ye geri dönme öyküsü, siroz varlığı, HBV genotip C ile enfeksiyon, kor promoter mutasyonu ve birlikte HCV enfeksiyonunun varlığı şeklinde sıralanabilir. Bazı çevresel faktörler de kişiden bağımsız olarak siroza ya da hepatoselüler karsinoma ilerleme olasılığını artırabilir. Bu çevresel faktörler aşırı alkol alımı, sigara kullanımı ve aflatoksin gibi karsinojen maddeler ile maruziyet olarak sıralanabilir (34).

Kronik hepatit B'li olgularda transaminaz düzeylerin yüksek ve viral replikasyon parametrelerinin pozitif saptanması hastalığın ilerlediğini gösterir. Bu ilerlemenin en önemli komplikasyonları siroz, hepatoselüler karsinom, portal hipertansiyon, asit, özefagus varis kanaması ve hepatorenal sendrom olarak sıralanabilir. İlerlemekte olan hastaların % 15-20'sinde 5 yıl içerisinde siroz gelişimi, sirozlu hastaların da % 20'sinde hepatosellüler karsinoma saptanır (1, 32).

Kronik hepatit B'de diğer ileri evre karaciğer hastalıklarında görülen sarılık, örümcek nevüs, splenomegali ve asit gibi bulgular da saptanabilir. İmmun kompleksler nedeniyle, ekstrahepatik organların etkilenmesine bağlı olarak poliarteritis nodoza, vaskülitik raş, glomerulonefrit ve poliartralji bulunabilir (32).

Kronik hepatit B hastalarının %1-10 kadarında yıllık spontan HBeAg / AntiHBe serokonversiyonu görülür ve genellikle karaciğer hastalığında alevlenme ile birlikte olur. HBsAg kaybı görülme olasılığı ise yıllık % 1-2 civarındadır (32).

2.4. Kronik Hepatit B Güncel Tedavisi

Kronik HBV enfeksiyonlu hastanın ilk değerlendirilmesinde detaylı bir fizik muayene yapılmalı ve hastalık öyküsü derinleştirilmelidir. Özellikle koenfeksiyon açısından risk faktörleri, alkol kullanımı, ailesel HBV enfeksiyonu ve karaciğer kanseri hikayesi sorgulanmalıdır. Karaciğer hastalığının değerlendirilmesi için karaciğer fonksiyon testleri, HBV replikasyon belirteçleri ve risk tarif edenlerde HIV, HDV ve HCV koenfeksiyonu araştırılması için gerekli testler gibi laboratuvar testleri ve üst abdomen ultrasound istenmelidir. Eğer geçirilmemiş ise hepatit A için aşı yapılmalıdır (33, 34).

Kronik hepatit B tedavisinde amaç HBV replikasyonunu baskılamak ve karaciğer hastalığının siroza, karaciğer yetmezliğine veya HCC'ye ilerlemesini, transplantasyon ihtiyacı oluşmasını engellemektir (54, 55). HBeAg pozitif veya negatif hastalarda ideal tedavi amacı HBsAg'nin kaybı ve/veya Anti HBs oluşumudur. Ancak antiviral tedavi ile HBsAg serokonversiyonu nadiren sağlanabildiğinden antiviral tedavinin gerçekçi amaçları arasında değildir. Tedavi ile HBeAg pozitif hastalarda HBeAg serokonversiyonunu ve bunun devamlılığını sağlamak amaçlanır. HBeAg negatif hastalarda ve HBeAg pozitif olup HBeAg serokonversiyonu sağlanamamış hastalarda tedavi ile HBV DNA'nın ölçülemeyecek düzeye inmesi ve bu düzeyde devamlılığın sağlanması da amaçlar arasındadır (56-58).

Antiviral tedaviye başlama kararı verilirken serum ALT düzeyi, HBV DNA düzeyi ile karaciğerin histopatolojik incelemesi önemli rol oynamaktadır. Ancak KHB tedavisinde HBeAg (+), HBV DNA seviyesi yüksek ancak ALT düzeyleri normal olan hastalara tedavi verilip verilmeyeceği gibi netleşmemiş bazı noktalar bulunmaktadır (54).

İlk değerlendirmeden sonra bazı hasta gruplarını tedavi vermeden izlemek gerekebilir. Bu hastalar; inaktif HBsAg taşıyıcıları ve HBeAg pozitif, HBV-DNA'sı 20.000 IU/mL'den fazla ve ALT düzeyi normal olan grup olarak iki şekilde sınıflandırılabilir. İki gruptaki hastalarda da hepatoselüler karsinom için tarama yapılması gereklidir (33, 34).

2.4.1. İnaktif HBsAg Taşıyıcılarında İzlem Nasıl Olmalıdır?

İnaktif HBsAg taşıyıcıları

Tanım:

1. HBsAg+ > 6 ay
2. HBeAg (-) , anti-HBe (+)
3. Serum HBV DNA < 2.000 IU/ml
4. Normal ALT/AST
5. HDV'nin negatif olması
6. İleri karaciğer hastalığını destekler kanıtların olmaması (trombosit sayısı, albumin ve protrombin zamanının normal olması, eğer yapılırsa karaciğer histolojisinin normal veya normale yakın olması)

İzlem:

Türkiye'de yaşayanlarda ALT normal değeri ile geniş çaplı çalışma sonuçları elde edilene kadar, ALT düzeyi için sınır değer olarak, çalışan yöntemin referans aralıklarının kullanılması önerilir. Kronik hepatit B'de HBV DNA düzeyi dalgalanma gösterebileceği için, HBV DNA düzeyinin tek ölçümü ile inaktif HBsAg taşıyıcısı tanısı koyulmamalıdır. Hastalar ilk yıl 3 ay arayla ALT yönünden izlenmelidir. ALT seviyesi normal devam eden olgularda ise 6-12 ayda bir ALT düzeyi ölçülmelidir. İnaktif HBsAg taşıyıcılarında HBV DNA düzeyi 6-12 ay ara ile ölçülmelidir (1, 3, 9, 10). Hepatosellüler kanser (HSK) için 6 ayda bir kez US ve AFP kontrolü ile izlem yapılmalıdır (59-61). Transaminazlarda yükselme saptanırsa HBV-DNA bakılmalıdır (59-61).

2.4.2. Kronik Hepatit B Enfeksiyonunda Kimler Tedavi Edilmelidir?

Genel olarak tedavi başlama kararı verirken normal ALT düzeyinin erkeklerde <30 IU/ml, kadında <19 IU/ml olarak kabul edilmesi önerilmektedir (54). Sağlıklı gönüllülerde AST ve ALT normal değerlerinin erkekte <30 IU/ml, kadında <19 IU/ml olduğu bildirilmiştir (54, 62, 63).

Serum ALT düzeyi tedavi adayı hastaların tanımlanması için önemlidir. Yüksek ALT düzeyi antiviral tedaviye yanıt için önemli bir göstergedir (64, 65). Ancak ALT yüksekliği ile karaciğer nekrozu arasında korelasyon yoktur. ALT yüksekliği tek başına nekroinflamatuvar aktivite veya fibrozisi göstermez (62). Vücut kitle indeksi, cinsiyet, lipit anormallikleri, yağlı karaciğer ve üremi gibi

faktörler ALT düzeyini etkileyebilmektedir (62, 63). Kendiliğinden veya antiviral tedavi ile oluşan HBeAg kaybı sırasında veya diğer viral enfeksiyonlar nedeniyle ALT düzeyi yükselebilir (66).

Kronik hepatit B hastasında evre 2 fibrozis (\geq F2) veya ciddi nekroinflamasyon varsa tedavi düşünülebilir. HBV DNA \geq 20.000 IU/ml ve ALT seviyesi normal değerın 1-2 katı yüksek olan hastalarda karaciğer biyopsisi yapılmısa bile tedavi verilmelidir (54). Klinik çalışmalarda HBV ile enfekte kişilerde ALT değeri <40-45 IU/ml olanlarda ciddi karaciğer hastalığı riski olduğu ve ALT değeri 20-30 IU/ml arasında olanlarda karaciğer komplikasyonlarına bağı mortalitenin arttığı bildirilmektedir (67, 68). Hong Kong'da 3233 KHB hastasının uzun dönem izleminde ALT seviyesi ve hastalığın ilerlemesi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (69). HBV DNA düzeyi yüksek ve ALT düzeyi normal olan kişilerde genellikle karaciğer biyopsisinde düşük miktarda fibrozis görülmekte ve antiviral tedaviye yanıt daha düşük olmaktadır. Bu nedenle bu gruptaki hastalara tedavi başlanması önerilmez (54). Normal ALT düzeyi olan hastalarda tedavi kararı verilirken hastanın serum HBV DNA düzeyi ve yaşı göz önünde bulundurulmalıdır. Devam eden normal ALT seviyelerine rağmen hastaların 1/3' ünden fazlasında özellikle hastanın yaşı >35-40 ise karaciğer biyopsisinde fibrozis veya inflamasyon saptanmaktadır (54, 70). HBV DNA düzeyi \geq 20.000 IU/ml, ALT düzeyi devamlı normal olan hastalarda ise tedavi konusu tartışmalıdır. Tedavi verilmesi gerektiğini düşünenler olmasına rağmen uzmanların birçoğu bu hastalara karaciğer biyopsisi yapılmasını ve 3-6 ayda bir takip edilmesini eğer biyopside >F2 veya ciddi nekroinflamasyon saptanırsa tedavi verilmesini önermektedirler.

2.4.2.1. Siroz Olmayan Hastalarda Tedavi

HBV DNA düzeyi 2000 IU/ml veya üstünde olan ve aşağıdaki özellikleri gösteren hastalar, kontrendikasyon olmadıkça karaciğer biyopsisi yapılarak tedavi yönünden değerlendirilmelidir (59, 71-73):

1. ALT normalin üstünde olan hastalar
2. ALT sürekli normal olan hastalardan
 - 35 yaş veya üzerinde olanlar

- İleri karaciğer hastalığı kuşkusu uyandıracak belirtileri olan hastalar (trombosit düşüklüğü, AST>ALT olması, globulin yüksekliği, albumin düşüklüğü, protrombin zamanında uzama gibi)

Biyopsisinde ISHAK skoruna göre Histolojik Aktivite indeksi (HAI;Grade) \geq 6 veya Fibrozu (stage) \geq 2 olan hastalara tedavi verilmelidir (59, 71-73). ALT seviyesi normal olan olgularda 3-6 ayda bir ALT kontrolü, 6-12 ayda bir HBeAg kontrolü yapılır (59).

2.4.2.2. Siroz Olan Hastalarda Tedavi

Dekompanse veya kompanse sirozu olan (klinik veya biyopsi yapılabilenlerde biyopside siroz ve/veya evresi 5-6/6 olanlar) hastalarda ölçülebilir HBV DNA'sı olanlara tedavi verilmelidir. Dekompanse sirozlu hastalarda biyopsi yapılmaz. Kompanse sirozlu hastalarda siroz tanısını koymaya yetecek delillerin varlığında biyopsi yapmaya gerek yoktur. (59, 72, 73).

2.4.3. Kronik Hepatit B'de Tedavi Önerileri

Kronik hepatit B tedavisinde, standart interferon alfa-2a ve 2b, pegile interferon alfa-2a ve 2b, lamivudin, adefovir, entekavir, tenofovir ve telbivudin ülkemizde mevcut olan ve kullanım onayı almış ilaçlardır (74, 75, 77). Bu ilaçların etkinlikleri randomize kontrollü çalışmalarda değerlendirilmiştir. Birebir karşılaştırılmalı çalışmalar olmasa da HBeAg (+) naif hastalarda 1 yıllık tedavi sonrası virolojik cevap (HBV DNA da negatifleşme) pegile interferon alfa, lamivudin, adefovir, entekavir, telbivudin ve tenofovir için sırası ile % 25, % 40-44, % 21, % 67, % 60 ve % 76 oranlarında bildirilmiştir. HBeAg serokonversiyonu ise pegile interferon ile % 27 vakada saptanabilirken bu oran oral antiviral kullananlarda % 16-20 oranlarında kalmaktadır. Bir yıllık tedavi sonrası HBsAg kaybı pegile interferon ile % 3 oranında olurken bu oran lamivudin kullananlarda % 1, adefovir ve telbivudin kullananlarda % 0, entekavir kullananlarda % 2 olurken tenofovir tedavisi alanlarda % 3,2 oranında bildirilmiştir (76, 78-80).

A. HBeAg pozitif hastalar

HBV-DNA düzeyi \geq 20.000 IU/ml ve HBeAg (+) olan hastalar ALT düzeylerine göre tedavi edilir. Bu grup hastalardan ALT düzeyleri yüksek olanlar tedavi için uygun adaylardır. HBV-DNA düzeyi <20.000 IU/ml ve HBeAg (+) olan

hastalar atipiktir ve nadir görülür. Bu hastaların çoğunda hastalık inaktif olacağı için tedavi başlanmaz ancak vaka bazında değerlendirme yapılması uygundur. Bu hastalarda karaciğer biyopsisi planlanmalı ve ciddi karaciğer hastalığı açısından histolojik kanıtı varsa tedavi düşünülmelidir. Tedavi edilmeyen hastalar ise ilk yıl 3 ayda bir HBV-DNA ve ALT düzeyleri açısından takip edilmeli, ölçümler uygun seyrederse takipler 6-12 ayda bir yapılmalıdır (54).

HBV-DNA düzeyi ≥ 20.000 IU/ml ve HBeAg (+) olan hastalar özellikle 35-40 yaşın üzerinde ise ve ALT düzeyi normal ise biyopsi yapılabilir. Eğer biyopsi sonucunda nekro-inflamatuvar aktivite veya fibroz saptanırsa tedavi başlanmalıdır. HBV-DNA düzeyi ≥ 20.000 IU/ml ve ALT düzeyi yüksek olan hastalarda ilk seçenek ilaçlar peg-IFN alfa-2a/2b, entekavir, veya tenofovirdir (54). Ancak serum HBV-DNA düzeyi yüksek ve/veya ALT düzeyi normal olan hastalarda IFN'a yanıt oranları düşük olduğu için bu hastalarda entekavir veya tenofovir tercih edilmelidir. Lamivudin ve ADV HBeAg (+) hastalarda ilk tedavi seçeneği olarak önerilmez.

B. HBeAg negatif hastalar

HBeAg (-) olan hastalarda serum HBV-DNA düzeyleri HBeAg (+) olan hastalardan daha düşük düzeylerde saptanmakta ve HBVDNA düzeyi ≥ 2.000 IU/ml olan hastaların tedavi edilmesi önerilmektedir (Tablo 3). HBeAg (-) hastalarda tedavide ilk tercih edilecek ilaçlar peg-IFN alfa-2a/2b, entekavir ve tenofovirdir. Bu grup hastalarda uzun süreli tedavi gerektiği için yüksek direnç gelişimi nedeniyle lamivudin önerilmez (83). Tenofovir adefovire göre daha üstündür ve tedavide adefovir yerine tenofovir tercih edilir (Şekil 6) (34, 54, 55, 82, 83). HBeAg (-) hastalarda HBeAg serokonversiyonu olmadığı için tedavinin son noktasını saptamak HBeAg (+) hastalara göre daha zordur. Tedaviye yanıtın pratik göstergeleri HBV-DNA baskılanması ve ALT normalleşmesidir.

2.5. Kronik Hepatit B Tedavisinde Nükleozid Analogları

Nükleozid analogları selüler DNA polimerazlara bağlanmak için doğal substratlar ile yarışan, bu yolla yeni yapılmakta olan DNA'ya bağlanma sonucunda DNA zincir sentezini durdurup viral replikasyonu önleyen bileşiklerdir. Nükleozid analoglarının çoğu sitoplazmada bulunan enzimler tarafından nükleozid 5'-trifosfatlara fosforillenir; ardından viral polimerazlar ile etkileşir. Kronik hepatit B

tedavisinde ilk denenen DNA polimeraz inhibitörleri adenin arabinosid ve aköz monofosfat türevidir. Her ikisi de sınırlı etkileri ve nöromusküler toksisiteleri nedeniyle tedavide fazla kullanılmamışlardır. FDA tarafından kronik hepatit B tedavisinde onay verilen nükleozid analogları 1998'de lamivudin, 2002'de adefovir dipivoksil ve Mart 2005'te entekavir olmak üzere 3 tanedir. Bu ajanlar güvenilirlik ve oral kullanılabilme avantajına sahiptirler. Ancak tedavi kesildikten sonra hastaların az bir kısmında kalıcı cevap oluşur. Bu nedenle hastaların büyük bir bölümünde uzun süre kullanılmaktadırlar. Uzun süreli kullanım ise ilaca dirençli HBV mutantlarının sıklığında artışa ve ilacın etkinliğinin sınırlanmasına sebep olmaktadır (84, 85).

1. Lamivudin

Lamivudin, 2'-3' dideoksi 3'-tiyasitidin'in negatif enantiomeri olan bir nükleozid analogudur. Hücre içerisinde enzimatik yolla kendisine eklenen aktif trifosfat sayesinde DNA zinciri içerisine girmesi sonucunda, olgunlaşmamış zincir sonlanmasına sebep olarak HBV DNA sentezini inhibe eder (34, 86-89).

Lamivudin monoterapisi, karaciğer hastalarının iyileştirilmesinde ve HBV replikasyonunun baskılanmasında etkilidir. Bir yıllık lamivudin tedavisinden sonraki HBeAg serokonversiyonu 16 haftalık standart interferon alfa tedavisinin sonuçlarına benzer, 1 yıllık pegile interferon alfa tedavisi kadar üstün bulunmamıştır (34). HBeAg pozitif, kalıcı veya aralıklı transaminaz yüksekliği olan kronik hepatit B'li hastalar ile yapılan 731 çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, 1 yıl boyunca lamivudin alan hastalardaki HBeAg serokonversiyonu oranı % 16-18 arasında olup bu oran tedavisiz kontrollere göre 3-4 kat daha fazladır. Histoloji yanıt açısından 2 puan ve üzeri nekroinflamasyon düzelmesi yanıt kriteri olarak alındığında; kontrol grubunda % 23-25 civarında, tedavi alan hastalarda ise % 49-56 arasında histolojik yanıt rapor edilmektedir. HBeAg serokonversiyonu oranı tedavi süresiyle doğru orantılı olarak artar ve 5 yılda % 50'ler civarına yükselir. 358 hasta ile yapılan bir çalışmada, HBeAg serokonversiyonu oranını arttıracı faktörler arasında tedaviye interferon eklenmesi gösterilmiş, tedavi öncesi transaminaz düzeyinin HBeAg serokonversiyonu açısından güçlü bir prediktif ölçü olduğu görülmüştür. Yaş, cinsiyet, tedavi öncesi beden-kitle indeksi ve tedavi öncesi histolojik aktivite

indeksi ile HBeAg serokonversiyonu arasında bir etkileşim görülmemiştir (34, 84, 85, 90).

Transaminaz düzeyi normalden 1-2 kat yüksek olan hastalarda 1 yıllık tedavi ile HBeAg serokonversiyonu oranı % 10'dan az olup, 3 yıllık tedavi sonunda % 19'a kadar yükselebilmektedir. Dünyanın değişik yerlerinde yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar bulunmuştur (34). HBeAg negatif kronik hepatit B'de lamivudin tedavisinin süresi konusunda kesin bir fikir birliği yoktur. Son zamanlardaki çalışmalar 1 yıllık tedavi sonunda serum HBV-DNA baskılanması oranının % 60-70 civarında olduğunu rapor etmektedirler. Bununla beraber tedavi sonlandırıldıktan sonra hastaların % 90 gibi büyük bir bölümünde relaps olduğu görülmektedir. Öneriler HBV-DNA negatifleşmesinden sonra en az 6 ay daha tedavinin sürdürülmesi yönündedir (34). Bunun dışında lamivudin, interferon alfa tedavisine cevapsız hastalarda, kompanse sirozlu ve dekompanse sirozlu hastalarda da güvenle kullanılabilir (34).

Lamivudinin kronik hepatit B tedavisinde önerilen günlük dozu 100 mg/gün'dür. Kreatinin klirensine göre doz ayarlaması yapılabilir. Buna göre kreatinin klirensi 50 ml/dk seviyesine kadar 100 mg/gün verilebilir. Eğer kreatinin klirensi 30-49 ml/dk arasında ise ilk doz 100 mg/gün olmak üzere 50 mg/gün, 15-29 ml/dk arasında ise ilk doz 35 mg/gün olmak üzere 25 mg/gün, 5-14 ml/dk arasında ise ilk doz 35 mg/gün olmak üzere 15 mg/gün, 5 ml/dk'nın altında ise yine ilk doz 35 mg/gün olmak üzere 10 mg/gün olarak verilebilir (34). Lamivudin genellikle çok iyi tolere edilen bir ajandır. Yapılan çalışmalarda ilacın kesilmesini gerektiren bir yan etkiye rastlanmamış olup sadece ilaca alerjik reaksiyon gelişen kişilerde tedaviye devam edilmemesi önerilmektedir (34).

Kronik hepatit B tedavisinde, lamivudin kullanımını sınırlandıran en önemli özellik ise, kullanım süresi ile doğru orantılı olarak artan ilaca karşı direnç gelişimidir. HBV polimerazının primer katalitik bölgesi olan revers transkriptazın C domainindeki YMDD motifinde meydana gelen bir mutasyon sonucunda revers transkriptaz lamivudini DNA zincirine eklemeyecek özellik kazanır. Bu sayede de HBV replikasyonu ilaca rağmen devam eder. İlaça direnç gelişiminin en tehlikeli sonucu hastalığın aktivasyonu ile biyokimyasal, viral ve histolojik olarak bir kötüye gidiş meydana gelmesidir. Bu durum, mevcut hastalığı tedavi öncesi döneme geri

döndürebileceği gibi daha kötü bir seviyeye de götürebilir (74, 89, 91, 92). Lamivudin tedavisinin başlanmasından itibaren 6 ay sonra mutant tipler görülmeye başlar ve tedavi süresi arttıkça mutasyon oranları artarak devam eder. Bundan önceki çalışmalarda 1. yıl % 12-15 kadar olan lamivudin direnç oranının, 2. yılda % 35-45, 3.yılda % 45-50, 4. yılda % 50-60 ve 5. yılda % 60-70 civarlarına yükselecek şekilde tedavi süresi ile ilişkili olarak arttığı rapor edilmiştir (72-80). Direnç gelişen hastalarda hepatit kliniği yeniden ortaya çıkar. Lamivudin tedavisi sırasında meydana gelen transaminaz düzeylerinde ani yükselme, karaciğer fonksiyonlarında bozulma, HBV-DNA'nın serumda tekrar ölçülebilir hale gelmesi ve karaciğer histolojisinde kötüleşme gibi ciddi problemlerin lamivudin direnci ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Direnç ortaya çıktıktan sonra meydana gelen ani transaminaz yükselmesi ve karaciğer fonksiyonlarının bozulmasına "biyokimyasal breakthrough", HBV-DNA'nın tekrar serumda ölçülebilir hale gelmesine ise "viral breakthrough" denmektedir (80, 94-97). 24 ay lamivudin tedavisi alan 61 tane HBeAg pozitif hasta ile yapılan bir çalışmanın sonunda, tedavi sonrası relaps ve kalıcı cevabın belirlenmesindeki ön belirleyici faktörler genç yaş, lamivudin tedavi süresinin uzunluğu, erken HBeAg serokonversiyonu zamanı ve prekor mutasyonunun varlığı olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada viral breakthrough oluşmasına sebep olan tek etkenin ileri yaş olduğu görülmüş, cinsiyet, tedavi öncesi ALT ve HBV-DNA düzeyleri, HBeAg serokonversiyonu zamanı ve tedavi öncesi histolojik aktivite indeksinin bir etkisi olmadığı saptanmıştır (98). Lamivudin tedavisi almayan hastalarda da bazen YMDD motif mutasyonu olduğunun görülmesi sonrasında yapılan bir çalışmada, HBeAg prekor mutasyonu meydana gelmiş olan hastalarda YMDD motif mutasyonu ile HBeAg prekor mutasyonu arasında bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir (99). Benzer şekilde uzun dönem lamivudin monoterapisi alan hastalarda 52 haftalık tedavi sonrası hastaların %16-32'sinde HBV DNA polimeraz geni YMDD motifinde viral mutasyon geliştiği bildirilmiştir. Bu mutasyonların sıklığının sonra gelen her yıl için yaklaşık olarak %15 arttığı ve tedavinin 4. yılında %67'ye ulaştığı gösterilmiştir (101). 5 yıllık lamivudin tedavisi sonrası hastaların %70'inde YMDD mutasyonu görülmüştür (102). Lamivudin direnci gelişmesi ile ilgili risk faktörleri aşağıda özetlenmiştir: (100).

1. Başlangıçta yüksek HBV-DNA düzeyi olması
2. Vücut kitle indeksinin fazla olması
3. Daha önce famsiklovir almış olmak
4. Başlangıç virolojik yanıtın yetersiz olması

Yapılan çeşitli çalışmalarda lamivudin tedavisi sırasında HBV polimerazın YMDD motifinde mutasyon saptandıktan sonra klinik kötüleşme olduğu, transaminaz ve HBVDNA düzeylerinin yükseldiği, karaciğer histolojisinin de uyumlu olarak kötüleştiği rapor edilmiştir. (100).

2. Adefovir dipivoksil

Antiretroviral, revers transkriptaz inhibitörü olan adefovir dipivoksilin ön maddesi olan adefovirin, adenosin monofosfatın fosfanat nükleotid analogudur. Oral alımdan sonra bağırsaklarda hızla aktif metabolit olan adefovire çevirilir. Plazma yarılanma ömrü 7,5 saat olup böbrek yetersizliğinde uzar. Atılımı idrar yolu ile olur. Esasında HIV tedavisi için kullanıldığı dozlarda nefrotoksiktir, ancak kronik hepatit B tedavisinde düşük dozda kullanıldığından dolayı bu yan etkisi az görülür (34). Adefovir, lamivudin ve entekavire dirençli suşlara da etkilidir. Etkinliği lamivudine göre daha azdır, ancak direnç gelişme oranı lamivudine göre oldukça az bildirilmektedir. 1, 2, 3, 4 ve 5 yıllık tedavi sonrası direnç oranları sırasıyla; % 0, % 3, % 11, % 18 ve % 29 olarak bildirilmiştir. HBV polimerazının D domaininin 236. kodonunda meydana gelen N236T ve B domaininin 181. Kodonunda meydana gelen A181V mutasyonları adefovir dipivoksil direnci ile ilişkilendirilmektedir. (34, 84).

Adefovir dipivoksilin erişkin dozu 10 mg/gün'dür. Pediyatrik emniyetli dozu bilinmemektedir. Karaciğer yetersizliğinde doz ayarlanması gerekmez. Böbrek hastalığında ise kreatin klirensi 50 ml/dk altına indiğinde doz ayarlanması gerekir. Kreatinin klerensi; 20-49 ml/dk arasında iken gün aşırı 10 mg/gün, 10-19 ml/dk arasında iken 3 günde bir 10 mg/gün, hemodializ hastalarında ise hemodializden sonra haftada bir 10 mg/gün önerilmektedir (34, 84).

Adefovir dipivoksil özellikle obez kadınlarda tedavinin uzun sürmesine bağlı olarak hepatotoksisiteye neden olabilir. Bu durumlarda tedavinin kesilmesi gerekir. Nefrotoksisite riski nedeni ile düzenli aralıklar ile böbrek fonksiyonları değerlendirilmelidir (34, 84).

3. Entekavir

Entekavir, 2'- deoksiguanozinin karboksilik analogudur. Adefovir ve lamivudinden farklı olarak HBV polimerazına spesifiktir, HIV ve diğer DNA virüslerine etkili değildir. HBV replikasyonunu; pregenomik RNA'dan negatif HBV-DNA ipliğinin revers transkripsiyonunu, DNA polimerazın hazırlık safhasını ve pozitif HBV-DNA zincirinin sentezini engelleyerek 3 farklı yol ile inhibe eder. İn vitro çalışmalarda entekavirin lamivudin ve adefovirden daha etkin olduğu gösterilmiştir. Vahşi tip HBV'na kıyasla lamivudine dirençli suşlarda etkinliği daha azdır ve direnç geliştirme riski yüksek olduğundan bu suşlarda daha yüksek doz kullanılması gerekir (34, 84).

Entekavir genellikle iyi tolere edilir. Yemekler emilimini azaltır. Önerilen günlük dozu 0,5 mg/gün'dür. Kreatin klirensi 50 ml/dk'nın altında olan hastalarda doz ayarlanması gerekir. Yan etki profili ve güvenlik açısından lamivudine benzerdir (34, 84).

4. Telbivudin (L-deoksitimidin)

HBV'na karşı etkin antiviral aktiviteye sahip bir nükleozid analogudur. Klinik çalışmalar HBV replikasyonunun baskılanmasında lamivudine göre daha etkili olduğunu göstermektedir. Bununla beraber telbivudine karşı direnç gelişme riski yüksektir ve telbivudine dirence neden olan mutasyonlar, lamivudin ile çapraz direnç gösterir. Bu yüzden kronik hepatit B tedavisinde kullanımı kısıtlıdır. Önerilen günlük dozu, 600mg/gün 'dür. Kreatin klirensi 50 ml/dk'nın altında olan hastalarda doz ayarlanması gerektirir. Güvenlik profili lamivudine benzerdir ve iyi tolere edilir (34).

5. Tenofovir Disoproksil Fumarat

Öncelikle HIV/AIDS ve HIV/HBV koenfekte hastalarda kullanıma giren tenofovir, yapılan çalışmalarda hem vahşi hem de lamivudin dirençli kökenlere karşı etkili olduğunun saptanması üzerine 2008 yılında A.B.D ve ülkemizde kronik hepatit B'nin tedavisinde ruhsat alarak kullanıma girmiştir. İki bin dokuz yılında yine HIV/AIDS tedavisinde kullanılan ve içinde tenofovirin yer aldığı bir kombine ilaç olan tenofovir+emtrisitabin (Truvada)'in aynı alanda ruhsat alarak kullanıma girmesi planlanmaktadır (34). Tenofovir ile ilgili ilk klinik deneyimler, HIV/HBV koenfekte hastalar ile lamivudin dirençli HBV hastalarındadır. HBV ile enfekte hastaların 206

haftalık izlemlerinde, HBV-DNA'yı 4.8 ile 9.5 log₁₀ kopya/ml düzeyinde düşürdüğüünün saptanması üzerine bu antiviral ile ilgili çalışmalar genişletilmiştir (34, 84). Tenofovir, adefovir gibi bir asiklik nükleotit analogudur ancak daha az nefrotoksik olması sayesinde günde 300 mg kullanılabilmesi, daha güçlü bir antiviral olarak kullanımına imkan sağlamıştır. Kırk sekiz haftalık tenofovir veya adefovir tedavisi sonunda HBV-DNA düzeyinin <10⁵ kopya/ml olması yönünden iki ilaç karşılaştırıldığında, tenofovirin adefovirden daha üstün olduğu saptanmıştır (%100'e karşı %44). Nükleozit analoglarına karşı çapraz direnç göstermemesi avantajının yanında DNA polimerazdaki mutasyonlara karşı yüksek genetik bariyere sahip olması, direnç açısından daha az sorun yaşanacağını düşündürmektedir.

HBV/HIV koenfekte iki hastada tenofovire DNA polimerazın B domaininde rtA194T direnci saptanmıştır (54, 84, 85). Ancak bu mutasyonun, tenofovirin etkinliğini azaltıcı yönde bir etkisinin olup olmadığı net olarak belirlenmemiştir. Lamivudin dirençli mutantların (rtM204I/V, rtL180M ve rtL173M) tenofovire duyarlı oldukları yani çapraz direnç olmadığı bilinmektedir. Adefovir direncinden sorumlu mutasyonlardan ise rtA181V/T direncinden tenofovir etkilenmezken, rtN236T direnci varlığında ise tenofovire duyarlılık azalması bildirilmektedir. Ancak günümüzde klinik olarak tenofovir direncinden bahsedilmemektedir.

Kronik hepatit B tedavisinde kullanılması beklenen diğer ajanlar ise; emtrisitabin, klevudin ve timosindir. Bu ajanlar ile ilgili klinik ve hayvan çalışmaları devam etmektedir (34,84). Günümüz kronik hepatit B tedavisinin en önemli sorunu nükleozid analoglarına karşı direnç gelişimidir. Bir nükleozid analoguna direnç geliştiğinde başlanacak başka bir nükleozid analoguna direnç gelişme riski yükselmektedir.

2.6. Tedavi Yanıtının Takibi ve Direnç Yönetimi

KHB tedavisinde direnç tanımları Tablo 2' de verilmiştir (33). İlaç direnci olan hastalarda uygun tedavi yaklaşımı belirlenirken bu tedavilerin gelecekte direnç gelişim riskini artırmayacak şekilde düzenlenmesi önemlidir (54,55). Günümüzde Peg-IFN ile direnç gelişimi bildirilmemiştir (82). Ancak oral nükleotid veya nükleozid ajanlarla uzun süreli tedavi antiviral direnç gelişimi ile ilişkilidir (103).

Tablo 2: Nükleozid/Nükleotid analogları için antiviral direnç tanımları

- **Virolojik Breakthrough:** Tedavi sırasında virolojik yanıt alındıktan sonra serum HBV DNA seviyelerinde 1 log₁₀ IU/ml'den daha fazla artış olması
- **Viral Rebound:** Tedavi sırasında virolojik yanıt alındıktan sonra serum HBV DNA seviyelerinin >20.000 IU/ml veya tedavi öncesi dönemin üzerine çıkması
- **Biyokimyasal Breakthrough:** Tedavi sırasında ALT normalizasyonu sağladıktan sonra ALT düzeylerinin normalin üst sınırından daha yüksek seviyelere ulaşması
- **Genotipik Direnç:** Kullanılan ilaca karşı in vitro direnç mutasyonlarının saptanması
- **Fenotipik Direnç:** Kullanılan ilaca karşı in vitro azalmış duyarlılığın saptanması (inhibitör konsantrasyonda artış)

Antiviral direnç gelişimi; tedavi öncesi HBV-DNA düzeyi, antiviral ajanın etkinliği, önceden nükleotid veya nükleozid tedavisi almış olması, tedavinin suresi ve kullanılan ilacın genetik bariyer derecesi gibi birçok faktöre bağlıdır. Uzun süreli kullanımda en yüksek direnç lamivudinde (4-5 yılda %65-70), orta düzeyde direnç telbivudinde (2 yıl tedavi ile HBeAg pozitif hastalarda %25 ve HBeAg negatif hastalarda %11), daha düşük direnç adefovirde (5 yılda %29) ve en düşük direnç entekavirde (eğer öncesinde lamivudin direnci yoksa 5 yılda %1.2) ve tenofovirde (naif hastalarda 2 yılda %0) görülmektedir. Tenofovir ile henüz direnç bildirilmemiştir (54, 104, 105). Lamivudin dirençli hastalarda ise 5 yıllık entekavir tedavisinden sonra % 51 oranında yeni mutasyonlar gelişmektedir (54). Direnç gelişimi, başlangıçta oluşan yanıtın kaybı ve HBV-DNA'nın yeniden artması ile ilişkilidir. Bunu biyokimyasal breakthrough ve histolojik iyileşmenin geriye dönüşü izler. Bazı vakalarda ilerleyici karaciğer hastalığı ve ciddi alevlenmeler oluşabilir. Bu nedenle nükleozid naif hastalarda düşük genotipik direnç oluşturan ve etkili nükleotid veya nükleozid analogu ilaçlardan birini kullanmak en doğru yaklaşım olacaktır (54). Direnç gelişen hastalarda tercih edilecek tedavi yaklaşımları Şekil 6'da belirtilmiştir (34, 54, 106).

Direnç	EASLI	AAŞLD ²	ABD Algoritması
Lamivudin	Tenofovir ekle	Adefovir veya tenofovir ekle; lamivudini kes ve tenofovir+ emtrisitabin kombinasyonuna geç; lamivudini kes ve entekavire geç (lamivudin direnci olması entekavir direncini artırır)	Lamivudine devam et, adefovir veya tenofovir ekle; tenofovir + emtrisitabine geç
Adefovir	Tenofovire geç ve uygunsuzsa çapraz direnç olmayan ikinci bir ilaç ekle; N236T direnci varsa lamivudin, veya entekavir veya telbivudin ekle yada tedaviyi tenofovir + emtricitabine kombinasyonuna değiştir	Lamivudin ekle; adefoviri kes, tenofovir + emtrisitabine geç; entekavire geç veya ekle	Adefovire devam et, lamivudin veya telbivudin ekle; entekavire geç veya ekle (eğer öncesinde lamivudin direnci yoksa)
Entekavir	Tenofovir ekle	Adefovire veya tenofovire geç veya ekle	Adefovire veya tenofovire geç veya ekle

Şekil 6: Oral antivirallere dirençli hastalarda tedavi yaklaşımı

2.7. Tedavi Süresi

HBeAg (+) hastalarda: HBeAg (+) hastalarda antiviral tedavinin HBV-DNA düzeyi PCR ile ölçülemeyecek düzeylere inene ve HBeAg serokonversiyonu oluşana kadar verilmesi; sonrasında ise tedaviye 12 ay devam edilmesi önerilmektedir. HBeAg serokonversiyonu olan ancak HBV-DNA ölçülebilir düzeyde olup aynı seviyede sebat eden hastalarda tedaviye 6 ay daha devam edilmesi önerilir sonrasında hasta siroz değilse tedavinin kesilebilir. HBeAg (+) hastalar, HBeAg kaybolmazsa uzun süre tedavi edilmelidir çünkü bu hastalarda tedavinin ilerleyen zamanlarında HBeAg serokonversiyonu sağlanabilmektedir. Ayrıca bu hastalarda HBeAg serokonversiyonu olmadan tedavi kesilirse vireminin tekrarlama riski yüksektir. Relaps gelişen hastalarda tekrar tedavi verilebilir (54).

HBeAg (-) hastalarda: Tedavi başlanan HBeAg (-) hastalarda 6 ayda bir takip önerilir. Peg-IFN'la virolojik yanıtın devamlılığı açısından uzun süreli tedavi

(12 ay), kısa süreli tedaviye (4-6 ay) göre daha yararlıdır. Entekavir ve tenofovir ile uzun süreli tedavi gerekir ancak kalıcı virolojik yanıtı sağlamak için yeterli süre hakkında kesin bir bilgi yoktur (54). HBeAg (-) hastalarda tedavinin güvenli bir biçimde sona erdirilme zamanı tam olarak belirlenmemektedir. Peg-İFN tedavisi ile serum HBsAg konsantrasyonu azalırsa kalıcı virolojik yanıtın oluşma olasılığı yüksektir. HBeAg negatif KHB'li hastalarda serum HBV-DNA negatifliği uzun süre devam etse bile relapslar sık görülür (54, 82, 105, 107). Bu hastalarda saptanamayan HBV DNA düzeylerine ulaşıldıktan sonra oral antivirallerle (LAM ve ADV hariç) uzun süreli tedavi verildiğinde relaps gelişme oranı daha düşüktür (105, 107). Bu hastalarda uygun tedavi süresi halen bilinmemektedir bu konuda yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Tablo 3: Kronik Hepatit B algoritması (2011 UpToDate)

Hbe Ag	ALT	HBV DNA	ÖNERİLER
+	≤ 2 x NÜS	>20.000 IU/mL	Güncel tedavi etkisi düşüktür. İzle, ALT düzeyi yükseldiğinde tedavi için değerlendir. Karaciğer hastalığının aile öyküsü var veya kişi 40 yaşın üstünde ve kalıcı 1-2 kat yüksek ALT düzeyleri var ise karaciğer biyopsisi için değerlendir. Biyopsi belirgin fibroz veya orta/şiddetli inflamasyon gösteriyor ise tedavi için değerlendir.
+	> 2 x NÜS	>20.000 IU/mL	3-6 ay izle, spontan HBeAg kaybı yok ise tedavi başla. Kompanse ise tedaviden önce karaciğer biyopsisi için değerlendir. Klinik dekompanseasyon veya sarılık var ise acil tedavi başla. Başlangıç tedavisi için IFNα/peg IFNα, lamivudin, adefovir, entekavir veya telbivudin kullanılabilir (ilaç rezistans oranının yüksekliği nedeniyle lamivudin ve telbivudin tercih edilmez). Tedavinin son noktası HBeAg serokonversiyonudur. Tedavi süresi IFNα için 16 hafta,peg IFNα için 48 hafta, lamivudin, adefovir ,entekavir ve telbivudin için en az 1 yıl önerilmektedir (HBeAg serokonversiyonundan sonra 6 ay devam edilmelidir). IFNα'ya cevapsız veya kontrendike ise adefovir veya entekavir ile IFNα değiştirilebilir
-	> 2 x NÜS	>20.000 IU/mL	Başlangıç tedavisi için IFNα/peg IFNα, lamivudin, adefovir, entekavir veya telbivudin kullanılabilir (ilaç rezistans oranının yüksekliği nedeniyle lamivudin ve telbivudin tercih edilmez). Tedavi son noktası belirsizdir. Tedavi süresi IFNα/peg IFNα için 1 yıl, lamivudin, adefovir ,entekavir ve telbivudin için 1 yıldan fazla önerilmektedir. IFNα'ya cevapsız veya kontrendike ise adefovir veya entekavir ile IFNα değiştirilebilir.
-	> 1-2 x NÜS	>2.000 IU/mL	Karaciğer biyopsisi için değerlendir, biyopsi belirgin fibroz veya orta/şiddetli inflamasyon gösteriyor ise tedavi için değerlendir.
-	≤ NÜS	≤2.000 IU/mL	HBV-DNA veya ALT yükselirse tedavi et.
+/-	saptanabilir	Siroz	Kompanse: HBV-DNA > 2.000 IU/mL ise lamivudin, adefovir, entekavir veya telbivudin ile tedaviye başlanabilir (ilaç rezistans oranının yüksekliği nedeniyle lamivudin ve telbivudin tercih edilmez). HBV-DNA < 2.000 IU/mL ise ALT yükselince tedavi için değerlendir. Dekompanse: Lamivudin + adefovir veya entekavir
+/-	saptanamaz	siroz	Kompanse ise izle. Dekompanse ise karaciğer transplantasyonu için sevk et.

2.8 Multi-Drug Rezistans Gen Polimorfizmi

İlaç direncini açıklayan birçok hücrenel mekanizma tanımlanmıştır. Bu mekanizmalar, insan multi-drug rezistans ilişkili protein (MRP) tarafından ilaçların artan atılımı, ilaç hedeflerindeki değişimleri ve bileşiklerin artan detoksifikasyonunu içermektedir. MDR ürünü olan P-gp artmış salınımı bir MDR fenotipini oluşturur. Homozigot MDR fenotipini gösteren hücrelerde, bazı proteinlerin salınmasında artış olduğu bulunmuştur. Bunlardan biri; MDR-1 gen ürünü olan P-gp hücre membranında transmembranal olarak yerleşmiş olup substratlarının hücre dışına taşınmasını sağlayan ATP bağımlı bir taşıyıcı protein olarak görev yapar (9). P-gp oral ve intravenöz yoldan alınan ilaçların biyoyararlanımını azaltan faktörlerden biridir. İlaçların emilimini azaltabildiği gibi ilaçları dolaşımdan alarak safra ve intestinal lümene hepatositler ve enterositler yolu ile atmaktadır. Bundan dolayı, P-gp aktivitesini etkileyen ilaçlar birlikte uygulandıklarında bu ilaçların biyoyararlanımlarının değişebileceği düşünülmelidir (9).

MDR gen ailesi, ATP-bağlayan-kaset (ATP-bindingcassette=ABC) taşıyıcılar süper ailesinin bir alt üyesidir. ABC taşıyıcıları, ATP bağımlı transport görevini üstlenir. Toksik bileşiklerin atılması, besinlerin alınması, iyon ve peptitlerin taşınması ve hücre sinyal iletiminde görev alırlar (108).

MDR cDNA'nın klonlanması ile yapılan çalışmalar, insanda 2 küçük gen ailesi tarafından kodlandığını ortaya koymuştur. MDR1 ilaç transportunda görevli glikoproteinleri kodlayan genlerken, MDR2 ve MDR3 ilaç transportunda rol almayan glikoproteinleri kodlayan genleri içerir. P-gp'i kodlayan genler, 7. kromozomun 21q1 bandında yer alır. Memeli P-gp'i tek zincirli bir proteindir. Yaklaşık 1280 aminoasitten oluşur. Ağırlığı yaklaşık 141.462 daltondur. P-glikoprotein yapımının artması, hücre içi ilaç konsantrasyonunun azalması ile sonuçlanabilir (109).

MDR1 geninde gösterilmiş olan tekli nükleotid polimorfizmlerinden C3435T (ekson 26) ve G2677T (ekson 21) polimorfizmlerinin P-gp ekspresyon miktarında ve/veya fonksiyonunda değişimlere neden olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (10).

P-gp ekspresyonunu P-glikoprotein polimorfizmi etkilemektedir ve en sık ekson 26 C3435T polimorfizmine rastlanmaktadır. P-gp ekspresyonunun yüksek

olduğu durumlarda ilaçlara ve bazı maddelere karşı oluşan dirençten sorumlu olduğu düşünülmektedir (110). P-gp bu fonksiyonunu, membran permeabilite regülasyonu ile değil, hücre içinden dışına doğru ATP bağımlı pompa görevi yaparak sağlamaktadır (111).

P-gp'nin fosforilasyonu, ilaçların hücre dışına atılım mekanizmalarını regüle eder. P-gp eksprese eden hücreler, bir konsantrasyon gradiyentine karşı ilaç atabilir. P-gp aracılı ilaç transportu, membran potansiyelindeki elektriksel değişikliklerden etkilenmez ve bir proton gradiyentinden ve/veya membran boyunca proton hareketinden bağımsızdır (109).

Ekspresyon çalışmalarının yanında, ekspresyon seviyelerini etkileyen faktörlerin başında gelen polimorfizm çalışmaları da eş zamanlı olarak hız kazanmıştır. Günümüze kadar pek çok yayında MDR1 geninde en sık rastlanılan polimorfizmlerden C3435T ve G2677AT'nin MDR1 ekspresyonunu etkilediği bildirilmiştir. Bu çalışmaların aynı zamanda etnik çeşitlilik gösterdiği ve farklı ırklardaki polimorfizmlerin etkilerinde değişiklik olduğu gözlenmiştir (112).

P-gp'nin normal dokulardaki ekspresyonu hücreleri toksik maddelerden korumaktadır. P-gp insanda böbreküstü bezlerinde yüksek oranda eksprese olurken, solunum epiteli, mide, kolon, pankreas, plasenta ve prostatta orta seviyede, beyin, kemik iliği, özofagus, kalp, düz kas, timus ve deride ise düşük seviyede eksprese olmaktadır (113). Özellikle ince bağırsak, santral sinir sistemi, karaciğer ve böbrek gibi ilaç emilimi, dağılımı ve atılımında rol oynayan dokularda yüksek oranda eksprese edilmesi P-gp'in substratı olan ilaçların farmakokinetiğinde ve toksikokinetiğinde kritik bir rol oynayabilme özelliği kazandırmaktadır. Aralarında çeşitli antineoplastikler, HIV proteaz inhibitörleri, immüsupresanlar, kardiyovasküler sistem ilaçları ve antimikrobiyal ilaçlar gibi klinik pratikte sıkça kullanılan ilaçların da bulunduğu birçok ilaç molekülü P-gp substratı olma özelliği göstermektedir. Günlük aldığımız gıdaların bileşenleri ve çevresel olarak maruz kaldığımız ksenobiyotiklerde P-gp substratı, aktivatörü ya da inhibitörü olabilmektedir. Bu bileşikler, P-gp'in dokulardaki aktivitesinde değişikliğe yol açabilmekte ve substratı olan ilaç ya da bileşenlerin farmakokinetik ve toksikokinetik parametrelerinde klinik açıdan önemli sonuçlara yol açabilecek değişiklikler (tedavi edici etkinliklerinde azalma veya toksik etkilerinde artış) meydana

getirebilmektedirler (114, 115). P-gp'nin dokulardaki lokalizasyonu ve fonksiyonları Tablo 4' te gösterilmiştir (116).

Tablo 4: P-gp'in dokulardaki hücrel lokalizasyonu ve fonksiyonları

Doku	Lokalizasyon	Fonksiyon
İnce barsak ve kolon	Epitel hücreleri apikal membran	İlaçların barsak içine sekresyonu
Karaciğer	Hepatosit kanaliküler membran	İlaçların safra içine sekresyonu
Böbrek	Proksimal tübül epitelial hücrelerinin apikal membranı	İlaçların tübül lümenine sekresyonu
Testis	Kapiller kan damarlarının endotelial hücreleri	Kan-testis bariyeri
Plasenta	Trofoblast	Ksenobiotiklerden Fetüsü korumak
SSS	Kan-beyin bariyerini oluşturan endotel hücrelerin luminal membranı	Ksenobiotiklerden SSS'i korumak

P-gp, substrat spesifitesi yüksek olan bir proteindir, diğer bir deyişle, birbirinden fiziksel ve kimyasal yönden çok farklı ilaçlar P-gp ile taşınabilmektedir. P-gp substratları farmakolojik etki kalıbına göre gruplandırılabilir (114).

P-gp inhibitörü ilaçlar, P-gp molekülüne bağlanmak için substrat olan ilaçla yarışır ve substrat ilacın yerine Pgp'ye bağlanırlar (kompetitif inhibisyon). Bu mekanizmanın yanısıra ATP'az inhibisyonu yapılarak hücre membranının bütünlüğünü bozulması ile de (örn. Tween 80) (örn. kuersetin) P-gp inhibe edilebilir. P-gp inhibitörü ilaçların, tümör hücrelerindeki P-gp'yi inhibe etmesi ve antikanser ilaçların bu hücrelerde akümüasyonlarını artırması nedeniyle, P-gp inhibitörleri MDR modülatörleri veya tersine çevirici ajanlar olarak da adlandırılmakta ve böylece MDR modülatörleri, P-gp'yi inhibe etme kapasiteleri ile farmakodinamik etkilerden yoksun olma özellikleri göz önünde tutularak ilaçların etkinliklerini artırmak için prelinik çalışmalarda denenmektedirler (117).

MDR1 polimorfizmi değişik ilaç seviyeleri ile ilişkili bulunmasının dışında, Parkinson hastalığı, inflamatuvar barsak hastalıkları, serebral arter anevrizmalarının da neden olduğu refrakter epilepsiler, HIV tedavisi sırasındaki CD4 hücre yenilenmesi gibi birçok hastalıkta anlamlı olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (9).

P-gp substratlarının farmakolojik etkilerine göre gruplandırılması:

1. Substrat:

- Antiasitler: Simetidin, Ranitidin
- Antibiyotikler: Eritromisin, Tetrasiklin, Rifampisin, Levofloksasin
- Antiemetikler: Ondansetron
- Antitmr ajanlar: Paclitaxel, Doksarubisin, Daunorubisin, Vinblastin, Vinkristin, Aktinomisin-d, Docetaxel, Imatinib
- B-antagonistleri: Carvedilol, Bunitrolol, Celiprolol, Talinolol, Rezerpin
- Ca kanal blokerleri: Diltiazem, Mibefradil
- Antiaritmikler: Digoksin, Digitoksin
- Antihistaminikler: Feksofenadin, Terfenadin
- HIV proteaz inhibitörleri: İndanavir, Amprenavir, Nefinavir, Saquinavir, Teniposide

2. İnhibitör:

- İmmnspresanlar: Siklosporin-A, Sirolimus, Takrolimus
- Opiyoidler: Lorepamid, Morfin, Fentanil, Pentazosin
- Steroidler: Deksametazon, Metilprednizolon, Aldesteron, Progesteron, Hidrokortizon, Kortizol, Kortikosteron
- Diverse inhibitörleri: Verapamil, Kinidin, Siklosporin, Ketokanozol
- Diğer: Kolşisin, Fenotiazinler, Ivermectin, Domperidon

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal ve Metod

Çalışmaya Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Kliniğine 2009-2012 tarihleri arasında başvuran Kronik Hepatit B nedeniyle tedavi edilen lamuvidin kullanan 90 hasta dahil edildi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'ndan 30.03.2012 tarih ve 2012-32 numaralı kararı ile onay alınarak yapılan bu çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklendi (Proje no: 2012/33). Tüm genetik ve laboratuvar analizler Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında yapıldı.

Çalışmaya kronik Hepatit B tanısı olan toplam 90 hasta dahil edildi. Lamuvidin tedavisi sırasında 24. haftada HBV-DNA titresi negatif olan hastalar tedaviye yanıtı olarak kabul edildi (Grup 1, n:51). Lamuvidin tedavisi altında 24. ve daha sonraki haftalarda başvuran ve halen HBV-DNA titresi pozitif olan hastalar tedaviye dirençli olarak kabul edildi (Grup 2, n:39). Her 2 grupta MDR gen polimorfizmi incelendi. Ayrıca grup 2'deki hastalardan YMDD mutasyonu bakılabilen hastalar YMDD pozitif/negatif olanlar olmak üzere iki ayrı gruba ayrıldı. Grup 1'de 51 (Erkek/Kadın:38/13) ve grup 2'de 39 (Erkek/Kadın:31/8) hasta mevcuttu. Grup 2'de lamivudin tedavisine yanıtı olmayan YMDD mutasyonu bakılabilen ve YMDD mutasyonu pozitif olan 11, YMDD mutasyonu negatif olan 8, YMDD mutasyonu teknik nedenlerden dolayı pozitif/negatifliği saptanamayan 20 hasta vardı.

Çalışmadaki iki grup; MDR1 geninde C1236T allel sıklığı açısından karşılaştırıldı. Hastalarda CC, CT ve TT mutasyonu saptanan üç grup oluşturuldu. Bu üç grupta; mutasyonun, lamuvidine direnç, lamuvidin kullanım süresi ve virolojik parametrelerle ilişkisi karşılaştırıldı.

Hastalardan 5 cc EDTA'lı tüp içerisinde kan örneği alındı, kan örneklerinden DNA elde edilene kadar soğutucuda +4/-20 derecede saklandı. DNA izolasyonu yapıldıktan sonra çalışma gününe kadar saklandı. C1236T SNP'i PCR-RFLP yöntemi ile aşağıda tanımlandığı şekilde belirlendi. SNP için aşağıda belirtilen uygun primer çiftleri ve reaksiyon koşulları kullanılarak PCR gerçekleştirildi.

SNP	Primerler	Reaksiyon Koşulları
C1236T	F: 5'- TAT CCT GTG TCT GTG AAT TGC C -3'	94 °C 2 dk
	R: 5'- CCT GAC TCA CCA CAC CAA TG -3'	94 °C 30 sn
		60 °C 30 sn } 35 döngü
		72 °C 30 sn
		72 °C 7 dk

Her bir PCR işleminde final konsantrasyonları 50-150 ng DNA, 0.1-0.8 µM primer çifti, 1XPCR tamponu, 200 µM her bir dNTP ve 1 U Taq polimeraz olacak şekilde reaksiyon karışımları hazırlandı ve yukarıda belirtilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi. PCR ürünlerinin varlığı %1'lik agaroz jel elektroforezi ile gösterildi.

Daha sonra her bir PCR ürünü uygun restriksiyon enzimi ile üretici firmanın önerdiği koşullarda kesimlendi. C1236T polimorfizmi için HaeIII restriksiyon enzimleri kullanıldı. Kesim ürünleri %3.5'lük agaroz jelde elektroforetik olarak ayrıldı. Jel, Etidyum Bromür ile boyanarak UV tablada ürünler görünür hale getirildi ve genotipler belirlendi.

C1236T polimorfizminin genotip sıklıkları ve oluşturdukları haplotip sıklıkları Arlequin 3.11 istatistik yazılımı kullanılarak hesaplandı. Çalışmada elde edilecek olan değişkenlerin dağılım yapısına uygun istatistiksel yöntemler kullanılarak karşılaştırmalar yapıldı.

3.2. Olguların Seçimi

ELISA yöntemi ile belirlenmiş HBS Ag'i pozitif ve PCR yöntemi ile belirlenen anlamlı HBV-DNA düzeyi lamivudin tedavisi başlanması için yüksek olan hastalar çalışmada yer aldı. Hastalar; yeni lamivudin tedavisi başlananlar için 24. haftadaki ve 6 aydan uzun süreli lamivudin kullanım hikayesi olanların ise rutin kontrol tarihlerindeki HBV DNA sonuçları doğrultusunda lamivudin tedavisine yanıtı ve dirençli olgular olmak üzere 2 ana gruba ayrıldı. Lamivudin dirençli olgulardan ise YMDD mutasyonu analizi yapılarak YMDD mutasyonu olan ve olmayanlar araştırıldı. Hastalardan çalışma öncesi bilgilendirilmiş onay formu alındı.

Periferik kan örnekleri 1 ml EDTA içeren tüplerde biriktirilerek -20 C'de toplandı. Çalışmaya dahil edilen seropozitif HBV hastaları HAV, HCV, HDV ve HIV açısından seronegatifti.

Çalışmaya alınan hastalar; iki gruba ayrıldı.

- Grup 1: kronik hepatit B için lamivudin tedavisi almakta ve HBV-DNA titresini negatifleşmiş olan tedaviye cevap veren hastalar.
- Grup 2: kronik B hepatitinin lamivudin tedavisi sırasında takiplerde HBV-DNA titresinde anlamlı düşme olmayan veya yükseliş olan tedaviye cevapsız hastalar. Grup 2'deki hastalarda YMDD mutasyonu bakıldı ve YMDD mutasyonu pozitif/ negatif olmak üzere iki alt grupta sonuçlar incelendi.

3.3. Genetik Analiz

3.3.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

- 1) Hibridizasyon cihazı (profiblot T48, Tecan)
- 2) Thermal Cycler (Applied Biosystems, 2720)
- 3) Kuru ısı bloğu (CHB-202, Bioer)
- 4) Santrifüj (micro 120, Hettich)
- 5) 1000'lik, 200'lük ve 10'lük mikropipetler (Eppendorf ve Gilson)
- 6) DNA izolasyon kiti (Invitex, Invisorb spin Blood Kit)
- 7) PGX-HIV Strip Assay PCR ve hibridizasyon kiti (Vienna Lab)
- 8) Elektroforez (Biorad, midi)
- 9) Güçkaynağı (Biorad)
- 10) Taq DNA polimeraz (fermentas)
- 11) Ethidium Bromide (EtBr)
- 12) TAE tamponu (Applichem)
- 13) Agaroz (Nu micropor, Prona)
- 14) Otoklav indikatörü

- 15) Tüp (K3-EDTA, Vacuette)
- 16) Eppendorf tüp (1.5, 2 ve 0.2 ml, Sarstedt)
- 17) Micropipet uçları (beyaz, sarı ve mavi, Biosphere Fitler Tips)
- 18) Etil alkol (Merck)
- 19) Yükleme boyası (Fermentas)

3.3.2. DNA İzolasyonu

Bütün hastalardan genomik DNA izolasyonu periferik kan dokusundan yapıldı. Bunun için Invisorb Spin Blood DNA İzolasyon kiti kullanıldı. Yaklaşık 200ul periferik kan dokusunun kullanıldığı teknik sonrasında 30-50 ng/ μ l ultrapür DNA izole edilmektedir. (A260:A280 oranı 1,7-2 arası). İzolasyon için kullanılan kit içeriği aşağıdaki gibidir;

- 1) proteinaz K, 1ml (10ug/ μ l)
- 2) Lysis Buffer A, 15ml
- 3) Binding Buffer B6, 30ml
- 4) Elution Buffer D, 15ml
- 5) Yıkama tamponu I, 30ml (kullanmadan önce 30 ml %100'lük etil alkol eklenir.)
- 6) Yıkama tamponu II, 18ml (kullanmadan önce 42ml %100'lük etil alkol eklenir.)
- 7) 2.0ml'lik toplama tüpleri, 100 adet
- 8) 1.5ml'lik toplama tüpleri
- 9) Filtreler

3.3.3. Kan Dokusundan DNA İzolasyonu Protokolü

Çalışmadan önce örnek sayısına yetecek kadar elution buffer D 56°C'ye ısıtıldı. Kodlaması yapıldıktan sonra 1,5'lik eppendorf tüpe 200 ul EDTA'lı kan, 200ul lysis buffer A ve 20 ul proteinaz K konuldu. Kapağı kapatılarak tüp 10 sn vortekslendi ve 56°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası tüp ortamında 400ul binding buffer B6 tüpe eklendi, 3-4 kez pipetaj yapıldıktan sonra

lizatin tamamı filtrelili toplama tüpüne aktarıldı. Filtre toplama tüpü daha sonra 3 dakika (dk) oda sıcaklığında inkübe edildi ve 12 000 rmp'de 2 dk santrifüj edildi.

Filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, üzerine 500ul wash buffer I eklendi ve 12000 rmp'de 2 dk santrifüj edildi. Filtre üzerine 800ul wash buffer II eklenerek ve 12 000 rmp'de 1dk santrifüj edildi. Filtre üçüncü kez olarak 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, 14 000rmp'de 5dk santrifüj edilerek yıkama tamponlarından gelen alkolden arındırıldı. Alkolden tamamen arındırmak için filtre dördüncü ve son kez yeni 1,5'luk tüpe yerleştirildi ve 3 dk kapağı açık biçimde oda sıcaklığında bekletildi.

Daha sonra filtre membranının tam ortasında 200µl eluotion buffer-D eklendi,5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Filtrelili tüp 10.000rmp'de 1 dk santrifüj edildi,filtredeki DNA çözeltisi tüpe toplama tüpüne aktarıldı, etiketlendi ve -20°C'de çalışmak üzere muhafaza edildi.

3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

MDR1 geninin amplifikasyon için Vienna Lab PGX-HIV PCR amplifikasyon kiti kullanıldı.Kit bir amplifikasyon karışımı (MDR1 gen bölgesine ait biyotin işaretli primerler, ve diğer amplifikasyon için gerekli bileşenleri içerir) ve taq DNA polimeraz tamponundan oluşmaktadır.

PCR mastermiks,her hasta için etiketlenmiş 0.2 ml ependorf tüp ortamı;

Amplifikasyon karışımı : 15µl

Taq DNA polimeraz seyreltici tapon : 4,6µl

Taq DNA polimeraz : 0,4µl

Kalıp DNA : 5µl

Toplam hacim : 25µl şeklinde hazırlandı.

Multipleks PCR koşulları aşağıdaki gibi ayarlandı:

95°C 'de.....2dk (ilk denaturasyon)

95°C'de.....15sn (denaturasyon)

56°C'de30 sn (bağlanma)

72°C'de.....30 sn (uzama)

72°C'de.....3dk (son uzama)

Elde edilen PCR ürünleri strip test tekniğinde değerlendirilmek üzere +4°C'de saklandı.

3.3.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Hibridizasyon işleminden önce elde edilen PCR ürünleri (4 µl) öncelikle %1'lik elektroforezde başarılı amplifikasyonlar açısından değerlendirildi. Başarılı amplifikasyon elde edilen PCR ürünlerinden 10 µl ürün Souther Blot analiz için kullanıldı.

3.3.6. Revers-Hibridizasyon (Southern Blot)

Southern Blot analiz için Revers-hibridizasyon ProfiBlot T48 (Tecan) hibridizasyon cihazı kullanıldı. Revers-hibridizasyon, biyotin işaretli primerler çoklu (multiplex) polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında oluşan ürünlerin nitrosellüloz membranlar (stripler) üzerindeki kendi komplementer zincirlerine bağlanması ve bir konjugat-substrat reaksiyonu oluşturması esasın dayanan bir tekniktir.

3.3.7. Revers Hibridizasyon Basamakları ve Kullanılan Solüsyonlar

Strip test tekniğinde Revers Hibridizasyon 3 temel basamaktan ibarettir;

1) Strip üzerindeki problemler ve PCR ürünlerinin bağlanması- hibridizasyon

Cihazın örnek yükleme bölgesinde (trey) yüklenen 10µl PCR ürünü kitle birlikte sağlanan 10µl DNAT (NaOH içerikli bir denatürasyon solüsyonu) solüsyonu kullanılarak denatüre edildi. Treye strip yerleştirildi. Denatüre PCR ürünü ve strip, cihazın sallanan platformunda, 45°C de sıcaklıkta (yaklaşık) 1 ml hibridizasyon tamponu ile 20 dk inkübe edilerek strip PCR ürünü hibridizasyonu sağladı. Hibridizasyon solüsyonu aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı.

2) Yıkama

Hibridizasyon sonrasında ortamda bulunması istenmeyen PCR ürünleri ve nonspesifik bağlanma yapan oligonükleotidler kuvvetli bir yıkayıcı olan yıkama solüsyonu A (1ml) ile 45°C'de 15 dakikalık üç yıkama periyodu ile ortamdan uzaklaştırıldı.

3) Renk Oluşumu

Stripler oda sıcaklığında 1ml konjugat solüsyonu ile 15dk inkübe edilerek konjugat solüsyonu içinde bulunan streptavidin-alkalan fosfataz, biyotin işaretli hibrit DNA fragmentlerine bağlanması sağlandı.

Konjuat solüsyonunun artıkları daha yumuşak bir yıkama solüsyonu olan yıkama solüsyonu B ile 10,5 ve 5 dakikalık üçer periyotta temizlendi.Strip üzerindeki hibridize olmuş bantların görülür hale gelebilmesi için ortalama 1 ml alkalan fosfatazın substratı olan nitro blue tetrazolium (NBT) ve 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfatdan (BCIP) oluşan renk geliştiricisi (color developer)eklendi, oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona tabi tutuldu Strip son olarak distile su ile yıkandı,kağıt havlu ile özenle kurutulduktan sonra değerlendirme tablosuna (Collector) özenle yerleştirildi.

3.3.8. Striplerin Değerlendirilmesi

Her stripin üst tarafında kırmızı ve alt tarafında yeşil bir belirteç bulunmaktadır. Bunun dışında hibridizasyon sonrası stiplerin değerlendirmeye alınabilmesi için kontrol bantının oluşmuş olması gerekmektedir. Kontrol bantları oluşmamış stripler değerlendirilmeye alınmadı.

Yabanıl tip gen bölgelerine ait prob stripin alt kısmına, mutant gen bölgelerine ait prob ise stripin üst kısmında sinyal verecek şekilde dizayn edilmişlerdir. Hibridizasyon sonrası yabanıl tip bantların mevcut olduğu ve mutant gen bölgelerine ait bantların bulunmadığı bir strip profili hastanın mutasyona sahip olmadığını gösterir. Mutant gen bölgelerinde ait bantlardan sinyal alınıyorsa sinyal alınan mutasyonun yabanıl tip kodonuna bakılarak saptanan mutasyonun homozigot ya da heterozigot olma durumuna karar verilir. Mutasyonun yabanıl tip gen bölgesini gösteren bantın mevcut olması mutasyon **heterozigot**, mevcut olmaması durumunda ise **homozigot** olarak değerlendirildi.

3.4.İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 15 yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu grşsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnow/Shapiro-Wilk testleri) incelendi. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Sayısal değişkenlerin kıyaslanmasında bağımsız gruplarda t testi ve kategorik değişkenlerin

kıyaslanmasında ki-kare testi kullanıldı. Normal dağılıma uymayan parameterlerin karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı.. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Hasta gruplarında SNP için alel/genotip sıklıklarının ve SNP itibariyle oluşan haplotip, ve sıklıklarının belirlenmesinde Arlequin 3.11 yazılım programı kullanıldı. Tespit edilen genotip sıklıkları için Hardy-Weinberg dengesinden sapma olup olmadığı Fischer'in kesin ki-kare testi ile araştırıldı. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hasta ve kontrol gruplarının verilerinin karşılaştırılmasında ve OR (Odds Ratio) değerlerinin hesaplanmasında SPSS 15.0 yazılım programı kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmaya kronik Hepatit B tanısı olan toplam 90 (E/K:69/21) hasta dahil edildi. Hastaların ortalama yaşları 49.8 ± 12.6 (aralık; 22-75) yılıdır. Hastalar 2 ana gruba ayrıldı:

- Grup 1: Kronik B hepatitinin lamuvidin tedavisi sırasında 24. haftada HBV-DNA titresi negatif olan tedaviye yanıtı hastalar.
- Grup 2: Lamuvidin tedavisi altında 24. ve daha sonraki haftalarda başvuran ve halen HBV-DNA titresi pozitif olan tedaviye dirençli hastalar.

Grup 2'deki hastalar lamuvidin dirençli olmalarından dolayı YMDD mutasyonu bakılabilen ve pozitif/negatif olanlar olmak üzere iki ayrı gruba ayrıldı.

Birinci gruptaki hastaların yaş ortalamaları 50.78 ± 12.66 olup hastaların %74.5'i erkek %25.5'i kadındı. İkinci grubun yaş ortalamaları 48.62 ± 12.69 ve ikinci gruptaki hastaların %79.5'i erkek, %20.5'i kadındı. İkinci gruptaki YMDD mutasyonu pozitif olan hastaların yaş ortalamaları 50.64 ± 12.20 hastaların %81.8'i erkek %18.2'si kadın, YMDD mutasyonu negatif olan hastaların yaş ortalamaları 45.38 ± 11.04 hastaların %82.5'i erkek %17.5'i kadın idi. Her iki grubun yaş ortalamaları ve cinsiyetleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$)

Hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri tablo 5' te özetlenmiştir. Tedavi öncesi HBV-DNA değerlerine göre gruplar karşılaştırıldığında; tedaviye cevap veren hasta grubunda viral yük (HBV-DNA) $1483696.02 \pm 7298719.11$ IU/ml; tedaviye dirençli olan hasta grubunda 5842435.95 ± 17252984 IU/ml idi. Tedaviye dirençli hastaların HBV-DNA titreleri tedaviye yanıt alınan hastalardan anlamlı ölçüde yüksekti ($p=0.001$).

Histoljik aktivite indeksler (HAI) grup 2 'deki hastalarda grup 1'den daha yüksek ($p=0.036$) ancak fibrozis evreleri benzer bulundu. İki grup arasında laboratuvar parametreleri karşılaştırıldığında; Grup 1 ve 2'deki hastaların ALT ortalamaları (sırasıyla, 46.07 ± 32.24 U/L ve 94.41 ± 75.71 U/L) ve total bilirübin ortalamaları (sırasıyla 0.69 ± 0.48 mg/dl ve 0.83 ± 0.44 mg/dl) arasındaki fark anlamlıydı (p değerleri sırasıyla: 0.001 ve 0.042).

Tablo 5: Hasta gruplarının tedavi öncesi klinik ve laboratuvar özellikleri

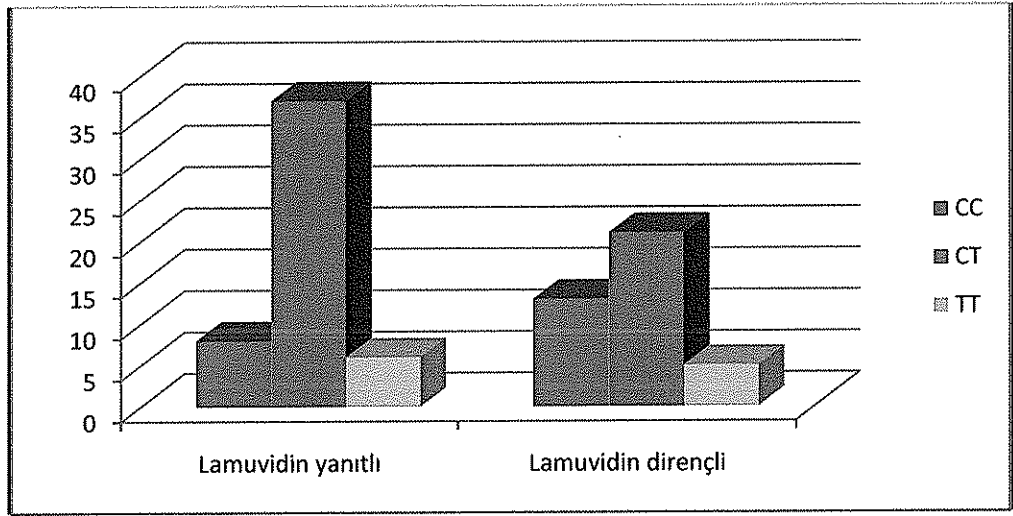
Özellik	Lamuvidin Yanıtı N:51	Lamuvidin Dirençli N:39	P
Yaş , yıl	50.78±12.66	48.62±12.69	0.324
Cinsiyet			0.624
Kadın	38 (%74.5)	31 (%79.5)	
Erkek	13 (%25.5)	8 (%20.5)	
HBV- DNA, IU/ml	1483696.02±7298719.11	5842435.95±17252984.918	0.001*
HAI	9.20±3.40	10.62±3.70	0.036*
Fibrozis evresi			0,117
Evre 1	12 (%23.5)	10 (%25.6)	
Evre 2	21 (%41.2)	9 (%23.1)	
Evre 3	9 (%17.6)	15 (%38.5)	
Evre 4	2 (%3.9)	3 (%7.7)	
Evre 5	1 (%2)	1 (%2.6)	
Evre 6	6 (%11.8)	1 (%2.6)	
Lamuvidin süre, ay	33.05±22.1	16.97±12.26	0.001*
AST, U/L	36.21±17.41	60.07±43.99	0.002*
ALT, U/L	46.07±32.24	94.41±75.71	0.001*
Albumin, gr/dl	4.43±0.36	4.40±0.39	0.416
T.Bilirubin, mg/dl	0.69±0.48	0.83±0.44	0.042*

*p<0.05

Tedaviye yanıt veren grup ile tedaviye dirençli grup arasında MDR1 C1236T'nin genotipik olarak CC, CT ve TT gen mutasyonları karşılaştırıldı. Grup 1'de 8 (%15.7) hastada CC, 37 (%72.5) hastada CT, 6 (%11.8) hastada TT gen mutasyonları saptandı. Grup 2'de 13 (%33.3) hastada CC, 21 (%53.8) hastada CT, 5 (%12.8) hastada TT gen mutasyonları saptandı. Tedaviye dirençli grupta (grup 2)

YMDD mutasyonu bakılan ve pozitif olan 5 (% 45) hastada CC, 5 (% 45) hastada CT, 1 (% 9) hastada TT; YMDD negatif olan 3 (%37) hastada CC, 5 (%63) hastada CT gen mutasyonları saptandı (Tablo 6).

Hasta grupları arasında CC, CT, TT genotip dağılımları incelendi (Şekil 7). CT ve TT genotipleri Grup 1 ve 2'deki hastalarda benzer oranlarda görülürken CC genotipi Grup1'de %15.7, grup 2'de %33.3 olarak tespit edildi. Aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p=0.044$) (OR%2.69; % 95 CI: 0.99-7.27).



Şekil 7: Hasta grupları arasında C1236T genotip dağılımı

Tablo 6: Lamuvidin yanıtli ve dirençli hastalarda C1236T genotipik dağılımı

Genotip	Lamuvidin yanıtli (n:51)	Lamuvidin dirençli (n:39)	P
CC	8 (%15.7)	13 (%33.3)	0.044*
CT	37 (%72.5)	21 (%53.8)	AD
TT	6 (%11.8)	5 (12.8)	AD
Toplam	51 (%100)	39 (%100)	

* $p < 0.05$

AD: Anlamlı değil.

Gruplar arasından allel frekansları karşılaştırıldı. C alleli sıklığı; grup1'de %51.96, Grup 2'de ise %60.26 idi. T alleli sıklığı; Grup1 'de %48.04 grup 2'de

%39.74 idi. Her iki allel sıklığı açısından gruplar kıyaslandığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Grup 2' deki YMDD mutasyonu bakılabilen ve YMDD mutasyonu pozitif 11 hasta ile negatif olan 8 hastanın genotipik olarak CC, CT, TT mutasyonları benzer bulundu ($p>0.05$). Lamuvidin dirençli YMDD mutasyonu pozitif 11 hasta ile grup 1 yani lamuvidin duyarlı 51 hasta genotipik olarak CC mutasyonu açısından karşılaştırıldı ve her iki grup arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.043$) (OR=4.48, %95 CI: 1.15 – 17.38).

Grup 2' deki YMDD pozitif 11 hastanın 10'u C alleli taşımaktadır. CC mutasyonu açısından; toplam lamuvidin kullanım süresi 12 ay geçmemiş, lamuvidin direnci tespit edilmiş grup 2' deki YMDD mutasyonu pozitif olan 8 hasta ile lamuvidin duyarlı 51 hasta karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.046$ OR=5.38 %95 CI 1.20-24) (Tablo 7).

Tablo 7: YMDD mutasyonu pozitif ve negatif grubun lamuvidin kullanım süresi ve C1236T genotipik dağılımı

Genotip	YMDD Mutasyonu Pozitif (n:11)		YMDD Mutasyonu Negatif (n:8)
	Lamuvidin Kullanım Süresi 6-12 ay	Lamuvidin Kullanım Süresi > 12 ay	
CC	4 (%36)	1 (%9)	3 (%37)
CT	4 (%36)	1 (%9)	5 (%63)
TT	0	1 (%9)	0
Toplam	8	3	8

Tablo 8: Tedavi yanıtı ve tedavi dirençli olup lamuvidin kullanım süresine 12 ay'ın altında ve üstünde olan hastaların genotipik dağılımı

Genotip	Lamuvidin yanıtı (n:51)	Lamuvidin dirençli (n:39)	
		Lamuvidin süresi 12 ay (n:21)	Lamuvidin Süresi > 12 ay (n:18)
CC	8 (%15.69)	8 (%38.1)	5 (%27.7)
CT	37 (% 72.5)	11 (%52.4)	10 (%55)
TT	6 (% 11.8)	2 (%9)	3 (%16.6)

CC mutasyonu; grup 1'de 8 (%15.69) hastada, grup 2'de Lamuvidin kullanım süresi 12 ay olan 8 (%38.1) hastada saptanmış olup, CC mutasyonu açısından aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0.042$) (OR 3.31, %95 CI: 1.06 – 10.33) (Tablo 8).

5. TARTIŞMA

Lamivudin, 1998 yılında FDA onayı almış olan kronik hepatit B tedavisinde kullanılan bir nükleozid analogudur. Kronik hepatit B tedavisinde kullanılan diğer anti-viral ajanlara göre tek dezavantajı ise lamivudin tedavisi sırasında görülme ihtimali olan ilaç direncidir (118-120). HBeAg pozitif ve negatif kronik hepatit B hastalarında lamivudin tedavisine yanıt oranı birbirine benzerdir. Ancak, lamivudin tedavisi kesildikten sonra hastalığın relaps oranı HBeAg negatif bireylerde daha fazla olmaktadır. Tedavi öncesi serum ALT düzeyi lamivudin cevabını belirleyen önemli bir faktördür (118-120). HBV polimerazının primer katalitik bölgesi olan revers transkriptazın C domaininin 204. kodonunda bulunan metioninin yerini mutasyon sonucu bir başka aminoasitin alması ve lamivudinün viral DNA'ya integre olamaması tedavi direncine yol açar (74, 89, 92).

Lamivudin direnci gelişmesinden sonra meydana gelen viral, kimyasal ve histolojik ilerleme hastalığın kliniğinin tedavi öncesi duruma gelmesine veya daha da kötüleşmesine sebep olmaktadır. Tedavi altında iken direnç gelişiminin erken saptanması için hastalar yakından izlenmektedir (95, 96, 97). Literatürde lamivudin direnç gelişimi ile ilişkili olabilecek faktörler; hastanın yaşı, cinsiyeti, beden-kitle indeksi HBeAg pozitifliği, HBV genotipi, tedavi öncesi karaciğerin patolojik durumu, tedavi öncesi serum ALT ve HBV-DNA düzeyi olarak bildirilmiştir (91, 92, 118, 119). Lamivudinün başka anti-viral ilaçlar ile kombine edilerek verilmesi ile direnç gelişiminin azaldığını bildiren çalışmalar mevcuttur (120, 121). Kobayashi ve ark. yaptığı çalışmada yaş, cinsiyet, HBV genotipi, HBeAg durumu, tedavi öncesi karaciğer histolojisi, serum kolinesteraz, ALT ve HBV-DNA düzeylerinin multivariyat analizinde yalnızca HBeAg pozitifliği ve HBV genotipinin mutasyon gelişiminde istatistiksel olarak anlamlı etken olduğu gösterilmiştir (118). Tedavi öncesi serum HBV-DNA düzeylerinin lamivudin direnci gelişen hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (122).

Bu çalışmada, literatürde belirtilen direnç gelişimini etkileyen faktörlerin dışında MDR1 gen polimorfizminin lamivudin direnci gelişimi ile ilişkisi olup olmadığı araştırıldı.

Yuen ve ark., YMDD motif mutasyon oluşumu ile tedavi öncesi serum ALT ve HBV-DNA düzeylerinin ilişkili olduğu gösterilmiştir (119). Benzer şekilde çalışmamızda, tedaviye dirençli grupta, duyarlı gruba göre anlamlı bir yüksek HBV-DNA düzeyi tespit ettik. (p=0,001)

Suzuki ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada YMDD motif mutasyonu gelişimi ile tedavi süresinin direkt ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buna göre 1. yılın sonunda % 12,5 olarak tespit edilen YMDD motif mutasyon sıklığı, 3. yılın sonunda % 43, 5. yılın sonunda % 63'e ulaştığını bildirmişlerdir (78). Çalışmamızda, literatürden yüksek oranda lamuvidin direnci saptanmakla beraber, tedavi direnci gelişen hastalardaki YMDD mutasyon oranı literatürle uyumlu olarak (%11,1) bulundu.

İlaçların farmakokinetik ve farmakodinamik etkinlikleri; ilaçların metabolizmasından sorumlu enzimlerde, ilaç taşıyıcılarında (transporter), reseptörlerinde veya kofaktörlerindeki genetik varyasyonlardan etkilenir (123). MDR 1 genin kodladığı P-glikoprotein ilaç metabolizmasında rol alan bir faktördür. Bu gen P-glikoprotein (P-gp) olarak bilinen 170 kDa'luk bir transmembran taşıyıcı protein kodlar. P-gp, ATP bağımlı olarak ksénobiyotiklerin, metabolik artık ürünlerin ve pek çok ilacın hücre dışına pompalanmasında fonksiyon görür (124, 125). P-gp'nin gastrointestinal yol boyunca ilaç absorpsiyonunu etkilediği, ilaçların safra ve idrara atılımını sağladığı ve yine ilaçların kan-beyin bariyerini geçişini engellediği bilinmektedir. Sonuçta P-glikoprotein, yalnızca kanser hücrelerinde gözlenen çoklu ilaç direncine neden olmakla kalmayıp aynı zamanda pek çok ilacın (steroid hormonlar, immunosupresanlar, antimikrobiyal ajanlar, vb.) normal dokulardaki farmakokinetiklerini de belirlemektedir.

İlk kez Tsurua ve ark. yaptığı bir çalışmada MDR fenotipine sahip P-gp pozitif fare lösemik hücrelerinde trifluperazon ve verapamil kullanımı ile vinkristinin hücre içinde biriktiği gösterilmiş ve P-gp ilişkili çoklu ilaç direncinin tersine çevrilebileceği gösterilmiştir (126). Yine bu konuda özellikle anti MDR-1 oligonükleotidleri ile P-gp ekspresyonu ve fonksiyonunun azaltılması veya staurosporin gibi protein kinaz C inhibitörleri ile MDR-1'in ekspresyonunun azaltılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır (127). Tedaviye dirençli malignitelerde verapamil veya siklosporin A uygulanımı ile P-gp ilaç atım fonksiyonunun blokajı

sağlanarak tedavi başarısı artırılabilir (109). İn-vitro olarak verapamil ile trifluoperazinin, P-gp pozitif hücrelerde adriamisine olan direnci ortadan kaldırdığı gözlenmiştir (128).

Tischler ve ark. MDR1'in beyin dokusundaki artmış ekspresyonunu göstererek antiepileptik ilaçların beyin dokusuna geçişinin sınırlandırılması sonucu epilepsi hastalarındaki ilaca cevapsızlığı açıklamışlar ve özellikle fokal kortikal displazili olgularda saptanan ve beyin kan damarlarını çevreleyen glial hücrelerdeki artmış P-gp ekspresyonunu, ikinci bir bariyer olarak düşünmüşlerdir (129).

MDR1 polimorfizmleri dokulardaki P-glikoprotein ekspresyonuna etkileyerek, ilaçların farmakodinamisi, tedavi sonucu ve hastalık risklerini etkiler (130).

Marzolini ve ark. tarafından vücuttaki MDR1 haplotipinin, çevresel faktörlerin ve potansiyel faktörlerin vücuttaki MDR1 polimorfizmlerine etkisi araştırılmıştır (131). Tek nükleotid polimorfizmi P-glikoprotein aktivitesini etkiler. P-glikoprotein aktivitesinin seviyesi, ilacın dokuya dağılmasını, sonuç olarak da tedavi yanıtını veya tedaviye direncin bir belirleyicisi olabileceğini düşündürmektedir (131).

Schwab ve ark., ilaç kinetiğinin ve kişinin ilaçlara karşı verdiği yanıtın genetik yapıya göre toplumlar ve bireyler arasında değişiklik gösterdiğini vurgulamış ve farklı populasyonlarda elde edilecek genetik veri tabanlarının kullanımı ile " kişiye özel tedavi " yaklaşımlarının geliştirilmesini gündeme getirmişlerdir (125, 132). Çalışmamızda YMDD mutasyonu dışında lamivudin direncini etkileyen başka genetik faktörlerin varlığını, MDR1 gen polimorfizminin dirence etkisini araştırdık. Hem lamivudin dirençli grupta hem de YMDD mutasyonlu olan dirençli hastalarda CC genotipinin anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi.

Bugüne kadar MDR1 geninde 50'den fazla SNP (Single Nucleotide Polymorphism) tanımlanmıştır ve MDR1 geninde var olan bu polimorfizmlerin P-gp aktivitesini, ifade seviyesini etkileyerek fonksiyonu üzerinde önemli rol oynadığı yönündeki kanıtlar her geçen gün artmaktadır (123). Kimichi – Sarfaty ve arkadaşları, MDR1 geninde yaygın olarak gözlenen ve üzerinde en çok durulan üç SNP' nin, C3435T, G2677T/A ve C1236T olduğunu bildirmişlerdir (133).

Schwab ve arkadaşları bu polimorfizmlerden C3435T ve C1236T polimorfizmlerinin aminoasit değişimine neden olmayan sessiz (silent = synonym) polimorfizmler olduğunu ve C3435T ve C1236T' nin her ne kadar sessiz birer polimorfizm olsalar da diğer yaygın non-sinonim polimorfizmlerle birlikte herhangi bir haplotipte buldukları zaman azalmış P-gp fonksiyonu ile ilişkili olabileceklerini bildirmişleridir (125).

Bugüne kadar bahsedilen polimorfizmlerden en çok hastalıklarla ya da ilaç direnci ile ilişkilendirilen C3435T polimorfizmidir (128, 129, 131, 134). Literatürde diğer sessiz polimorfizm olan C1236T polimorfizmini hastalıklarla ya da ilaç direnci ile ilişkilendiren bir çalışma yoktur. Sessiz polimorfizmlerden C3435T'nin kronik hepatit C enfeksiyonunda ribavirin direnci ile ilişkili olabileceğini bildirilmiştir (135). Çalışmamızda diğer sessiz polimorfizm olan C1236 T' yi kronik hepatit B'li hastalarda lamivudin direnci ile ilişkisi olup olmadığını araştırdık.

Lamivudine yanıtı grupta CT genotipi (%72.5), yanıtız grup (%53.8) ile karşılaştırıldığında daha yüksek orandaydı ancak istatistiksel açıdan fark yoktu. CC genotipi, lamivudine dirençli grupta (%33.3) yanıtı gruba göre (%15.7) daha yüksek orandaydı (p=0.044). Gruplar allel açısından karşılaştırıldığında C alleli dirençli grupta daha yüksek iken (%60.26 vs 51.96), T alleli duyarlı grupta daha yüksek olarak tespit edildi(%48.04 vs 39.4). Gruplar arasında allel frekansları benzer bulundu. Benzer şekilde, lamivudine yanıtız grupta ve YMDD pozitif tespit edilen hasta grubunda CC genotipi ve C alleli yüksek bulunmuştur. Tedavinin birinci yılında direnç gelişen hastalarda CC genotipi lamivudine yanıt veren gruba göre anlamlı derecede yüksekti. Bu bulgular ışığında CC genotipinin lamivudin direnç gelişimde rolü olduğu sonucuna varılmıştır. YMDD mutasyonlu hastalarda CC genotip ve C allel frekansının yüksek olması da bu hipotezi desteklemektedir.

MDR1 genotipi AIDS'te hastalık riski ve tedavi sonucu açısından önemlidir çünkü bu hastalığın tedavisinde kullanılan HIV proteaz inhibitörleri P-gp'nin substratlarıdır. P-gp aynı zamanda CD56, CD8, CD4, CD19 pozitif hücreler ve diğer periferik kan mononükleer hücrelerinde ekspresyone olmaktadır. CD4 hücrelerindeki HIV proteaz inhibitörlerinin hücre içi konsantrasyonları ve tedavi etkinliği P-gp ekspresyonlarından etkilenmektedir. Doğrusu, birkaç çalışmada MDR1 genotipi ile antiretroviral tedavi güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Fellay ve ark tarafından

3435TT genotipine sahip hastalarda; 6 aylık antiretroviral tedavi sonrasında, belirgin CD4+ hücre artışı saptamışlardır. Sonuç olarak HIV tedavisinde TT genotipinin daha iyi cevap ve daha az oranda virus direnci ile ilişkili olduğu veya C alelinin viral ve immun cevapta başarısızlıkla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (134). Çalışmamızda C1236T polimorfizmindeki veriler de bu çalışmayı büyük ölçüde desteklemektedir. C allel frekansı ve CC genotipi kronik hepatit B tedavisinde lamivudin direnci ile ilişkili bulunmuştur.

Literatürde kronik hepatit B enfeksiyonunda klinik seyir ve tedavi direnci ile ilişkili MDR1 polimorfizmi ile ilişkili çalışma yoktur. Hepatit B dışı bazı hastalıklarla MDR1 C3435T polimorfizmi ile ilişkilendirilmiştir. Ancak C1236T ile ilgili veri yoktur.

Diğer nükleozid analoglarına kıyasla lamuvidine karşı direnç gelişme oranı daha yüksektir. MDR1 geni ve P-glikoproteininin ilaç direncini artırdığı ve ilaçlara kişinin yanıtını değiştirdiği bilindiğinden kişilerin ilacı metabolize edebilme kapasitesini tahmin etmede yol gösterici olabileceğini düşündürmektedir. Bulgularımız, MDR1 gen mutasyonunun, hepatit B'li hastalarda tedaviye yanıt oranlarını etkileyebileceğini ve özellikle bu durumun lamuvidin açısından önemli olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak MDR-1 gen ve ürünü P-glikoproteinde görülen polimorfizmler kronik hepatit B seyrinde tedavi yanıtını etkileyen önemli faktörlerdir. Çalışmamızda MDR1 C1236T CC genotipi lamuvidin dirençli grupta daha sık görülmüştür. Gelecekte kronik hepatit B tedavisinde MDR gen polimorfizmleri tedavi seçiminde ve süresinde klinisyenlere yön verecektir. Bu konuda yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması tedaviye yanıtızlıkta MDR mutasyonunun önemini vurgulamaktadır. Kronik Hepatit B hastalarında MDR1 genine ait C1236T polimorfizminin karşılaştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışmaya katılan hasta sayısı az olmakla birlikte elde edilen ilk verilerde tedaviye dirençli ve tedaviye dirençli YMDD pozitif bireylerde tedaviye yanıtli olan bireylere kıyasla istatıksel olarak anlamlı derecede MDR1 CC gen mutasyonu olduğu görüldü. (p=0.05)

Ancak bu bulguların daha büyük serilerde çalışılması gerekmektedir. Bizim çalışmamızda YMDD mutasyonu oluşma ihtimali en düşük seviyede olan hasta grubumuzda da tedaviye yanıtli bireylere kıyasla istatıksel olarak anlamlı derecede CC gen mutasyonu olduğu görüldü. Bu sonucun MDR mutasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülebilir.

Bu ön verilerden yola çıkılarak daha geniş hasta gruplarında tekrarlanacak olan analizler, halen ilaç tedavisine yanıtızlık sorununu içinde barındıran Kronik Hepatit B yönetiminde hem direnç patogeneziini açıklamamıza hem de bu yolla özellikle tedaviye yanıt vermeyen hastalarda neler yapılması gerektiği konusuna yardımcı olacaktır. Bu konuda literatürde yer alan bilgi eksikliği de göz önüne alınırsa bu çalışmaya temel olan konunun uzunca bir süre daha çalışmaya açık olduğu görülmektedir.

Ayrıca C1236T polimorfizmi ile MDR1 genine ilişkin diğer polimorfizmlerin beraber çalışılması veya MDR1 gen analizinin yapılması gelecekte kişiye özgü tedavi yöntemlerinin uygulanmasında faydalı olabileceği düşünölmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Lai CL, Ratziu V, Yuen MF ve ark. Viral hepatitis B. Lancet 2003; 362: 2089-94
2. Ustaçelebi Ş, Ergünay K. Hepatit B virusunun moleküler virolojisi. Ed: Tabak F, Balık İ, Tekeli E. Viral Hepatit 2007. 1. baskı. İstanbul: Ohan Matbaası, 2007; 96-107.
3. Gish RG, Locarnini S. Genotyping and genomic sequencing in clinical practice. Clin Liver Dis 2007; 11: 761-795.
4. Leblebicioğlu H, Eroglu C. Acute hepatitis B virus infection in Turkey: epidemiology and genotype distribution. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 537-541.
5. Rizzetto M. Efficacy of lamivudine in HBeAg-negative chronic hepatitis B. J Medic Virol 2002; 66: 435-451
6. Tassopoulos N, Volpes R, Pastore G ve ark. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen- negative/ hepatitis B virus DNA- positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Hepatology 1999; 29: 889-896.
7. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW ve ark. Identification and Characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Hepatology 1998; 27: 1670-1677.
8. American Gastroenterological Association policy statement on the use of medical practice guidelines by managed care organizations and insurance carriers. Gastroenterology 1995; 108: 925-926.
9. Marzolini C, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (p-glycoprotein); Recent advances and clinical relevance Clin Pharmacol Ther. Jan, 2004; 75(1): 13-33.
10. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T ve ark. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. Pharmacogenetics; 2001 ; 11 (3): 217-21
11. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N ve ark. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to Genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. J Pharmacol Exp Ther. 2001; 297 (3): 1137-43.

12. Wandel C, Kim R.B, Kajiji S ve ark. P-glycoprotein and cytochrome P-450 3A inhibition; KHU0Y dissociation of inhibitory potencies. *Cancer Research*. 1999; 59: 3944-8.
13. Ganem D, Schneider R. Hepadnaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2001: 2923-2970.
14. Mehmet K. Hepatit B Virüsü. In: Tekeli E, Balık İ (Eds). *Viral Hepatit 2003: Viral Hepatitle Savaşım Derneği*, 2003, Ankara. 90-91.
15. Robinson WS. Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, New York: Churchill Livingstone, 2000; 1652-1685.
16. Hollinger FB. Hepatitis B Virus. Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Eds). *Fields Virology*, 3rd Ed, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996; 2738-2761.
17. Birengel S, Tekeli E: Kronik Hepatit B'de Epidemiyolojik, Virolojik, Fiziopatolojik ve Klinik Özellikler, Tanımlamalar In: Köksal İ, Leblebicioğlu H (Eds) *Kronik Viral Hepatitlerin Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar*, 2003 Ankara; 11-21.
18. Kıyan M. Hepatit B Virüsü Replikasyon Stratejisi. Kılıçturgay K, Badur S (Eds). *Viral Hepatit 2001. Viral Hepatitle Savaşım Derneği*. İstanbul: Deniz Ofset. 2001: 92-93.
19. Robertson BH, Margolis HS. Primate hepatitis B viruses-genetic diversity, geography and evolution. *Rev Med Virol* 2002; 12: 133-141.
20. Lee WM. Hepatitis B virus infection, *N Engl J Med* 1997; 337:1733-1745.
21. Pawlotsky JM. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J Clin Virol* 2005; 34(1): 125-129.
22. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA ve ark. The contribution of hepatitis B and hepatitis C virus infection to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006; 45 (4): 529-538.

23. Kılıçturgay K, Badur S (eds). Viral Hepatit 2001. Viral Hepatitle Savaşım Derneği, Deniz Ofset, Ankara, 2001; 15.
24. Gürel S. Kronik Viral Hepatitler. Memik F (ed). Klinik Gastroenteroloji. Bursa. Nobel&Günes Tıp Kitabevi. 2004; 578-589.
25. Dolar ME. Hepatit B Virus Enfeksiyonu. Klinik Karaciğer Hastalıkları. Bursa. Nobel&Günes Tıp Kitabevi. 2002; 187-237
26. Taşyaran M.A. HBV Enfeksiyonu Epidemiyolojisi. In: Tekeli E. Balık İ (Eds). Viral Hepatit 2003; 121-128.
27. Aydın K. Akut Viral Hepatitlerde Epidemiyoloji. In: Köksal İ. (Eds). Viral Hepatitlerde Yenilikler. Karadeniz Teknik Üniversitesi Matbaası, Trabzon 1998; 43-57.
28. Akçam FZ. Hepatit B Virüsü Enfeksiyonu. Sted. 2003; 12(6): 211..
29. Curry MP, Chopra S. Acute Viral Hepatitis. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia, Churchill Livingstone. 2005; 1426-1441.
30. Alter M. Epidemiology of Hepatitis in Europe and Worldwide. J Hepatol 2003; 39: 64-69.
31. Kato H, Orito E, Gish RG ve ark. Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F). J Virol 2002; 76: 6131-6137.
32. Taşyaran MA. Hepatit B virüs enfeksiyonunda klinik. Ed: Tabak F, Balık İ, Tekeli E. Viral Hepatit 2007. 1. baskı. İstanbul: Ohan Matbaası, 2007; 118-122.
33. Aydın K. Kronik hepatit B'de güncel tedavi. ANKEM Derg 2006; 20: 203-207.
34. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. Hepatology 2007; 45: 507-539.
35. Bilgiç A. Hepatit B Virüs ve Serolojik Tanı. Aktüel Tıp Dergisi (Viral Hepatitler Sayısı) 1997; 2(3): 130-133.
36. Dündar İH, Saltoğlu N. Hepatit Virüslerinde Mutasyon ve Getirdiği Sorunlar. In: Tekeli E, Balık İ(Eds). Viral Hepatit 2003. 1. Baskı, İstanbul: Viral Hepatit Savaşım Derneği; 2003; 430-458.

37. Bilgiç A, Özacar T. Hepatit B Virüsü. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. 2002; 1350- 1370.
38. Yalçın K, Değertekin H. Akut Viral Hepatitler. In: Özden A, Şahin B, Yılmaz U, Soykan İ (Eds) Gastroenteroloji. Ankara: Türk Gastroenteroloji Vakfı; 2002; 485-487.
39. Chisari FV, Ferari C. Hepatit B Virus İmmunopathogenesis. Annu Rev Immunol. 1995; 13: 29-60.
40. Guidotti LG, Chisari FV. To kill or to cure; option in host defense against viral infection. Curr Opin Immunol 1996; Aug; 8(4): 478-483.
41. Meuleman P, Libbrecht L, Wieland S ve ark. Immune suppression uncovers endogenous cytopathic effects of the hepatitis B virus. J Virol. 2006; 80: 2797-2807.
42. de Franchis R, Meucci G, Vecchi M ve ark. The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. Ann Intern Med. 1993; 118: 191-194.
43. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. N Engl J Med. 2004; 350: 1118-1129.
44. Villeneuve JP. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. J Clin Virol. 2005; 34(suppl 1): 139-142.
45. Eddleston AL, Mondelli M. Immunopathological mechanisms of liver cell injury in chronic hepatitis B virus infection. J Hepatol. 1986; 3(suppl 2): 17-23.
46. Rapicetta M, Ferrari C, Levrero M. Viral determinants and host immune responses in the pathogenesis of HBV infection. J Med Virol. 2002; 67: 454-457.
47. Blanpain C, Knoop C, Delforge ML ve ark. Reactivation of hepatitis B after transplantation in patients with pre-existing anti-hepatitis B surface antigen antibodies: report on three cases and review of the literature. Transplantation. 1998; 66: 883-886.

48. Coiffier B. Hepatitis B virus reactivation in patients receiving chemotherapy for cancer treatment: role of Lamivudine prophylaxis. *Cancer Invest.* 2006; 24: 548-552.
49. Kılıçturgay K. Viral Hepatitte İmmünopatogenez. In: Tekeli E, Balık İ (Eds). *Viral hepatit 2003. Viral hepatitle Savaşım Derneği, Ankara 2003; 315-318.*
50. Wai CT and Lok AS. Treatment of Hepatitis B. *J Gastroenterol* 2002; 37: 771-778.
51. Çelik İ. Akbulut Ayhan. Kronik Hepatit B ve Delta Hepatitinin Doğal Seyri. In: Köksal İ. Leblebicioğlu H: *Kronik Viral Hepatitlerin Tanı ve tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, Ankara 2009; 25-39.*
52. Servoss JC, Friedman LS. Serologic and molecular diagnosis of hepatitis B virus. *Infect Dis Clin N Am* 2006; 20: 47-61.
53. Janssen HLA, Zonnevald M, Senturk H ve ark. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 2005; 365: 123-129.
54. Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH ve ark. A treatment algorithm for the Management of Chronic Hepatitis B Virus Infection in the United States: 2008 Update. *Clin Gastroenterology and Hepatology* 2008; 6(12): 1315-1341.
55. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009 doi:10.1016/j.jhep. 2008.10.001.
56. Yuen MF, Fong DY, Wong DK ve ark. Hepatitis B virus DNA levels at week 4 of lamivudine treatment predict the 5-year ideal response. *Hepatology* 2007; 46(6): 1695-703
57. Yang HI, Lu SN, Liaw YF ve ark. Hepatitis B e antigen and risk of hepatocellular carcinoma. *N Eng J Med* 2002; 347(3): 168-74.
58. Haris RA, Chen G, Lin WY ve ark. Spontaneous clearance of high-titer serum HBV DNA and risk of hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Cancer Causes Control* 2003; 14(10): 995-1000

59. Mast E, Weinbaum CM, Fiore AE ve ark. 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*; 2006; 55 (RR16) ; 1-25.
60. Fabrizi F, Dulai G, Dixit V ve ark. Meta-analysis: interferon for the treatment of chronic hepatitis C in dialysis patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 1071.
61. Russo MW, Goldsweig CD, Jacobson IM ve ark. Interferon monotherapy for dialysis patients with chronic hepatitis C: an analysis of the literature on efficacy and safety. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1610.
62. Prati D, Taioli E, Zanella A ve ark. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med* 2002; 137(1): 1-10.
63. Kariv R, Leshno M, Beth-Or A ve ark. Re-evaluation of serum alanine aminotransferase upper normal limit and its modulating factors in a large-scale population study. *Liver Int* 2006; 26(4): 445-450.
64. Bonino F, Marcellin P, Lau GK ve ark. Predicting response to peginterferon alpha-2a, lamivudine and the two combined for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Gut* 2007; 56: 699 -705.
65. Perrillo RP, Lai CL, Liaw YF ve ark. Predictors of HBeAg loss after lamivudine treatment for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002; 36: 186-194.
66. Nair S, Perrillo RP. Serum alanine aminotransferase flares during interferon treatment of chronic hepatitis B: is sustained clearance of HBV DNA dependent on levels of pretreatment viremia? *Hepatology* 2001; 34(5): 1021-6.
67. Kim HC, Nam CM, Jee SH ve ark. Normal serum aminotransferase concentration and risk of mortality from liver diseases: prospective cohort study. *BMJ* 2004; 328(7446): 983.
68. Chen CJ, Yang HI, Su J ve ark. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295: 65-73.

69. Yuen MF, Yuan HJ, Wong DK ve ark. Prognostic determinants for chronic hepatitis B in Asians: therapeutic implications. *Gut* 2005; 54(11): 1610-14.
70. Lai M, Hyatt BJ, Nasser I, et al. The clinical significance of persistently normal ALT in chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 2007; 47: 760-767.
71. Kausz A, Pahari D. The value of vaccination in chronic kidney disease. *Semin Dial* 2004; 17: 9.
72. Kamar N, Toupance O, Buchler M ve ark. Evidence that clearance of hepatitis C virus RNA after alpha-interferon therapy in dialysis patients is sustained after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2092.
73. Gupta SK, Pittenger AL, Swan SK ve ark. Single-dose pharmacokinetics and safety of pegylated interferon-alpha2b in patients with chronic renal dysfunction. *J Clin Pharmacol* 2002; 42: 1109.
74. Sönmez E. Antiviral direnç monitorizasyonu ve klinik yararı. *Klinik Dergisi* 2001; 14: 66-70.
75. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update of recommendations. *Hepatology* 2004; 39: 1-5.
76. Liaw YF, Chien RN, Yeh CT ve ark. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. *Hepatology* 1999; 30: 567-572.
77. Liaw YF. The current management of HBV drug resistance. *J Clin Virol* 2005; 34: 143-146.
78. Suzuki F, Suzuki Y, Tsubota A ve ark. Mutations of polymerase, precore and core promoter gene in hepatitis B virus during 5-year lamivudine therapy. *J Hepatol* 2002; 37: 824-830.
79. Yuen MF, Sablon E, Hui CK ve ark. Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* 2001; 34: 785-791.
80. Akuta N, Tsubota A, Suzuki F ve ark. Long-term prognosis by lamivudine monotherapy for severe acute exacerbation in chronic hepatitis B infection:

- emergence of YMDD motif mutant and risk of breakthrough hepatitis – an open-cohort study: *J Hepatol* 2003; 38: 91-97.
81. Chan HLY, Leung NWY, Hui AY ve ark. A randomized, controlled trial of combination therapy for chronic hepatitis B: comparing pegylated interferon- α 2b and lamivudine with lamivudine alone. *Ann Intern Med* 2005; 142: 240-250.
 82. Dienstag JL. Hepatitis B Virus Infection. *NEJM* 2008; 359: 1486-1500
 83. Lok AS, Lai CL, Leung N ve ark. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2003; 125: 1714-1722.
 84. Xu XW, Chen YG. Current therapy with nucleoside/nucleotide analogs for patients with chronic hepatitis B. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 350-359.
 85. Yenice N, Mehtap Ö, Arıcan N, Gökden Y. Kronik hepatit B enfeksiyonunda lamivudin monoterapisi, interferon alfa monoterapisi ve kombinasyon tedavisi. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi* 2006; 5: 31-35.
 86. Chieochansin T, Chutinimitkul S, Payungporn S ve ark. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutations by PCR-based methods. *Tohoku J Exp Med* 2006; 210: 67-78.
 87. Torresi J, Locarnini S. Antiviral chemotherapy for the treatment of hepatitis B virus infections. *Gastroenterology* 2000; 118: 83-103
 88. Kirishima T, Okanoue T, Daimon Y ve ark. Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. *J Hepatol* 2002; 37: 259-265.
 89. Jardi R, Buti M, Rodriguez-Frias F ve ark. Rapid detection of lamivudine resistant hepatitis B virus polymerase gene variants. *J Virol Methods* 1999; 83: 181-187.
 90. Chien RN, Liaw YF, Atkins M. Pretherapy alanine transaminase level as a determinant for hepatitis B e antigen seroconversion during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1999; 30: 770-774.

91. Si Ahmed N, Tavan D, Pichoud C ve ark. Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000; 32: 1078-1088.
92. Fournier C, Zoulim F. Antiviral therapy of chronic hepatitis B: prevention of drug resistance. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 869-892.
93. European Association for the Study of the Liver. *EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B*. *J Hepatol* 2008.
94. Lee CZ, Lee HS, Huang GT ve ark. Detection of YMDD mutation using mutant-specific primers in chronic hepatitis B patients before and after lamivudine treatment. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5301-5305.
95. Pallier C, Castéra L, Soulier A ve ark. Dynamics of hepatitis B virus resistance to lamivudine. *J Virol* 2006; 80: 643-653.
96. Chang UI, Lee YC, Wie SH ve ark. Evolution of viral load and changes of polimerase and precore/core promoter sequences in lamivudine-resistant hepatitis B virus during adefovir therapy. *J Med Virol* 2007; 79: 902-910.
97. Liu K, Hou W, Zumbika E ve ark. Clinical features of chronic hepatitis B patients with YMDD mutation after lamivudine therapy. *J Zhejiang Univ SCIENCE B* 2005; 6: 1182-1187.
98. Ryu SH, Chung YH, Choi MH ve ark. Long-term additional lamivudine therapy enhances durability of lamivudine-induced HBeAg loss: a prospective study. *J Hepatol* 2003; 39: 614-619.
99. Huang ZM, Huang QW, Oin YQ ve ark. YMDD mutations in patients with chronic hepatitis B untreated with antiviral medicines. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 867-870.
100. Lai CL, Dienstag J, Schiff E ve ark. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 687-696.

101. Guan R, Lai CL, Liaw YF ve ark. Efficacy and safety of 5 years lamivudine treatment of Chinese patients with chronic hepatitis B (abstr). *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(suppl): A60.
102. Peters M, Hann HW, Martin P ve ark. Adefovir dipivoxil alone or in combination with lamivudine in patients with lamivudine resistant chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2004; 126: 91-101.
103. Keeffe EB, Dieterich DT, Pawlotsky JM ve ark. Chronic hepatitis B: preventing, detecting, and managing viral resistance. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 268-274
104. Liaw YF. Impact of YMDD mutations during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Chem Chemother* 2001; 12: 67-71.
105. Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, et al. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years. *Gastroenterology* 2006; 131: 1743-1751.
106. Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH, 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: 936-962.
107. Fung SK, Wong F, Hussain M ve ark. Sustained response after a 2-year course of lamivudine treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2004; 11: 432-438.
108. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition *Xenobiotica*. Jul; 2008; 38(7-8): 802-32.
109. Sezak M. Ewing karsinomunda p-glikoprotein ekspresyonunun prognostik anlamı *Ege Tıp Dergisi*; 2008; 47(1): 7-13.
110. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N ve ark. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to Genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 297 (3): 1137-43.
111. Germann. U.A. P-Glycoprotein a mediator of multidrug resistance in tumour cells. *European Journal of Cancer*, 1996; vol 32A, no.6: 927-944.

112. Hoffmeyer S, Burk O, Richter O ve ark. Functional polymorphisms of the human multidrug- resistance gene: Multipl sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. Proc Natl Acad Sci, 2000; 97(7):3473- 78.
113. Kaya P, Gündüz U, Arpacı F ve ark. Identification of polymorphisms on the MDR1 gene among Turkish population and their effects on multidrug resistance in acute leukemia patients. Am J Hematol. 2005; 80 (1): 26–34.
114. Fromm M.F. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. Trends in Pharmacological Sciences, Amsterdam, 2004; v.25, n.8; p.423-429.
115. Mealey K.L. Therapeutic implications of the MDR1 gene. J Vet Pharmacol Ther, Baltimore, 2004; v.27: 257-264.
116. Schinkel A.H.Mammalian Drug Efflux transporters of the ATP binding caseete family Adv Drug Deliv Rev; 2003; 55: 2–29.
117. Okyar A. P-glikoprotein ve P-glikoproteininin ilaç Farmakokinetiğindeki Rolü. Türk Farmakoloji Bülteni 2005; sayı:83 Ocak-Mart.
118. Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N ve ark. Response to long-term lamivudine treatment in patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B, and C. J Med Virol 2006; 78: 1276-1283.
119. Yuen MF, Yuan HJ, Sablon E ve ark. Long-term follow-up study of Chinese patients with YMDD mutations: significance of hepatitis B virus genotypes and characteristics of biochemical flares. J Clin Microbiol 2004; 42: 3932-36.
120. Yurdaydın C, Bozkaya H, Çetinkaya H ve ark. Lamivudine vs lamivudine and interferon combination treatment of HBeAg (-) chronic hepatitis B. J Viral Hepat 2005; 12: 262-268.
121. Niro GA, Santantonio T, Fontana R, Insalata M ve ark. Re-treatment of patients with anti-HBe-positive chronic hepatitis B who relapsed after an initial course of lamivudine. Aliment Pharmacol Ther 2003; 18: 933-940.

122. Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A ve ark. Course of virologic breakthroughs under long-term lamivudine in HBeAg-negative precore mutant HBV liver disease. *Hepatology* 2002; 36: 219-226.
123. Tang K, Ngoi SM, Gwee PC ve ark. Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetics*. 2002; 12: 437-450.
124. Sakaeda T. MDR1 genotype-related pharmacogenetics: Fact or fiction? *Drug Metab Pharmacokinet*. 2005; 20: 391-414.
125. Schwab, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003; 43: 285-307.
126. Tsuruo T. Lida H. Tsukagoshi S ve ark. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil *Cancer Res*. 1981; 41: 1967-1972.
127. Ross DD. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia*; 2000; 467-473.
128. Takeshita H, Gebhardt MC, Springfield DS ve ark. Experimental models for the study of drug resistance in osteosarcoma: P-glycoprotein-positive, murine osteosarcoma cell lines. *J Bone Joint Surg Am Mar*; 1996; 78(3): 366-75.
129. Tischler D, Weinberg K, Hinton D.R ve ark. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia*, 1995. 36: 1- 6.
130. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P ve ark. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest*, 1999; 104 (2): 147-153.
131. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C ve ark. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2003; 124: 26-33.
132. Lee W, Lochart C, Richard B ve ark. Cancer pharmacogenomics: Powerful tools in cancer chemotherapy and drug development. *The Oncologist*. 2005; 10: 104-111.

133. Kimchi-Sarfaty C, Marple AH, Shinar S ve ark. Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene. *Pharmacogenomics*. 2007; 8(1): 29-39.
134. Fellay J, Mariolini C, Meaden E R ve ark. Swiss HIV Cohort Study. Response to antiretroviral treatment in HIV- 1 -infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: A pharmacogenetics study. *Lancet*, 359 (9300): 30-36, 2002.
135. Alagözlü H, Timuçin M, Yılmaz AK ve ark. Tedaviye yanıtız hepatit C hastalarında “Multidrug Resitans Gen” mutasyon araştırması. 6. Hepato Gastroenteroloji Kongresi 23-27 Eylül, Antalya.