

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEPATİT B VİRUS İLAÇ DİRENCİ MUTASYONLARININ
PYROSEQUENCİNG METODU İLE TESPİTİ**

Mehmet ÇİMENTEPE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN

ADANA-2014

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HEPATİT B VİRUS İLAÇ DİRENCİ MUTASYONLARININ PYROSEQUENCING METODU İLE TESPİTİ

Mehmet ÇİMENTEPE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Fügen YARKIN

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu TF2013YL7
numaralı proje olarak desteklenmiştir.**

ADANA-2014

KABUL VE ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
“Hepatit B Virus İlaç Direnci Mutasyonlarının pyrosequencing Metodu ile Tespiti”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 25 / 07 / 2014

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Fügen YARKIN
Çukurova Üniversitesi
Başkan


Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Çukurova Üniversitesi
Raportör


Doç. Dr. Aslıhan CANDEVİR
Çukurova Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Şeref ERDOĞAN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tez konumun seçilmesinde ve hazırlanmasında, tüm çalışmalarında bana yol gösteren, engin bilgisi ve tecrübesiyle yardım ve desteğini esirgemeyen, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Fügen Yarkın'a, yetişmemde emeği geçen Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Fatih Kösal'a ve sayın Prof. Dr. Akgün Yaman'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Enfeksiyon Hastalıkları ve Gastroenteroloji Bilim Dalı'ndaki görevli hocalarıma ve doktorlarına tez çalışmama katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Viroloji Bilim Dalı Laboratuvarında büyük bir keyifle birlikte çalıştığım viroloji ekibi; Dr. Deniz Yıldırım, Buket Şeflek, Deniz Özdoğru, Seher Öksüz ve Gülcan Bozan'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da beni manevi açıdan sürekli olarak destekleyen aileme ve bu uzun süreçte her zaman yanımda olarak desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Özge Öztürk'e sonsuz teşekkürler...

Mehmet ÇİMENTEPE

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Sınıflandırma	6
2.3. Virusun Yapısı	6
2.4. Genom Yapısı	8
2.5. Virus Proteinleri	10
2.5.1. Yüzey Proteinleri	10
2.5.2. Kor Proteinleri	12
2.5.3. X Protein	13
2.5.4. Polimeraz Protein	13
2.6. Virusun Replikasyonu	14
2.7. HBV Subgenotip ve Genotipleri	17
2.8. HBV Genomundaki Mutasyonlar	19
2.8.1. Bazal Kor Promoter, Prekor ve Kor Mutasyonları	20
2.8.2. X Mutasyonları	22
2.8.3. S Mutasyonları	23

2.8.4. P Mutasyonları	23
2.9. Patogenez	24
2.9.1. Virusun İmmun Cevaptan Kaçış Mekanizması	26
2.10. Hastalık	27
2.10.1. Akut HBV Enfeksiyonu	27
2.10.2. Kronik HBV Enfeksiyonu	28
2.11. Epidemiyoloji	32
2.11.1. Bulaş Yolları	33
2.12. Tedavi	36
2.12.1. Pegile İnterferon	38
2.12.2. Nükleoz(t)id Analogları	39
2.12.2.1. Lamivudin	40
2.12.2.2. Telbivudin	41
2.12.2.3. Entecavir	42
2.12.2.4. Adefovir	42
2.12.2.5. Tenofovir	43
2.13. Antiviral İlaç Direnci	44
2.13.1. İlaç Direnci Gelişmesindeki Mekanizmalar	44
2.13.2. İlaç Direncinin Temel Prensipleri	45
2.13.3. İlaç Direncinin Klinik Sınıflandırılması	48
2.13.4. İlaç Direncinin Moleküler Mekanizması	49
2.13.5. Çapraz Direnç	50
2.13.6. Çoklu İlaç Direnci	51
2.13.7. Antiviral İlaç Direnci Mutasyonları	51
2.13.7.1. Lamivudin İlaç Direnci Mutasyonları	52
2.13.7.2. Telbivudin İlaç Direnci Mutasyonları	53
2.13.7.3. Entecavir İlaç Direnci Mutasyonları	53
2.13.7.4. Adefovir İlaç Direnci Mutasyonları	54
2.13.7.5. Tenofovir İlaç Direnci Mutasyonları	55
2.13.8. İlaç Dirençli HBV ile Enfekte Hastaların Tedavisi	56
2.13.9. Antiviral İlaç Direncinin Önlenmesi	58
2.14. Tanı	60
2.14.1. Serolojik Tanı	60
2.14.2. Moleküler Tanı	62

2.14.3. HBV İlaç Direnç Testleri	63
2.14.3.1. Genotipik Metodlar	63
2.14.3.2. Fenotipik Metodlar	66
2.14.3.3. İndirekt Metodlar	68
2.15. Korunma ve Kontrol	68
3. GEREÇ veYÖNTEM	70
3.1. Viral DNA Ekstraksiyonu	70
3.2. PyroStar HBV İlaç Direnç Testi	72
3.2.1. HBV Real-Time PCR Testi	72
3.2.3. Pyrosequencing Metodu	73
4. BULGULAR	76
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	100
7. KAYNAKLAR	102
8. ÖZGEÇMİŞ	112

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. HBV partikülleri	8
Şekil 2. HBV'un genom yapısı	10
Şekil 3. HBV'un replikasyonu	17
Şekil 4. Akut hepatit B'nin doğal seyri	28
Şekil 5. Akut HBV enfeksiyonun kronik enfeksiyona ilerlemesi	32
Şekil 6. HBV ilaç dirençli mutantların seçilim mekanizması	47
Şekil 7. HBV ilaç direnci mutasyonları	52
Şekil 8. HBV revers transkriptazda HBV ilaç direnci mutasyonlarının yerleşimi.	56
Şekil 9. Örneklerin izolasyon cihazına yerleştirilmesi	71
Şekil 10. Çalışma istasyonu (Work station)	75
Şekil 11. Kartuş	75

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. HBV genotiplerinin dağılımı	19
Tablo 2. HBV enfeksiyonunun bulaşma yollarına göre risk grupları	36
Tablo 3. HBV real-time PCR sıcaklık döngüleri	73
Tablo 4. Hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı	76
Tablo 5. Hastaların HBV'a ait serolojik, biyokimyasal ve histolojik bulguları	77
Tablo 6. İlaç direnci görülen hastaların demografik verileri ve laboratuvar bulguları	79
Tablo 7. Kronik HBV enfeksiyonu olan 48 hastanın tedavisinde verilen ilaçlar	80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADV	Adefovir
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
ATP	Adenozin Trifosfat
AuAg	Avustralya Antijeni
cccDNA	Covalently Closed Circular DNA
DNA	Deoksiribonucleic Acid
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DHBV	Duck Hepatitis B Virus (Ördek Hepatit B virus)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplazmik Retikulum
ETV	Entecavir
FDA	Food and Drug Administration
GTP	Guanozin Trifosfat
GSHBV	Ground Squirrel Hepatitis B Virus (Tarla Sincabı Hepatit B Virus)
HBV	Hepatit B virus
HBcAg	Hepatit B core Antigen (Hepatit B kor Antijeni)
HBeAg	Hepatit B early Antigen (Hepatit B erken Antijeni)
HBsAg	Hepatit B surface Antigen (Hepatit B yüzey Antijeni)
HBIG	Hepatit B immnoglobulin
HCC	Hepatocellular Carcinoma (Hepatosellüler Kanser)
HHBV	Heron Hepatitis B Virus (Balıkçıl Hepatit B Virus)

HIV	Human Immunodeficiency Virus
IC₅₀	%50 Inhibitory Concentration
IFN	Interferon
KHB	Kronik Hepatit B
LAM	Lamivudin
LHBs	Large HBs
MALDI TOF/MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
MAVS	Mitochondrial Antiviral Signalling
MDA5	Melanoma Differentiation-Associated Protein 5
MHBs	Middle HBs
MHC	Major Histocompatibility Complex
NA	Nükleoz(t)id Analog
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG-IFN	Pegile Interferon
PgRNA	Pregenomik RNA
PRRs	Pattern Recognition Receptors
RC DNA	Relax Circular DNA (Relax Sirküler DNA)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIG-1	Retinoic Acid-Inducible Gene-1
TDF	Tenofovir
TEL	Telbivudin
TLR	Toll-Like Receptor
YIDD	Tyrosine-Isoleucine-Aspartate-Aspartate
YMDD	Tyrosine-Methionine-Aspartate-Aspartate
YVDD	Tyrosine-Valine-Aspartate-Aspartate
WHO	World Health Organization

ÖZET

Hepatit B Virus İlaç Direnci Mutasyonlarının Pyrosequencing Metodu ile Tespiti

Kronik hepatit B virus (HBV) enfeksiyonun uzun süreli tedavisi sırasında nükleoz(t)id analoglarına karşı ilaç direnci mutasyonlarının gelişmesi tedavi başarısızlığına yol açan önemli bir sorundur. Bu çalışmanın amacı kronik hepatit B enfeksiyonu olan hastalarda HBV ilaç direnci gen mutasyonlarının pyrosequencing metodu ile araştırılmasıdır. Kasım 2013 ve Mayıs 2014 tarihleri arasında kronik hepatit B enfeksiyonu olan 89'u tedavi almayan (naif) ve 48'i tedavi alan toplam 137 hastaya ait serum örnekleri lamivudin (LAM), adefovir (ADV), telbivudin (TEL), entecavir (ETV) ve tenofovir (TDF) ile ilişkili ilaç direnç mutasyonlarının tespiti için real-time PCR testi sonrası pyrosequencing metodu (PyroStar HBV Drug Resistance Test, Altona Diagnostics, Germany) ile analiz edilmiştir. Tedavi almayan 89 hastada, TDF'e duyarlılığı azaltan rtA194T mutasyonu 1(%1.1) vakada bulunmuştur. Tedavi edilen 48 hastada, LAM ve TEL'e ilaç direnci ve ETV'e karşı da çapraz dirence sebep olan rtM204I mutasyonu 1 (%2.1) vakada tespit edilmiştir. Kompensatuvar mutasyon olan rtL180M 2 (%4.2) hastada gözlenmiştir. ETV direncini gösteren rtT184S mutasyonu ile birlikte rtM204V'in varlığı 1 (%2.1) hastada tespit edilmiştir. Sonuç olarak, ilaç direnci mutasyonlarının insidansı tedavi alan hasta grubunda %8.3 ve tedavi almayan grupta %1.1 olarak bulunmuştur. Kronik hepatit B enfeksiyonu olan hastalarda tedavi öncesi ve sırasında pyrosequencing metodu ile ilaç direnci mutasyonlarının erken tanısı uygun antiviral ilaç seçimine katkıda bulunacaktır.

Anahtar Sözcükler: Hepatit B virus ilaç direnci, pyrosequencing metodu, lamivudin, adefovir, telbivudin, entecavir, tenofovir.

ABSTRACT

Detection of Hepatitis B Virus Drug Resistance Mutations by Pyrosequencing Method

The development of drug resistance mutations to nucleos(t)ide analogues during long term therapy of chronic hepatitis B virus (HBV) infection is a major concern leading to treatment failure. The aim of this study is to investigate of HBV drug resistance gene mutations in patients with chronic hepatitis B infection by pyrosequencing method. Between December 2013 and May 2014, serum samples collected from 137 patients of which 89 untreated (naive) and 48 treated patients with chronic hepatitis B infection were analyzed with real-time PCR test followed by pyrosequencing method (PyroStar HBV Drug Resistance Test, Altona Diagnostics, Germany) for drug resistance mutations associated with lamivudin (LAM), adefovir (ADV), telbivudin (TEL), entecavir (ETV) and tenofovir (TDF). Among 89 untreated patients, rtA194T mutation that may reduce susceptibility to TDF was found in 1 (1.1%) case. In 48 treated patients, rtM204I mutation causing drug resistance to LAM, TEL and also cross-resistance to ETV was detected in 1 (2.1%) case. Compensatory mutation rtL180M was observed in 2 (4.2%) patients. The presence of rtM204V combined with rtT184S mutation indicating ETV resistance was detected in 1 (2.1%) patient. In conclusion, the incidence of drug resistance mutations were found as 8.3% in treated and 1.1% in untreated patient group. Early detection of drug resistance mutations by pyrosequencing method before and during treatment of patients with chronic hepatitis B infection would contribute to the selection of appropriate antiviral drug.

Key Words: Hepatitis B virus drug resistance, pyrosequencing method, lamivudin, adefovir, telbivudin, entecavir, tenofovir.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hepatit B virus (HBV) enfeksiyonu tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünyada yaklaşık iki milyar kişi HBV ile enfekte olup bunların 350 milyonu HBV taşıyıcısıdır¹. HBV enfeksiyonu sadece fulminan, subfulminan ve kronik hepatit ile sonuçlanmayıp, aynı zamanda siroz ve hepatosellüler kanserin (Hepatocellular Carcinoma; HCC) gelişimine de yol açar². Her yıl yaklaşık bir milyon kişi HBV'una bağlı siroz ve HCC sebebiyle ölmektedir³.

HBV enfeksiyonun laboratuvar tanısı için serolojik ve moleküler yöntemler kullanılır. Serolojik tanı ile HBV'a ait antijenler ve HBV'a karşı oluşan antikorlar saptanmaktadır. HBV göstergelerinin tespitinde en yaygın olarak kullanılan serolojik test ELISA (Enzyme-Linked İmmuno Sorbent Assay) testidir. Serolojik tanıda ilk adım, HBV enfeksiyonunun akut veya kronik olduğunun saptanmasıdır. Moleküler yöntemler kantitatif viral yük testleri, genotiplendirme testleri, ilaç direnci için mutasyon varlığını saptayan testler ve kor promoter/prekor bölge mutasyon testleridir⁴.

Kronik hepatit B tedavisi için interferonlar ve 5 nükleoz(t)id analogu (NA) kullanılır. NA'ları lamivudin, telbivudin, entecavir, adefovir ve tenofovir'dir. Bu antiviraller viral replikasyonun baskılanmasında etkili olup çok az yan etkilere sahiptir. Bu avantajlarına rağmen NA'ları HBV'u tamamen eradike etmez. Ancak klinik faydası HBV replikasyonun baskılanmasını sürdürebilmeye dayanır. Ne yazık ki uzun süreli NA ile tedavinin temel kısıtlaması tedavi başarısızlığında en önemli faktör olarak ortaya çıkan ilaç direncidir. Ayrıca ilaç direnci karaciğer hastalığının ilerlemesine sebep olur. Bu yüzden NA'larına karşı ilaç direncinin tespiti uygun tedavinin planlanması ve direnç görülen hastalarda tedavi yönetimi için önemlidir. Ayrıca direnç gösteren HBV mutanı diğer kişilere de bulaşabilmektedir⁵.

Lamivudin (LAM), 1998 yılında kronik hepatit B tedavisinde günde 100 mg doz olarak FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanan ilk oral sistin nükleozid analogudur. LAM'in temel dezavantajı tedaviden 8 yıl sonra genotipik direnç ile ilişkili mutasyonların %76 kadar yüksek oranında olmasıdır. LAM direncinden sorumlu temel mutasyonlar rtM204V ve rtM204I'dır. rtM204V mutasyonu genellikle rtL180M ile birlikte meydana gelir iken rtM204I tek başına veya rtL180M ile meydana gelebilir. rtL180M, rtM204V/I mutantlarının defektif replikasyonu onarır ve ilaç direncini de artırır⁶.

Diğer bir kompensatuvar mutasyon olan rtV173L, rtM204V/I ve rtL180M mutasyonları ile meydana gelir ve viral replikasyonu artırabilir. LAM'e karşı direnç veren diğer mutasyon rtA181T/V ADV'e çapraz direnç veren bir mutasyondur⁷.

Entecavir (ETV), yüksek direnç bariyerine sahiptir. Bu sebeple direnç gelişimi nadirdir. Tedavi almamış hastalarda 5 yıllık tedaviden sonra sadece %1.2'dir. ETV'e karşı yüksek genetik bariyer olması sebebi ile direnç gelişmesi için 3 mutasyonun oluşması gerekir. LAM direncinden sorumlu rtM204V ve rtL180M mutasyonlarına ilaveten rtI169T, rtT184G, rtS202I veya rtM250V mutasyonu ETV direncine sebep olur. Böylece LAM direnci mutasyonlarının varlığı ETV direnç gelişme riskini artırır. LAM'e cevap vermeyen hastalarda 5 yıllık tedaviden sonra direnç oranı %51'dir^{8,9}.

Adefovir (ADV), adenosin monofosfatın nükleotid analogu olup HBV DNA replikasyonunun baskılanmasında nispeten yüksek etkiye sahiptir. Antiviral direncin ortaya çıkma oranı tedavi sırasında LAM ile karşılaştırıldığında daha düşüktür. Direnç oranı tedavinin 5 yılından sonra % 30'dur. HBV polimerazın B domaininde rtA181T/V mutasyonu ve D domaininde rtN236T mutasyonu genellikle temel ADV ilaç direnci mutasyonu olarak kabul edilir ve ADV'e duyarlılığı 5-10 kat azalttığı görülmüştür⁸.

Telvivudin (TEL, LdT), doğal olarak timidinin nükleotidi olan modifiye edilmiş L izomeridir. TEL'in yüksek antiviral etkisinden dolayı direnç oranı tedaviden 2 yıl sonra HBeAg pozitif hastalarda %25.1 ve HBeAg negatif hastalarda %10.8 gibi yüksektir. Ayrıca 3. yılda gelişen direnç oranı HBeAg pozitif hastalarda %11.3 ve HBeAg negatif hastalarda %6.5'dir. TEL ile tedavinin 3 yılından sonra direnç oranı %30 kadardır. TEL'e başlıca direnç veren ana mutasyon rtM204I'dır. Bu rtL80V/I ve

rtL180M mutasyonu ile birlikte olabilir veya olmayabilir. TEL ile ilişkili diğer mutasyonlar rtA181T ve rtL229W/V'dir¹⁰⁻¹².

Tenofovir (Tenofovir disoproxil fumarate; TDF), human immunodeficiency virus (HIV) tedavisinde kullanılan asiklik nükleotid analogudur. Son yıllarda HBV'a karşı güçlü aktivitesinden dolayı kronik hepatit B tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. HIV ile koenfektif kronik hepatit B'li hastalarda rtA194T mutasyonun TDF direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. ADV direnci ile ilişkili rtA181T ve rtN236T mutasyonlarının in vitro çalışmalarda TDF'e duyarlılığı azalttığı bildirilmiştir¹³.

Bu çalışmamızın amacı, kronik hepatit B hastalarında LAM, TEL, ETV, ADV ve TDF ilaçlarına karşı HBV ilaç direnci gen mutasyonlarının pyrosequencing metodu ile araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Viral hepatitin bulaşıcı olduğu ilk kez 1885 yılında Lürmann tarafından su çiçeği aşı kampanyası sonrasında meydana gelen “sarılık epidemisi” sırasında gözlenmiştir. Su çiçeği aşısı muhtemelen diğer aşıları kişilerdeki aşırıya bağlı lezyonlardan elde edilen lenfden hazırlanmıştır. Hepatit salgınları 1942 yılında 50.000 klinik vaka ile Amerika Birleşik Devletleri ordusunun personeli arasında sarı humma aşısı yapılanlarda gözlemlenmiştir. Retrospektif analiz salgında muhtemelen 280.000 kişinin hepatit B virus ile enfekte olduğunu göstermiştir. Geçen yüzyılın ilk yarısında epidemiyolojik gözlemler sonucu HBV’un en az iki tipi olduğu vurgulanmıştır. Hepatit tip A başlıca çocuklara dışkı ile kontamine su, içecek veya yiyecek ile bulaşır ve asla kronikleşme göstermemektedir. Hepatit tip B ise sıklıkla tedavi amacıyla verilen kan ya da serum verilmesi aracılığıyla veya kişiden kişiye inokülasyon sonucu bulaşmaktadır¹⁴.

Amerikalı doktor ve genetikçi Baruch Blumberg bazı hastalıklara, özellikle kansere karşı duyarlılık tespiti için genetik belirleyicileri çalışmak amacıyla 1950 ve 1960 yıllarında bütün dünyada çeşitli bölgelerden serum örnekleri toplamıştır. Blumberg, hemofili gibi hastalığı olanların çok sayıda donörden kan ürünlerini almasına bağlı olarak polimorfik serum proteinlerine karşı antikor geliştirdiğini immunolojik testleri kullanarak bulmuştur. Bu antikorlar aminoasit dizisinde insandan insana genetik farklılıklar gösteren proteinlerdir ve transfüzyondan sonra alıcılarda yabancı protein gibi davranır. Blumberg’in arkadaşı Harvey Alter’in 1963 yılında Avustralya’lı birçok yerlinin serumunda “HBsAg” olarak bilinen “Avustralya antijeni-Au” (Avustralya Antigen; AuAg) keşfetmesiyle viral hepatitler tarihinde yeni bir dönem başlamıştır. Blumberg ve arkadaşları bu buluşlarıyla 1965 yılında Nobel ödülü kazanmışlardır¹⁴.

İlk başta, Blumberg AuAg'nin daha önce bulduğu lipoprotein antijeni gibi polimorfik serum protein olduğuna inanmıştır. Blumberg ilk kez 1967 yılında bir yayında AuAg'in hepatit ile ilgili olabileceğini göstermiş, buna paralel olarak Alfred Prince, hepatit B'li hastaların kanında serum hepatit antijenini araştırmış ve 1968 yılında bunu bildirmiştir. Ancak çok geçmeden AuAg ile benzer olduğunun farkına varmıştır.

David S. Dane 1970 yılında AuAg'in immun komplekslerini elektron mikroskobu altında incelemesi sırasında AuAg'in sadece küçük pleomorfik partikül olmadığını, aynı zamanda içinde belirgin bir şekilde görülebilen kor olan yaklaşık 42 nm çapında virus benzeri objeler olduğunu keşfetmiştir ve "Dane" partikülü olarak adlandırmıştır. Kısa bir süre sonra 1971 yılında June Almeida, "Dane" partikülünden deterjanlarla muamele ile kor (core;c) partiküllerini ortaya çıkarmış ve hepatit B'li hastalarda bu kor antijenine karşı (Hepatit B core Antigen; HBcAg) oluşan antikorları göstermiştir. Dane partiküllerinin hepatit B'ye neden olan bir virus olduğunu ileri sürmüştür. AuAg zarfın yüzey antijeni (surface;s) olup HBsAg (Hepatit B surface Antigen) olarak adlandırılır. Ayrıca HBsAg'den oluşan yaklaşık 20 nm çapında filamentöz ya da sferik non-enfeksiyöz partiküller kanda 300 kat daha fazla bulunur. Bu durum Dane partiküllerinin ultrasantrifüj veya kromatografi ile saflaştırılmış AuAg preparasyonlarında tanınamamasına neden olur.

HBV'un hücre kültüründe ya da laboratuvar hayvanlarında üretilmemesi ve hasta serumlarında Dane partiküllerinin mililitrede birkaç nanogramdan fazla olmaması ve HBV'un nükleik asidinin direkt biyokimyasal tespitinin o dönemlerde mümkün olmaması sebebiyle birçok araştırmacı HBV genomunu indirekt metodlarla belirlemeyi denemiştir. Shalom Hirschman 1971 yılında saflaştırılmış AuAg preparasyonlarının DNA polimeraz ve retrovirus gibi revers transkriptaz içerdiğini iddia etmiş, ancak bu iddia onaylanmamasına rağmen HBV genomunun saptanmasına yol açmıştır. William S. Robinson 1973 yılında HBV'da endojen DNA polimeraz aktivitesi olduğunu ve 1974 yılında ise bu aktivitenin ürününün viral DNA olduğunu belirlemiştir¹⁴.

2.2. Sınıflandırma

Hepatit B virus zarflı DNA virusu içeren Hepadnaviridae ailesinin prototip bir üyesidir. Hepadnaviridae ailesinin temel özelliği; hepatotropizm göstermesi, tür özgüllüğü, viremi ve antijenemi ile akut ve kronik enfeksiyonlara neden olmasıdır. Bu ailede bulunan virusların virion yapısı, gen sayısı, polipeptit uzunluğu, konak farklılığı ve antijenik çapraz reaksiyonları dikkate alındığında memeli hayvan virusları orthohepadnavirus ve kanatlı hayvan virusları ise avihepadnavirus olmak üzere iki cins altında sınıflandırılmaktadır¹⁵.

Orthohepadnavirus'lar; human HBV, dağ sıçanı HBV (woodchuck HBV; WHBV), tarla sincabı HBV (ground squirrel HBV; GSHBV) ve siyah derili büyük maymunlar (woolly monkey), orangutanlar, goriller, gibbonlar ve şempanzeleri enfekte eden Eski Dünya ve Yeni Dünya primat viruslarını içermektedir. Primat viruslarının hepsi birbiri ile yakın ilişkilidir ve genellikle tek bir virus türünün suşları olarak kabul edilmektedirler. Ancak bunlardan sadece woolly monkey virusu, diğerlerinden %20 oranında nükleotid dizi farklılığı gösterdiği için ayrı bir tür olarak kabul edilmektedir. İnsan virusu dışındakiler de, non-human primat virusları olarak ayrılmaktadır. Rodent virusları ise, primat viruslarından farklı olup HBV'undan %40 oranında farklılık göstermektedir.

Avihepadnavirus'lar; duck (ördek) HBV (DHBV), heron (balıkçıl) HBV (HHBV), ross goose HBV, snow goose HBV ve stork HBV'unu içermektedir. Bu viruslar oldukça yaygın görülmekte olup Kuzey Amerika'da yaşayan balıkçıların %50 kadarının doğal olarak HHBV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Kuş virusları farklı kökenden gelmektedirler. Bu viruslar başka bir kuş virusu ile yakın ilişkili olup memeli virusları ile oldukça uzak ilişkilidirler¹⁵.

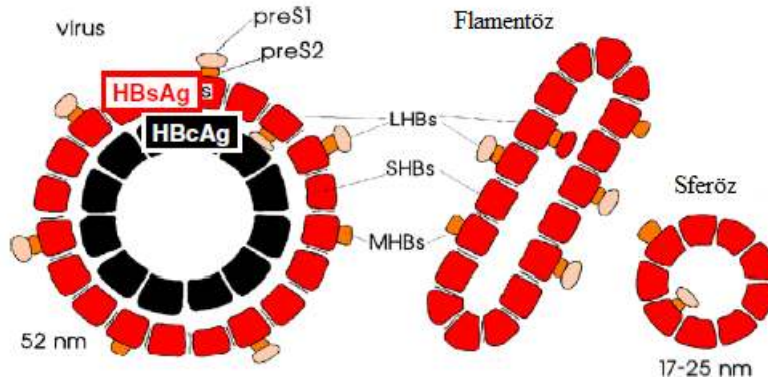
2.3. Virusun Yapısı

HBV, Hepadnaviridae ailesinin orthohepadnavirus cinsinde yer alan hepatotropik, zarflı yapıda ve kısmen çift sarmallı, sirküler en küçük DNA virusu olup

genomu yaklaşık olarak 3200 nükleotid uzunluğundadır. Hepadnaviridae ailesinin üyeleri içinde insanlarda enfeksiyon oluşturan tek tür HBV'dur.

Akut ve kronik HBV enfeksiyonlu hastaların serumu elektron mikroskobu altında incelendiğinde 3 tip partikül görülür. Lipid yapıda çift tabakalı 42 nm çapında sferik olan Dane partikülü tüm virionu temsil eder. Konağın hepatositlerinden derive dış lipid tabakada (eksternal) hepatit B yüzey antijeni bulunur ve zarf hepatit B kor antijenden oluşan ikozahedral yapıdaki nükleokapsidi çevreler. HBV genomu ve viral polimeraz nükleokapsid içerisinde bulunur. Diğer iki partikül yaklaşık 20 ile 22 nm çapında ya filamentöz ya da küçük sferik partikül olarak elektron mikroskobunda görülür (Şekil 1). Bu partiküller HBV genomundan yoksundur, sadece konak lipid ve HBsAg'den oluşur. Bu yüzden filamentöz ve sferik partiküller non-enfeksiyözür. Subvirion partiküller genellikle Dane partiküllerinden daha fazla bulunmaktadır. Ancak subvirion partiküllerin neden çok fazla sayıda üretildiği bilinmemektedir. Bu non-enfeksiyöz partiküller ve filamentözler immun sistem için tehdit olarak ve kronik enfeksiyon oluşumuna yardımcı olarak görev yapabilirler¹⁶.

Her 3 partikül yüksek viremili hastaların serumunda yüksek miktarda saptanabilen ve HBsAg adı verilen yüzey antijenine sahip olup immunojeniktir. Anti-HBs antikorları ile reaksiyon verirler. Enfeksiyöz olmayan partiküller daha fazla miktarda üretilir. Dane partiküllerin sayısı 10^4 - 10^9 /mL arasında iken enfeksiyöz olmayan ve kanda en fazla bulunan küresel partiküllerin miktarı 10^{13} /mL veya daha fazladır¹⁷.



Şekil 1. HBV partikülleri

HBV zarflı bir virus olmasına rağmen düşük pH, ısı, dondurma ve çözmeye dayanıklıdır. Bu özelliği virusun kişiden kişiye bulaşımını kolaylaştırmaktadır. HBV; 30-32°C’de en az altı ay, -20°C’de ise 15 yıl enfektivitesini korumaktadır. Serum içerisindeki virusun enfektivitesi doğrudan kaynatmakla iki dakikada, 121°C’de ve 0,5 atmosfer basınç altında 20 dakikada, 160°C’de kuru sıcak hava ile bir saatte kaybolmaktadır. HBsAg, %2,5 sodyum hipoklorit varlığında üç dakikada antijenitesini ve enfektivitesini yitirmektedir.

2.4. Genom Yapısı

HBV genomu, kısmen çift iplikli sirküler yaklaşık 3200 nükleotid uzunluğunda DNA molekülüdür. DNA zincirlerinden biri negatif polariteli olup tam uzunluktadır ve protein kodlayan negatif ipliğin 5’ ucu HBV polimerazın terminal protein bölgesine kovalent bir şekilde bağlanır. Diğer zincir olan pozitif zincir, değişken uzunlukta olup tam uzunluktaki zincirden kısadır. Pozitif polariteli DNA ipliğinin 5’ ucu, sentez sırasında primer olarak görev yapan ve 5’ucu kepli olan pregenomik mRNA transkript’in 19 nükleotid uzunluğundaki bir RNA parçasını taşır. Negatif ipliğin 3’ucu ise 8-9 nükleotidlik artık uç ile sonlanır. Bu bölge replikasyon sırasında süper kıvrımlı,

sirküler şeklinde çift iplikli cccDNA (covalently closed circular DNA) molekülünün oluşumunda rol oynar^{18,19}.

HBV genomu spesifik yapı ve fonksiyonu ile kısmen üst üste binen, 7 viral protein kodlayan 4 adet açık okuma çerçevesinden (Open Reading Frame; ORF) oluşmaktadır. Bunlar ORF-P, ORF-S, ORF-C ve ORF-X'dir²⁰.

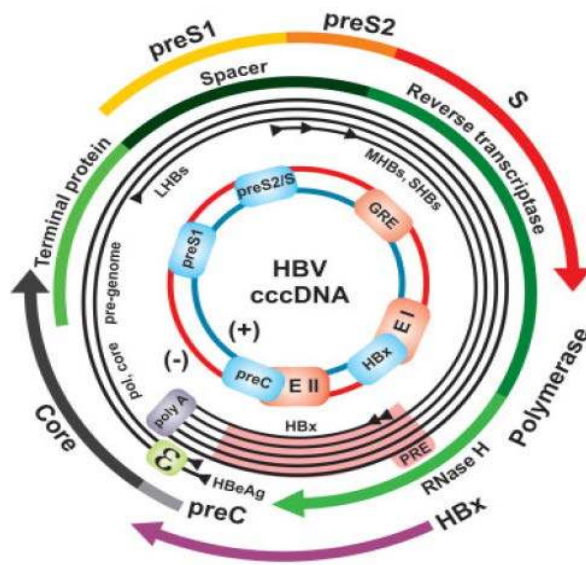
HBV'un yüzey zarf proteinlerini (HBsAg) kodlayan ORF-S (nt 2848-833) S geni, pre-S1 ve pre-S2 bölgelerinden oluşur (Şekil 2). Herbir bölge küçük (small), orta (medium) ve büyük (large) gibi 3 farklı yüzey proteini için kendi ATG başlama kodununu kodlama yeteneğine sahiptir. Bu proteinler farklı alanlar ve glikozilasyon durumuna göre ayırt edilebilir. Small protein, pre-S2 bölgesinden kodlanıp hastalarda yaygın bir şekilde görülür ve HBsAg yüzey antijenini temsil eder. Bu antijen tanıda en çok kullanılan ELISA kitlerinin hedefidir. Large protein pre-S1 bölgesinden kodlanıp kuvvetli immunojeniktir. Large proteindeki genetik çeşitlilik HBV'un subtiplerinin belirlenmesini sağlar^{18,21}.

En uzun ORF-P, (nt 2357-1621) viral genomun 3/4'ünü oluşturur. ORF-P revers transkriptaz fonksiyonu içeren DNA polimeraz, terminal protein bölgesi, 3 farklı katalitik alt bölgeyi birleştiren viral polimeraz ve RNase H'ı kodlar.

ORF-C, (nt 1814-2450) yapısal kor proteininin (nükleokapsid protein) bir parçası olan kor antijenini (HBcAg), kana sekrete edilen early (erken) antijenini (Hepatit B early Antigen; HBeAg) ve endoplazmik retikulum da (ER) translokasyon için sinyal peptidi içeren prekor dizisini kodlar. Prekor/kor proteinin ekspresyonu ile kor proteinin sentezi ve proteolitik işleme uğraması sonucu yapısal olmayan HBeAg yapılıır. HBeAg viral yaşam döngüsünde gerekli olmamasına rağmen enfeksiyonun kronikleşmesinde oldukça önemlidir^{18,19}.

ORF-X, (nt 1374- nt 1836) HBV ile ilişkili karaciğer kanserine neden olduğu düşünülen ve çeşitli gen düzenleyici fonksiyonlara sahip X proteini (HBxAg) kodlar. Yeni bilgiler HBx'in aslında yapısal olmayan bir protein olup başlıca HBV transkripsiyonunun epigenetik kontrolünü yaptığını düşündürmektedir^{22,23}.

Açık okuma çerçevelerine ek olarak HBV genomu; iki artırıcı (enhancer EI ve EII) dizisi, her iki zincirin 5' ucuna yerleşmiş iki adet 11 bazlık direkt tekrar dizileri (DR1 ve DR2), bir poliadenilasyon sinyali ve glikokortikoid yanıtı için bir alan glikokortikoid cevap elemanı (Glucocorticoid Responsive Element) içermektedir.



Şekil 2. HBV'un genom yapısı

2.5. Virus Proteinleri

2.5.1. Yüzey Proteinleri

HBV yüzey proteinleri translasyon başlama kodonundan açık okuma çerçevesinde (S-ORF) kodlanır, ancak 2 farklı mRNA'dan çevrilir. Bunlar MHBs (Middle HBs) ve SHBs (Small HBs) sentezine sebep olan 2,1 kb'lık transkript ve LHBs (Large HBs) sentezine neden olan 2,4 kb uzunluğundaki mRNA'dır. Transkripsiyon protein ekspresyonunun düzenlenmesini sağlayan ayrı promoter bölgesi ile sürdürülür¹⁸.

SHBs, 24 kDa ağırlığında 226 aminoasit uzunluğundan oluşan proteindir ve sadece S bölgesini içerir. SHBs en az 2 transmembran bölgesi (TM1-TM2) aracılığıyla ER membranına kotranslasyonel bir şekilde yerleşmiştir. Yapılan tahminlerde iç ve dış hidrofilik döngü ile bağlantılı 4 transmembran bölge (TM1-4) içerdiği öngörülmüştür. TM2 ve TM3 arasındaki dış bölge (aa 99-161) sürekli kullanılmayan N-146'daki N glikozilasyon alanını ve HBV'un ana antijenik determinantını (a,d/y ve w/r) taşır¹⁸.

MHBs, 33 kDa ağırlığında 281 aminoasitten oluşur ve N terminal Pre-S2 ve S bölgesini içerir. Pre-S2 bölgesi ER lümenine transloke olmuştur ve daima N-4'de N glikozillenme ve golgi aygıtında kısmen T-37'de O glikozillenme gerçekleşir. MHBs'nin fonksiyonu halen tam olarak anlaşılmamıştır. Orthohepadnavirus'larda yüksek oranda korunmasına rağmen MHBs virionun salınması, subviral partikülün oluşumu ve HBV'unun enfektivitesi için gerekli değildir. MHBs proteinin HBV'un karaciğer hücrelerine tutunmasında rolü olduğu düşünülmektedir. MHBs ve SHBs filamentöz partikülleri oluştururken sferik partiküller ise başlıca SHBs proteininden oluşur¹⁸.

LHBs, Pre-S1, Pre-S2 ve S bölgesi ile 4 transmembran (TM1-4) bölgesini içerir. LHBs protein 389-400 aminoasitlik ve 39 kDa moleküler ağırlığında olan bir moleküldür ve ER membran içerisine kotranslasyonel katılımından sonra, Pre-S (Pre-S1 ve Pre-S2) bölgesine sitozolik yerleşir. LHBs proteinin yaklaşık %50'si, pre-S bölgesi partikülün olgunlaşması sırasında posttranslasyonel bir şekilde ve hücrese reseptör ilişkisi için virionun dış kısmına yerleşir. Pre-S1 bölgesinin A-C terminali "cytolitic anchorage determinant" olarak bilinir. LHBs'nin Pre-S bölgesinin eksternal yönelimi hepatosit reseptörlerine HBV'un Pre-S1 ile bağlanması, viral giriş ve sonra enfeksiyon için gereklidir^{18,24}.

LHBs ve MHBs Dane partikülünde eşit miktarda bulunurlar ve tüm yüzey proteinlerinin %30'unu oluştururlar. SHBs ise Dane partikülünden 100 kat daha fazla sentezlenir ve enfekte hücreden salınır. Dane partiküllerinde LHBs: MHBs: SHBs oranı yaklaşık 1:1:4 şeklindedir. Kanda dolaşan S geni ürünlerinin yaklaşık %5-15'i MHBs, %1-2'si LHBs ve geri kalan kısmı SHBs proteininden oluşmaktadır²⁵.

2.5.2. Kor Proteinleri

HBcAg viral replikasyon için gerekli nükleokapsidin temel bileşenidir. HBcAg ORF-C açık okuma çerçevesinden oluşan pregenom tarafından kodlanır ve viral revers polimerazı paketleyen ikozahedral subviral partikülleri yapar. Virusun genotipine bağlı olarak 183-185 aminoasitten oluşur. HBcAg, HBeAg'den 1000 kat daha fazla immunojenik, hem bağımsız T hücre hemde bağımlı T hücre antijeni olarak fonksiyonu olan çok değerlikli bir proteindir. HBcAg'e T hücrelerin cevabının kronik hepatit B'nin (KHB) serokonversiyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir.

HBeAg in vitro koşullarda replikasyon için gerekli olmayan, ancak doğal enfeksiyon için önemli olan yardımcı bir proteindir. Bu protein viral replikasyon, enfektivite, hastalığın şiddeti ve tedaviye cevabın göstergesi olarak klinik de kullanılmaktadır. HBeAg intrauterin enfeksiyonda HBeAg/HBcAg spesifik T helper hücre toleransını oluşturarak perinatal geçiş sırasında sıklıkla kronik enfeksiyonu ile sonuçlanan viral enfeksiyonu sürdürmede rol oynayabilir²⁶.

HBeAg 1972 yılında Magnius ve Espmark tarafından keşfedilen proteindir. HBeAg HBV prekor gen (pre-C dizisi ve C geni) tarafından kodlanan prekor proteinin 212 aminoasit prekürsörden ayrıldıktan sonra elde edilir. HBeAg bütün Hepadnaviridae üyeleri arasında evrimsel olarak son derece korunur. Kor proteinin bir parçası olan HBeAg, pregenomun revers transkripsiyonu için polimeraz aktivitesinin düzenlemesi ve pregenomik RNA (pgRNA)'nın kapsidasyonu için gerekli nükleik asit bağlama aktivitesine sahiptir.

HBeAg immunodifüzyon agar jelde belirlenebilir ve plazmada 10 µg/mL'den daha fazla konsantrasyonda bulunur. Salgılanan HBeAg, HBcAg ve HBeAg'e T hücre toleransını oluşturarak intrauterin dönemde immun düzenleyici fonksiyona sahiptir. CD4⁺ hücreleri ile antijen tanımada HBeAg'inin immun düzenleyici rolü olduğu gösterilmiştir²⁷.

2.5.3. X Protein

HBx antijeni 17 kDa ağırlığında 154 aminoasitten oluşan yapısal olmayan bir proteindir. X geni HBV genomunun kısmen üst üste gelen 4 ORF bölgesinin en küçük kısmıdır. HBx proteinin biyolojik fonksiyonu henüz açıklanmamıştır. Fakat HBV ile ilişkili karaciğer kanserine neden olduğu bilinmektedir.

Biriken kanıtlar HBV X geninin konak genomuna integrasyon ve HBV replikasyonu için gerekli olduğunu göstermiştir. HBx proteinin ekspresyonu in vitro koşullarda virus için önemsiz iken in vivo koşullarda enfektivite sürecinin önemli bir bileşenidir. HBx proteini enhancer/promoter komplekslerini ve virus promoterlerini aktive ederek replikasyon ve virus gen ekspresyonunu ilerletir. Ayrıca HBx birikimi konak hücre sinyal transdüksiyonu, transkripsiyon ve proliferasyondan sorumlu moleküllerin aşırı ekspresyonu dahil çeşitli hücresel aktiviteleri değiştirip viral replikasyonu artırarak viral persistens ve HCC'e neden olur^{26,28}.

2.5.4. Polimeraz Protein

Viral polimeraz HBV genomu tarafından kodlanan tek bir enzimdir ve 90 kDa molekül ağırlığındaki P proteinin dört farklı işleve sahip bölgesi vardır. Aminoterminal parçası, negatif DNA sarmalının sentezlenmesinde pgRNA'nın revers transkripsiyonu için öncül görevi görür. Orta parça, negatif sarmal sentezi için revers transkriptaz ve pozitif sarmal sentezi için DNA polimeraz olarak işlev yapar. Karboksi uçtaki parça ise negatif sarmal sentezi sırasında pgRNA'nın degradasyonu için gerekli olan RNase H'ı kodlar. DNA polimeraz bölgesi, revers transkriptaz aktivitesi için gerekli olan YMDD (tyrosine-methionine-aspartate-aspartate) aminoasit motifini taşır²⁹.

2.6.Virusun Replikasyonu

Viral yaşam döngüsünün erken evresinde adsorbsiyon, penetrasyon ve kapsidin ayrılması evreleri gerçekleşmektedir (Şekil 3). Enfeksiyonun ilk evresi hepatosite virusun adsorbsiyonudur. Birçok çalışma HBV enfeksiyonunun başlaması için Pre-S1 domainin reseptöre bağlanması gerektiğini bildirmiştir. Penetrasyonun ardından, viral koron yıkılımı gerçekleşir ve genomik DNA hücre nükleusuna göç eder. Bu göçte nükleer lokalizasyon sinyali görev almaktadır ve kapsidi olmayan HBV genomu importin yolunu kullanarak nükleusa geçiş gösterir ve bu yolda nükleer transport reseptörleri olan importin beta ve alfa görev alır. Nükleus içerisinde, kapsid çözülür ve serbest kalan genomik relax sirküler DNA (relax circular DNA; RC DNA) konağın tamir enzimleri vasıtasıyla cccDNA formunu alır. cccDNA aynı zamanda viral minikromozom olarak tanımlanabilmektedir ve virusun major transkripsiyonel kalıbı olarak davranmaktadır^{30,31}.

HBV'un yaşam döngüsünde iki proses anahtar rol oynamaktadır; RC DNA'dan cccDNA üretilmesi ve ardından konak enzimleri vasıtasıyla viral RNA'nın üretilmesi süreci ve sonrasında pgRNA'nın revers transkripte edilmesi ve viral nükleokapsidle birlikte RC DNA formunun oluşması sonrasında döngünün tamamlanması gerçekleşmektedir. HBV replikasyonunda ilk anahtar adım genomik RC DNA'nın cccDNA formuna dönüşümüdür ve viral minikromozomun transkripsiyonudur. HBV cccDNA formunun var olması hücrenin başarılı şekilde enfekte edildiğinin göstergesidir. Genomik RC DNA'nın cccDNA formuna dönüşmesinde en azından dört adım gerekmektedir; tek zincirli gap bölgesinin tamiri, 5'- terminal yapının kaldırılması, pozitif zincire kepli oligoribonükleotidin dahil edilmesi ve negatif zincirde HBV polimeraz proteinin elde edilmesi, negatif zincirde kısa terminalin çıkarılması ve her iki zincirin kovalent bağla ligasyonu ve son olarak cccDNA formunun oluşmasıdır.

HBV kor proteini viral minikromozomun yapısal bir bileşenidir ve HBV DNA'ya spesifik bağlanması HBV nükleoprotein kompleksinin nükleozomal bölgesinin kısalması ile sonuçlanır. Pollicino ve arkadaşları, HBV replikasyonunun viral cccDNA'ya bağlı H3/H4 histonlarının asetilasyonu ile düzenlendiğini göstermişlerdir ve nükleer hepatit B X proteini HBV minikromozomuna bağlanır ve cccDNA fonksiyonunun epigenetik regülasyonu bu yolla modifiye edilir^{30,32}.

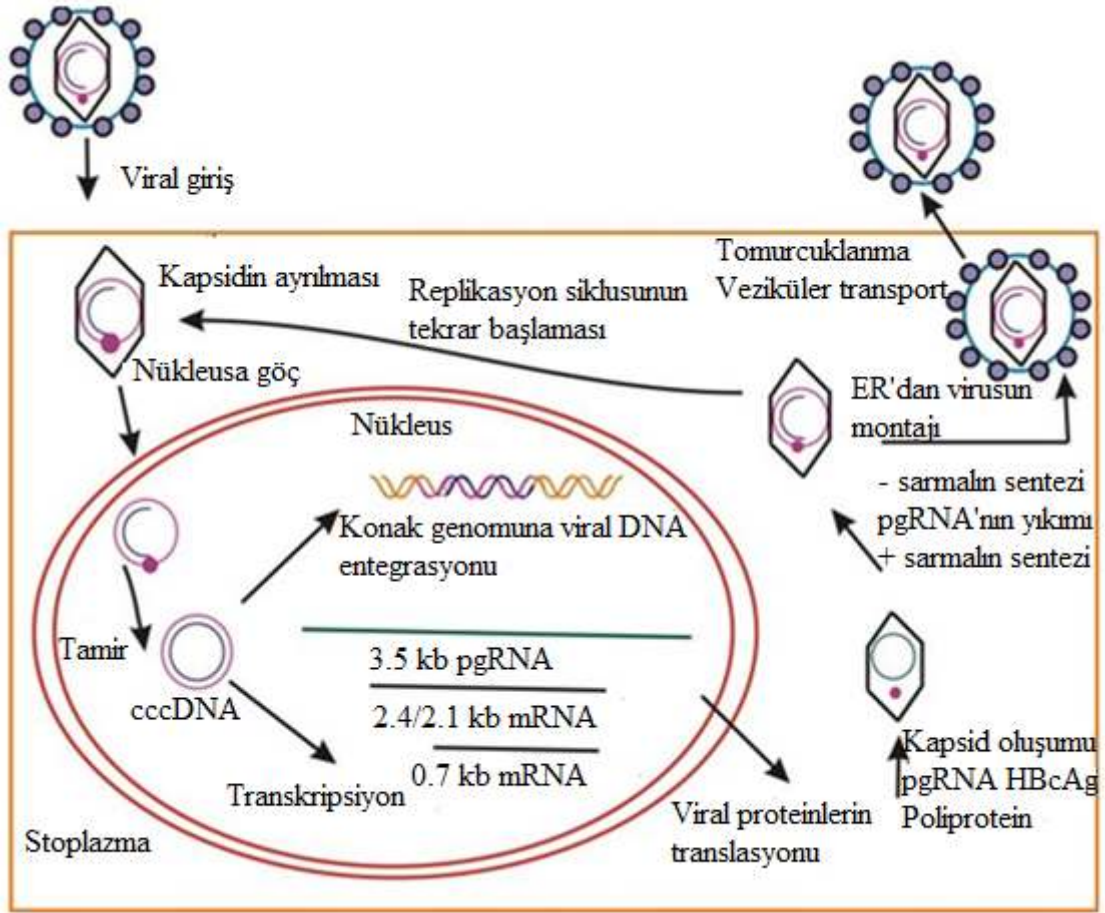
Viral RNA transkriptleri olan 3.5, 2.4, 2.1 ve 0.7 kb büyüklüğünde olan 4 parça büyük viral minikromozomdan üretilirler. Bu dört transkriptin ekspresyonu enhancer II/ bazal kor tarafından gerçekleştirilir, küçük yüzey proteinleri, büyük yüzey proteinleri ve enhancer I/X gen promoterleri sırasıyla bu transkripsiyonda görev almaktadır. Bu RNA'lar viral proteinlerin translasyonu için stoplazmaya geçerler. HBeAg veya nükleokapsid proteini 3.5 kb pgRNA'dan üretilir, çözünebilir ve sekresyonu mümkün olan HBeAg (2.5 kb prekor mRNA'dan), polimeraz protein (3.5 kb pgRNA'dan), viral zarf proteinleri, HBsAg (2.4 ve 2.1 kb RNA'lardan) ve hepatit B X proteini (0.7 kb RNA'dan) üretilir. Ek olarak, nükleokapsid ve polimeraz proteinlerinin transle olmasını sağlayan mRNA 3.5 kb uzunluğundaki pgRNA aynı zamanda viral genomun revers transkripsiyonu için kalıp görevi de görür. Dolayısıyla, HBV minikromozomundan genomdan daha uzun ve subgenom uzunluğunda olan iki sınıf transkript sentez edilmektedir. Her ikisi de pozitif polariteye sahip heterojen transkriptlerdir ve bunlar 5' ucunda kep ve 3' ucunda poliadenil uç taşımaktadırlar³⁰.

HBV genomik DNA replikasyonunda ikinci anahtar adım revers transkripsiyon aracılığı ile gerçekleştirilir. HBV genomik replikasyon pgRNA'nın paketlenmesi ile başlar ve viral revers transkriptaz subviral kor partiküller içindedir, böylece stoplazmik replikasyon kompleksi oluşmuş olur. Revers transkripsiyon HBV nükleokapsidinde gerçekleşir. HBV polimerazın pgRNA molekülünden translasyonu başladığında N-terminal ucu (terminal protein) RNA'nın eşsiz kısmına bağlanır ki burası epsilon olarak adlandırılmaktadır ve 5' ucunda bulunmaktadır. HBV polimeraz ardından konformasyonel değişime uğrar ve enzimatik aktivasyon kazanır. Paketlenmiş olan polimeraz enzimi terminal protein domainin 63. sırasındaki tirozin aminoasidinin hidroksil grubunu kullanarak DNA sentezini gerçekleştirir. Bu polimeraz–oligonükleotid kompleksi pgRNA'nın 3' ucundaki DR-1 bölgesine komplementer sekans olarak transloke olur. Buradan, pgRNA molekülünün 5' ucuna ulaşana kadar negatif zincir DNA sentezi devam eder ve böylece 8-9 nükleotid indirgenmiş kısa terminal üretilmiş olur. Revers transkripsiyon devam ettiği sırada, HBV polimerazın RNase-H aktivitesiyle pgRNA degrade edilir, ancak DR-1 sekansı içeren 18 nükleotidlik 5' kep terminal bölgesi degrade olmaz. Bu fragment 6 nükleotidlik kısmı ile DR sekans homolojisi gösterir. Onsekiz nükleotidlik kepli RNA yapısı yeni sentez edilmiş negatif zincir DNA'nın DR-2 bölgesine transloke olur ve pozitif zincirin sentezi

içi primer olarak görev alır ve negatif zinciri kalıp olarak kullanır. Pozitif zincirli DNA sentezi yaklaşık %70-80'ine denk gelene kadar devam eder³³.

Viral replikasyonda son olaylar viral montaj ve virusun hücreden serbest bırakılmasıdır. Nükleokapsidlerin kurulumu RC DNA içeriği ile sitozolde gerçekleşir. Dolayısıyla nükleokapsidler hücreden ayrılmadan önce zarflanırlar. Olgunlaşmamış nükleokapsidler pgRNA içermekte olup zarflanamazlar ve bu sadece revers transkripsiyonun başlamasının hemen ardından gerçekleşir. Negatif zincirli DNA'nın sentezi nükleokapsidin fosforilasyonu aynı zamanda gerçekleşmelidir ve bu zarflanmanın olması için şarttır. Replikasyon kor'unun doğru biçimde kurulumu için Pre-S1'in S'e oranının uygun olması gerekmektedir, dolayısıyla yetersiz S veya aşırı Pre-S1 üretimi anormal kurulum ve serbest bırakılmayı bozmaktadır.

Viral zarf komponentleri, küçük partikül ve filamentler barındırmaktadır, kurulum ve sentez ER membranında olur ve ardından lümene tomurcuklanma söz konusudur. Pre-S1, pre-S2 ve S proteinlerinin morfogenez boyunca farklı, fakat gerekli fonksiyonları mevcuttur. Bu farklı fonksiyonlar transmembran topolojileri ile ilişkili görünmektedir, pre-S2 ve S proteinlerinin topolojisi iki sinyal sekansı tarafından belirlenmektedir. N-terminal sekansı kısa luminal bölgede bulunmaktadır, iki transmembran bölgesi 55 aminoasitlik sitozolik kısım ile glikozilasyon ve proteinin major epitop kısmını içeren 70 aminoasitlik luminal domain kısmı barındırmaktadır. Aksine, Pre-S1'in Pre-S domainin tamamı translasyonu takiben sitozolde kalmaktadır. Virion olgunlaşması süresince Pre-S domainleri Pre-S1 molekülünün %50'sinden tekrar konfügre olur ve partikülün yüzeyine translokasyon gerçekleşir. Pre-S domaininin yapısı sitozolik bölgede kalır, sonrasında ER'dan tomurcuklanır ve partikülün internal kısmını meydana getirirler. Bu dual topoloji Pre-S1 domaininin virionda eksternal lokalizasyonunu sağlar ve hücresel reseptörlere bağlanma proteini olarak görev yapar. Replike olan kor partikülünün zarflanması sırasında Pre-S1 domaini sitozolik bölgede bulunmak zorundadır ki bu süreçte rolünü ancak böyle yerine getirebilir. Zarflanmış nükleokapsidler ER'un lumen kısmında birikirler, ardından golgi aygıtına doğru yolculuk başlar. Viral partiküller sekretuar yolu kullanarak hücreden salınırlar³⁰.



Şekil 3. HBV'un replikasyonu

2.7. HBV Subgenotip ve Genotipleri

Dünyada HBV genom çeşitliliği hem genotipik hemde fenotipik değişkenlik ile etkilenmektedir. Genotipler sık sık selektif baskının yokluğunda, fenotipik çeşitlilik ise konak immün sistem ve tedavi sırasında ortaya çıkan selektif baskının varlığında gelişmektedirler. HBV'un bu genetik çeşitliliği virus konak ilişkisinde rol oynayabilen farklı klinik ve virolojik karakteristiği ile ilişkilendirilmiştir.

Genotipler virus genomunun evrimsel değişiminden, rekombinasyondan veya spesifik konak popülasyonların genetik determinantlarına HBV'un uzun süreli adaptasyonundan kaynaklanabilir. Genotipler arasında fonksiyonel ve yapısal farklılıklar komplikasyonun olasılığını, seyrini, şiddetini, HBeAg serokonversiyonunu, HBV enfeksiyonun tedaviye cevabını ve muhtemelen virusa karşı aşığı etkileyebilir²⁶.

HBV, HBsAg'nin antijenik determinatına bağlı adr, adw, ayr ve ayw olarak 4 subtip veya serotipe ayrılmaktadır. *adw1*, *adw2*, *adw3* ve *adw4* gibi subdeterminantların etnik ve coğrafik dağılımı araştırılmıştır (Tablo 1). HBsAg subtip *adw2* genellikle Amerika ve Güney Avrupa'da, *ayw2* Ortadoğu'da, *adw4* Brezilya'daki yerli Amerikalılar'da ve *adr* Doğu Asya'da bulunmuştur^{14,34}.

HBsAg'nin immunolojik subtipleri HBV genomunun ve HBs geninin dizi analizi yapılarak incelenmiştir. Dünyadaki viral suçlardan HBV DNA dizi analizleri karşılaştırılması 1988 yılında Hiroaki ve Okamoto tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar DNA dizisinde %8'den daha fazla farklılık gösteren A'dan D'ye kadar (sonra genotip olarak adlandırılmıştır) 4 genotipik grubun varlığını göstermiştir. Bu kavram 2004 yılında genotip A-F ve %4'den daha fazla farklılık gösteren subgenotip bilgileri Helene Norder ve Lars Magnus tarafından verilmiştir. D genotiplerin bazıları bütün dünyada bulunmaktadır. Ancak diğerleri B ve C Asya'da, E Afrika'da ve F ile H Amerika'da sınırlıdır. Genotip E'nin son zamanlarda insan popülasyonlarında yayıldığı görülmektedir. Çünkü Afrika'dan Amerika'ya 200-400 yıl önce yerleşen siyah Amerika'lının nesillerinin genellikle bu genotipe sahip olduğu görülmemiştir. Fakat Kuzey Avrupa göçmenlerinin nesillerindekine benzer subgenotip A2'ye sahip olduğu görülmüştür. Brezilya'da yaygın subgenotip A1, Doğu Afrika'dan göç eden köleler ile gelmiştir ve Hint Okyanusunun Asya sahiline Somali aracılığıyla yayılmıştır. Bu gözlemlerdeki görüş birliğinde, biyoinformatik algoritma kullanılan bazı tahminler insan HBV'un yüksek mutasyon oranına sahip olduğunu ve birkaç yüzyıldan daha eski olmadığını düşündürmektedir. Ancak insan HBV için belirtilen bu bilgilerin göçlerden daha eski olduğu muhtemeldir. Özellikle subgenotip C'nin Avustralya yerlilerinde olması ancak Güney Doğu Asya veya Okyanusya'da olmaması genotip C'nin Avustralya'ya modern insanların yerleşiminden yaklaşık 50.000 yıl önce var olduğunu ve orada orijinal genotip C atasından bağımsız olarak evremleştirdiğini düşündürür. Son 15.000 yılda tarih öncesi göç sırasında HBV subgenotiplerin değerlendirilmesi son zamanlarda daha fazla düzenli biyoinformatik analiz ile doğrulanmıştır^{14,35,36}.

Genotip A-H ile I ve J genotipleri ve subgenotipler A1-7, B1-9, C1-6, D1-9 ve F1-4 olarak 2013 yılının başında belirlenmiştir. Ancak C subgenotip tartışmalı bir şekilde kalmıştır. Yeni genotip I, genotip A, C ve G'nin kompleks rekombinant

formudur. Genotip J ise Japonya, Okinawa’da yaşayan 88 yaşındaki hepatitli bir hastadan izole edilmiştir³⁷.

Genotip C, D ve F diğer genotiplerden daha fazla patojeniktir ve genotip A ve B interferon tedavisine genotip C ve D’den daha iyi cevap vermektedir¹⁴.

Tablo 1. HBV genotiplerinin dağılımı

Genotip	Subgenotip	Coğrafik dağılım
A (A1 – A6)	adw2	Afrika, Avrupa, Amerika, Avustralya
B (B1 – B9)	adw2, ayw1	Güneydoğu Asya, Çin, Japonya
C (C1 – C16)	adw2, ayr1, adrq-, adrq+	Güneydoğu Asya, Çin, Kore, Japonya, Avustralya
D (D1 –D7)	ayw2,3,4	Akdeniz Havzası, Ortadoğu, Doğu Avrupa, Hindistan
E (Subgenotip yok)	ayw4	Batı ve Orta Afrika
F (F1 – F4)	adw4q-	Güney ve Orta Amerika, Polinezya
G (Subgenotip yok)	adw2	Avrupa, Kuzey Amerika
H (Subgenotip yok)	adw4	Orta Amerika, Meksika, Güney Amerika Birleşik Devletleri
I (Subgenotip yok)	adw	Vietnam, Hindistan
(Subgenotip yok)	-	Japonya

2.8. HBV Genomundaki Mutasyonlar

HBV’un yüksek replikasyon hızından dolayı (10^{11} partikül/gün) 2×10^4 baz değişikliği/lokus/yıl kadar mutasyon hızı gösterir. Bu oran polimeraz ile ilişkili geri okuma fonksiyonu olmayan diğer viruslarınkine göre daha düşüktür. Ayrıca HBV

genomunun yapısında birden fazla üst üste açık okuma çerçevesi olması uygun mutasyonların sayısını ve çoğaltılma oranını azaltmaktadır. Fakat Hepatit B semptomlarının şiddetli olması, hücrel immun sistemin etkinliği ve antiviral tedavi uygulama gerekliliği ve bunun sonucunda oluşan seleksiyon ve mutant suşların popülasyonda baskınlık kazanması HBV'un mutasyon profilini önemli kılmaktadır³⁸.

Mutasyonlar HBV genomunda tesadüfi olarak meydana gelmektedir. Oluşan bu mutasyonlar virusa sağladığı uyum gücüne bağlı olarak replikasyon döngüsü sırasında çoğalmakta ve mutant viruslar prevalans kazanmaktadır. Kendi doğasında ilerleyen genomik mutasyonların temel sınıflandırmasını 3 ana kategoride ayırmak mümkündür. Bunlar; tek baz değişikliğine neden olan nokta mutasyonları, geniş genom alanlarını etkileyebilen insersiyon ve delesyon ile yeniden düzenlenme, insersiyon-delesyon veya nokta mutasyonları oluşumu ile meydana gelen okuma çerçevesinin değişmesidir.

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

- 1- Antiviral ilaçlara karşı direnç gelişimine neden olabilir.
- 2- Virusun hücreye girişini ve entegrasyonunu kolaylaştırabilir.
- 3- Virusun antijenik yapısının değişmesine ve immun yanıtı kaçış mekanizmalarının oluşmasına neden olabilir.
- 4- Virusun replikasyonunun artması sonucu şiddetli klinik sonuçlara sebep olabilir³⁹.

2.8.1. Bazal Kor Promoter, Prekor ve Kor Mutasyonları

HBeAg ekspresyonunun bloke edilmesi veya azaltılması ile sonuçlanan 2 temel mutasyonlar grubu tanınmıştır. İlk grub; prekor geninde translasyonel stop kodon mutasyonu içerir. Prekor geninin epsilon yapısında lokalize 1896. nükleotidde

(kodon:28 TGG; triptofan) G'den A'ya tek baz değişimi prekor bölgesinin son kodonu olan kodon 28'i translasyonel stop kodonuna çevirir (TGG'den TAG'e dönüşümü ile TAG stop kodonun oluşumu). Viral replikasyonda steem-loop RNA yapısındaki ε son derece korunur. NtG1896 steem-loop'un nt1858 bazı ile baz çifti oluşturur. HBV genotiplerden B, D, E, G ve genotip C'nin bazı suşları 1858. nükleotid timidindir. Bu yüzden G1896A (T-A) tarafından oluşan stop kodon mutasyonu epsilon yapıyı stabilize eder. Buna karşılık prekor stop-kodon mutasyonu HBV A veya F veya genotip C'nin bazı suşlarında nadiren tespit edilir. Çünkü nt1858 pozisyonu sitidindir ve tercih edilen Watson-Crick (G-C) baz eşleşmesini sürdürür⁴⁰.

Mutasyonun ikinci grubu kor mRNA ve prekorun transkripsiyonel redüksiyonu ile sonuçlanan bazal kor promoterini etkilemektedir. Bu mutasyonlar nt1762 ve nt1764'de meydana gelir. Bazal kor promoter bölgesindeki A1762T ve G1764A gibi mutasyonlar genotipe bağlı olarak tek başına veya prekor mutasyonları ile birlikte bulunabilir. A1762T ve G1764A ile çift mutasyon oluşumu artan viral yük ve HBeAg'in azalması ile sonuçlanır. Genellikle mutasyonun bu örneği genotip A ile enfekte bireylerde bulunur. Bazal kor promoter bölgesindeki mutasyonlar karaciğere spesifik transkripsiyon faktörlerine bağlanmayı azaltarak daha az prekor ve kor mRNA transkriptlerin sentezine ve sonuç olarak prekor proteininin daha az sentezlenmesine sebep olurlar. Buna karşılık bazal kor promoter mutasyonları pgRNA'nın transkripsiyonunu veya kor ve polimeraz proteinlerinin translasyonunu etkilemez. Böylece, HBV replikasyonunda prekor proteininin inhibitör etkisinin ortadan kaldırması ile bazal kor promoter mutasyonları, prekoru ve pgRNA ile ilişkili kor mRNA'yı baskılayarak viral replikasyonu artırır gözükmemektedir⁴⁰.

Kor proteini 2 major bölgeye ayrılır. Bunlar; N terminal bölge ve fonksiyonel bir şekilde arjinince zengin C terminal bölgesidir. C terminal bölge genomik RNA'nın bağlanması ve ardından replikasyon için gereklidir ve B hücresi ve sitotoksik T lenfositleri için önemli epitoplara içerdęi gösterilmiştir. Kronik HBV enfeksiyonunda enfekte hepatositlerin sitotoksik T hücreler tarafından temizlenmesi sırasında bu epitoplardaki escape (kaçan) mutasyonlar kolaylıkla seçilir. Bu epitoplar majör sitotoksik T lenfosit bölgeleri için 18-30 aminoasit, T helper hücre bölgesi 50-70 aminoasit ve 2 B hücresinin HBc/e1 (75-90) ve HBc/e2 (120-140) rezidülerindedir. Kor

genindeki mutasyonların sıklığı, prekor stop kodon mutasyonun varlığı tipik olarak HBeAg negatif durum ve aktif karaciğer hastalığı ile ilişkilidir^{40,41,42}.

2.8.2. X Mutasyonları

X bölgesindeki mutasyonlar bazal kor promoter ve enhancer II gibi replikasyonu kontrol eden düzenleyici elementleri içerebilir. Çünkü bazal kor promoter nükleotid 1742 ve 1802 arasındaki bölgeyi kapsar ve okuma çerçevesindeki X geni ile üst üste gelmektedir. A1762T ile G1764A kor promoter mutasyonları X genindeki xK130M ve xV131I'da değişikliklere neden olur. Ayrıca X geni çerçevesindeki değişim bazal kor promoterdeki hemen hemen bütün delesyonlar veya insersiyonlar kesilmiş X protein ürününe neden olur. Bu kısaltılmış X proteinleri HBx antijen transaktivasyonu için gerekli olan C terminaldeki bölgelerde bulunmamaktadır⁴⁰.

Yaygın 1762/1764 çift mutasyonlarına ek olarak, kor promoterdeki 1753, 1766, 1768 ve enhancer II'deki 1653 bölgesindeki mutasyonlar HCC ile ilişkili olmaktadır. Genotip C'deki C1766T ve T1768A mutasyonları da karaciğer sirozuna katkıda bulunur. Çünkü 1753, 1766 ve 1768 bölgesindeki mutasyonlar fulminan hepatit ile ilişkili olup genom replikasyonunu artırmaktadır. Bu mutasyonlara bağlı kor proteinin artan ekspresyonu sayesinde siroz veya HCC gelişebilir. Ayrıca kor promoter, X geni ile üst üste gelir. T1753C, A1762T, G1764A ve T1768A mutasyonlar HBx proteinin C terminaline yakın I127T, K130M, V131I ve F132Y değişikliklerine neden olur. Önceki çalışmalar wild tip HBx'in hücre poliferasyonunda ve transformasyonunda engelleyici etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Bu etkiler HCC dokularında HBV DNA'nın yerleşmesine neden olan HBx proteinin C terminal'inin kesilmesi ile ortadan kalkmıştır⁴³⁻⁴⁵.

2.8.3. S Mutasyonları

Pre-S dizileri HBV genomunda yüksek heterojenlik gösterir. Pre-S gendeki nokta mutasyonlar, delesyonlar ve genetik rekombinasyonlar inaktif taşıyıcıların serumunda bulunan HBV DNA dizilerinde belirlenmektedir. Pre-S2 proteinleri sentezlemeyen HBV genomları sık sık meydana gelir ve bu inaktif taşıyıcılarda baskın virus popülasyonudur. Pre-S2 bölgesi ile enzim aktivitesi için gerekli olmayan polimeraz proteinin boşluk (spacer) bölgesi üst üste gelmektedir. Birçok hepatit aşısı temel HBsAg proteinini içerir ve 99-170 rezidüde yerleşen majör hidrofilik bölgeye karşı immun cevabı indükler. Bu anti-HBs cevabı koruyucu immunité sağlar. Epitopdaki mutasyonlar aşılama sırasında ve hepatit B immunglobülin (HBIG) ile karaciğer tedavisinden sonra seçilmiştir. Birçok izolatlar HBsAg (sG145R)'nin 145 rezidüde glisinden arjine veya 144 rezidüde (sD144A) aspartatdan alanine mutasyon içerir. sG145R mutasyonu ise aşı başarısızlığı ile ilişkilidir^{40,43}.

2.8.4. P Mutasyonları

Polimeraz mutasyonlarının en önemli klinik sonucu ise antiviral direnci oluşturmastır. Lamivudin gibi viral revers transkriptaz inhibitörü olan ilaçlarla tedavi sonrasında polimeraz mutasyonları olan viruslar popülasyona hakim olmaya başlamaktadır. Lamivudin tedavisi sırasında polimeraz geninde pek çok mutasyon tanımlanmıştır. Bunlardan üç tanesinin lamivudin direncine sebep olduğu saptanmıştır. Bu mutasyonlardan en sık görülen YMDD mutasyonlarıdır. Polimeraz enziminin C katlantısındaki tirozin (Y), metionin (M), aspartat (D), aspartat (D) aminoasitlerinden (YMDD) metioninin izolösün veya valine değişmesi (M552I veya M552V), B katlantısındaki lösünün metionine değişmesi (L528M) ve tekrar B katlantısındaki valinin lösine değişmesi (V521L) LAM direncinden sorumlu tutulmaktadır. RNA'ya bağı DNA polimerazın tüm revers transkriptaz enzimlerinde benzer ve korunmuş olan YMDD motifinde değişikliğe neden olan mutasyonlar, enzimin nükleotid bağlayan katalitik bölgesini etkilemekte ve LAM'in yanında ADV gibi diğér revers transkriptaz enzim inhibitörlerine de direnç gelişmesine sebep olmaktadır⁴⁶.

2.9. Patogenez

Hepatit B virusu sitopatolojik değildir. Akut enfeksiyonda 45-180 gün süren inkübasyon sonrasında klinik hepatit B gözlemlenmektedir. Sitopatik olmayan mekanizma ile hepatit B eliminasyonu hastalığın başlamasından haftalar önce başlamaktadır. Hepatit B DNA'sının neredeyse %90'ı antiviral sitokinler vasıtasıyla temizlenir ki bu sitokinler doğal ve adaptif immun cevap sonrası üretilirler ve bunlara tümör nekroz faktör alfa, interferon alfa veya interferon beta dahildir. Viral DNA azalışından sonra hepatosit apoptozisi ve nekrozis ile birlikte sitolitik immun cevap devam eder, bununla birlikte klinik hepatit B'nin gelişmesi ve serumda ALT artışı gerçekleşmektedir. Enfekte hepatositleri virusa spesifik CD8 sitotoksik T lenfositleri tarafından tanısı sınıf I insan lenfosit antijen (Human Leukocyte Antigen; HLA-1) aracılığı ile hepatit B virus peptitlerinin sunumu sonucu gerçekleşmektedir ve bu mekanizmanın virus kontrolü ve karaciğer hasarına neden olduğu bilinmektedir. Sitotoksik T hücreleri sitokin salgılayarak spesifik olmayan birçok inflamatuvar hücreyi karaciğere toplar ve bunun sonrasında nekroinflamasyon ile sonuçlanan birçok immunolojik reaksiyon kaskadı başlar. Multispesifik CD4 ve CD8 cevabı viral klirens ile ilişkilidir. Kronik hepatit B enfeksiyonu olan vakalarda, hepatit B virus spesifik CD4 ve CD8 cevabı yetersizdir ve persisten inflamatuvar cevaba sebep olabilir ve böylesi bir durumda hepatit B virus klirensi için verimsizdir⁴⁷.

Konvansiyonel karaciğer biyokimyasal testleri tanı için elzemdir, özellikle karaciğer hasarının tespiti için ALT (Alanin aminotransferaz) seviyesinin ölçülmesi gereklidir. Bunun yanı sıra konjuge ve serbest bilirubin testi, karaciğer sentez fonksiyonlarının tespiti için albumin değeri ve protrombin zamanının ölçülmesi de gerekmektedir. Karaciğer biyopsisi nekroinflamasyonun derecelendirilmesi ve fibrozis evresinin anlaşılması için önemlidir. Ultrasonografi ve diğer görüntüleme metodları HCC ve sirozun belirlenmesi için invazif olmayan metodlardır, bu metodların ve testlerin mantıklı biçimde kullanılması hastalığın doğasının ve ne aşamada olduğunun anlaşılması için önem arz etmektedir. Hepatit B'nin tanısı ve tespiti için hepatit B virus markırlarının test edilmesi zaruridir. Hepatit B'nin serolojik markırları HBsAg ve anti-HBs, HBeAg ve anti-HBe, anti-HBc IgM ve anti-HBc IgG'dir. HBsAg pozitifliği enfeksiyonu işaret eder. HBeAg pozitifliği ise viral replikasyon markırı olup yüksek

hepatit B DNA'sının varlığına işaretler. HBsAg belirlenimi hepatit B enfeksiyonu için risk altındaki kişilere yapılır, aynı zamanda ALT'si yüksek bireylerde veya karaciğer hastalığına dair kanıt taşıyan hastalarda da test yapılmalıdır, immün baskılaması olan veya kemoterapi alan hastalarda da bu testin yapılması önerilmektedir⁴⁸.

Akut hepatit B olan hastalarda görülen ilk serolojik markır HBsAg'dir ki klinik belirtilerin görülmesinden 1-6 hafta önce görülmektedir. Anti-HBc IgM ise HBsAg'den 1-2 hafta sonra görülür ve HBsAg'nin temizlenmesinden 6 ay sonra bile görülebilmektedir. Şiddetli akut hepatit alevlenmesi veya diğer hepatit B virusları ile süperenfeksiyonu olan, daha önce tanı konmamış kronik HBsAg taşıyıcıları klinikte akut hepatit B olarak tanımlanırlar ve bu vakalar anti-HBc IgM için seronegatifdir. Bu sebeple akut hepatit B'nin tanısı için anti-HBc IgM testi yapılmalıdır. HBeAg ve hepatit B virus DNA'sı akut enfeksiyonun erken fazında mevcuttur. Her iki markır genellikle serum ALT'nin pik yaptığı dönemde veya hemen sonra ve 1-2 ay içinde gerçekleşen HBsAg seroklirensinden önce kaybolur ve bunu haftalar sonra anti-HBs'nin ortaya çıkışı izler. Geçirilmiş enfeksiyon anti-HBc ve anti-HBs belirlenmesi ile tanınır⁴⁹.

On haftadan fazla HBeAg'nin varlığı persisten enfeksiyona geçişin göstergesidir. Serum HBsAg'in 6 aydan fazla persisten fazda olması kronik enfeksiyona ilerlemesinin göstergesidir. HBeAg pozitif vakalarda HBV DNA miktarı oldukça yüksektir, buna karşın HBeAg negatif enfeksiyonda serum konsantrasyonları oldukça düşüktür. Seri testlerle gösterilmiştir ki, inaktif taşıyıcılık durumu HBV DNA miktarının 2×10^3 IU/mL'den az ve normal ALT değeri olması durumunda söz konusudur.

Serum Hepatit B virus DNA testi ile viral yükün direkt ölçümü yapılır, özellikle hastalığın progresyon riskinin tespit edilmesinde kullanışlıdır ve vakanın antiviral terapi adayı olup olmadığı bu yolla belirlenir, aynı zamanda tedavi cevabının izlenmesinde de verimlidir ve aktif hepatit B'nin inaktif taşıyıcılık durumundan ayrılması içinde gerekli bir testtir. Polimeraz zincir reaksiyon (Polymerase chain reaction; PCR) bazlı testler yüksek sensitiviteye sahip olması nedeniyle hepatit B viral yükün belirlenmesinde yaygın kullanıma sahiptir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) HBV kantifikasyonunda uluslararası standart yayınlanmıştır ve 1 IU yaklaşık beş genoma eşit olarak

değerlendirilmektedir. HBV'nun genotiplemesi ve mutasyonların tespiti klinikte çok önemli hale gelmiştir⁴⁷.

2.9.1. Virusun İmmun Cevaptan Kaçış Mekanizması

HBV enfeksiyonunda son gelişmeler virusun sadece gizli bir patojen olmadığı fakat doğal immun sistemden kaçmak için aktif mekanizma kullandığını göstermiştir.

RIG-1 (Retinoic Acid-Inducible Gene 1) ve MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated Protein 5) gibi RNA helikazlar viral enfeksiyon sırasında viral RNA'ların tanınmasından sorumlu önemli "pattern recognition receptorler" (PRRs)'dir. RNA helikazlar HBV enfeksiyonu sırasında immun süpresyon için hedefdir. Viral kaçış stratejileri interferon (IFN) üretiminde rolü olan IFN düzenleyici faktörlerin inhibisyonuna sebep olur. HBV polimerazın insan hepatoma hücrelerinde RIG-1 ve TLR3'ün uyardığı PRRs sinyaline cevapda IRF aktivasyonunu engelleyerek antiviral doğal immun cevabı bozduğu bildirilmiştir. HBV proteinlerinin, RIG-1 yolundaki adaptör proteinlerin hedefi olduğu gösterilmiştir. Düzenleyici HBx proteini β interferon promoter stimulator 1 (IPS-1)'e bağlanır ve inaktif eder. HBx'in IPS-1'e bağlanmasının sonucu hepatoma hücre dizilerinde IFN- β aktivasyon aracılığı ile çift iplikli DNA'nın inhibisyonu sağlanır. İnsan hücre çalışmalarında da adaptör protein mitokondrial antiviral sinyallerin (Mitochondrial Antiviral Signalling; MAVS) HBx için diğer bir hedef olduğu gösterilmiştir. MAVS'ın parçalanmasını teşvik ederek, RIG-1 yolu aracılığı ile IFN- β 'nın indüksiyonu önlenir⁵⁰.

Diğer bir hedef HBV'a karşı antiviral cevabı azaltmak için kullanılan doğal immunitenin Toll-like reseptörler (Toll-like receptor; TLR) sistemidir. TLR'ler endozomal veya lizozomal bölgede viral partiküllerdeki nükleik asit dizisini tanır. TLR'lerini tetikleme dentritik hücre olgunlaşmasını, tip1 IFN gibi temel sitokinlerin ürünlerini ve adaptif immunitenin başlamasını tetikleyen sinyal transdüksiyon yolunu başlatır^{50,51}.

TLR3 ve TLR4 murin nonparenkimal karaciğer hücrelerinde enfeksiyonu takiben doğal immun cevabın bir parçasıdır ve IFN- β indüksiyonu aracılığı ile HBV replikasyonunu baskılama yeteneğine sahiptir. Aynı grup bu etkilere karşı koymak için mekanizma içerir. HBV virionları HBsAg ve HBeAg gibi viral antijenler IRF-3 ve NF- κ B gibi transkripsiyon faktörleri, uyarılmış IFN genlerinin indüksiyonunu ve IFN'u baskılayarak uyarılmış TLRs antiviral aktiviteyi ortadan kaldırmaktadır^{52,53}.

Ayrıca akut enfeksiyonda virusun temizlenmesinde etkili olan antikorlar, yüzey antijenlerindeki “a” determinant değişikliğine neden olan mutasyonlarda nötralize etki göstermeyebilir. Virusun prekor/kor bölgesinde oluşan mutasyonlarda HBeAg sentezi durmakta, bu antijen yokluğunda virusa ait immun cevap zayıflamaktadır. Viral antijenlerde değişikliğe neden olan mutasyonlar bu antijenlerin doku uygunluk kompleksi (Major Histocompatibility Complex; MHC) antijenlerine bağlanmasını ve T hücre reseptörü ile bağlanma özgülüğünü etkiler. Viral yük fazla olduğunda immunodominant epitopların T hücrelerini uzun süreli veya yüksek düzeyde uyarması T hücre yanıtınlığına yol açabilmektedir⁵⁴.

2.10. Hastalık

2.10.1. Akut HBV Enfeksiyonu

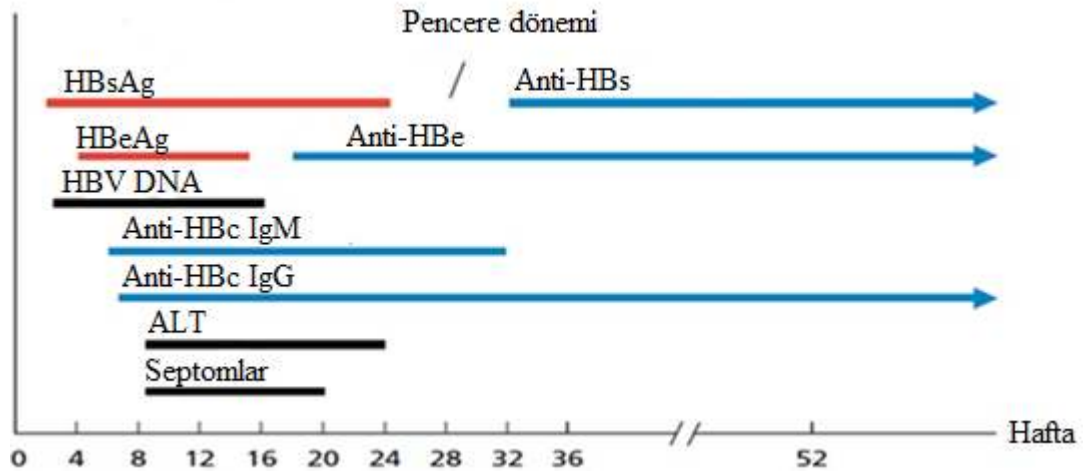
Akut HBV enfeksiyonunda hepatit yüzey antijenleri (HBsAg) 4-10 hafta inkübasyon periyodundan sonra serumda ölçülebilir seviyeye gelir ve HBV DNA seviyeleri oldukça yüksektir. HBeAg dolaşımı akut HBV enfeksiyonlu birçok hastada belirlenir ve bu hastalar enfeksiyonu kolayca bulaştırırlar. Viral enfeksiyon oluşana kadar aminotransferaz seviyeleri artmaz. Çünkü viruslu enfekte hepatositlere karşı spesifik sitotoksik T lenfosit cevabını geliştirmek için zaman gereklidir.

Akut hepatitin başlangıç semptomları nonspesifiktir. Halsizlik, yorgunluk, iştahsızlık, bulantı, kusma ve karın ağrısı en belirgin semptomlarıdır. Preikterik dönem olarak bilinen bu evre 3-10 gün sürer. Bu evrede aminotransferaz seviyeleri anormaldir. HBsAg, HBeAg ve HBV DNA bu evrede saptanabilmektedir. İlk immun yanıt IgM ile

başlar. Akut hepatit B’li hastalarda anti-HBc IgM ve IgG titresi saptanabilir düzeydedir. İkterik döneme geçişle birlikte bu bulgular düzelirken sarılık, hafif kaşıntı, idrar renginde koyulaşma ve dışkı renginde açılma gözlenir. Bu fazda ALT ve aspartat aminotransferaz (AST) sürekli artış gösterir. Ayrıca hasta serumlarında anti-HBc ve anti-HBe IgM görülmektedir. Serumdaki anti-HBc IgM varlığı akut hepatit B tanısı için güvenilir ve spesifik bir belirteçdir (Şekil 4).

Fulminan hepatit akut HBV enfeksiyonu olanların %0.1 ile %0.5 arasında meydana gelir. Fulminan hepatit tipik olarak ani ateş, karın ağrısı, kusma ve sarılık ile başlar, bunu disoryantasyon, konfüzyon ve koma izlemektedir⁵⁵.

Pencere döneminde erken temizlemeden dolayı HBV yüzey antijeni (HBsAg) ortaya çıkmaz. Ama HBV kor antijenine karşı IgM gösterilir. Bu dönemde HBV DNA düşük düzeydedir veya belirlenemez⁵⁶.



Şekil 4. Akut hepatit B’nin doğal seyri

2.10.2. Kronik HBV Enfeksiyonu

KHB genellikle anormal karaciğer fonksiyon testlerinin veya HBV enfeksiyon riski olan hastaların taranması sonucu tesadüfî teşhis edilir. KHB’li birçok hastada

herhangi bir semptom görülmez. KHB'li hastalarda HBeAg serokonversiyonundan dolayı akut şiddetlenme meydana gelir. Bu şiddetlenmenin çoğu asemptomatiktir. Ancak bazen akut hepatit benzeri tablo ile anti-HBc IgM antikoru oluşur.

Kronik hepatit B enfeksiyonunun en önemli komplikasyonları sırasıyla hepatorenal sendrom, siroz ve HCC'dir. Olguların %15-20'sinde 5 yıl içerisinde siroz, sirozlu hastaların da %20'sinde HCC saptanır. HBsAg kaybının görülme olasılığı ise yılda %1-2 civarındadır.

Kronik HBV enfeksiyonu; immun tolerans, HBeAg pozitif kronik hepatit, inaktif HBsAg taşıyıcılığı ve HBeAg negatif kronik hepatit olmak üzere 4 faza ayrılır⁵⁷.

Persisten (kalıcı) HBV enfeksiyonu viral replikasyonun yüksek oranından dolayı serumdaki HBV DNA'nın yüksek seviyesi, normal serum aminotransferaz seviyesi ve HBeAg varlığı ile karakterize olup başlangıçta immun tolerans fazına sahiptir. Bu faz çoğunlukla çocukluk çağında veya doğumda enfeksiyonu geçiren hastalarda nadiren de erken çocukluk çağında ve yetişkinlerde görülür. Bu hastalardaki immun tolerans dönemi 10-30 yıl kadar sürebilir. Buna karşılık HBV ile enfekte erişkinlerde immun tolerans dönemi genelde çok daha kısa ve diğer dönemlerden ayırt edilemeyecek kadar belirsiz olabilir^{57,58}.

Perinatal HBV enfeksiyonu geçiren hastalarda immun tolerans fazından immun temizleme fazına geçiş yaşamın 2 veya 3. on yılında meydana gelir. HBV replikasyonu ve viremi karaciğerde devam etmesine rağmen serum virus seviyeleri immun temizleme fazında daha düşük olur. Kronik HBV'un aktif fazı sık sık ALT'ın artan seviyeleri, nekrotik inflamatuvar aktivite, HBV DNA ve HBeAg döngüsü ile belirlenir. HBeAg spesifik T hücreleri düşük avidite veya düşük T hücre reseptörü dansitesinden dolayı tolerans indüksiyonundan kaçır. Bu aktif faz HBeAg'in varlığı, yüksek serum HBV DNA ve ALT seviyelerin yanı sıra karaciğerde aktif inflamasyon ve fibroz ile karakterizedir. HBeAg pozitif kronik HBV enfeksiyonlu hastaların doğal seyrindeki temel olay HBeAg serokonversiyondur. Birçok çalışmada spontan HBeAg serokonversiyonun yıllık oranının çocuklarda %5 ile %8 olduğu gösterilmiştir. Asya'da birçok çocukta ALT seviyeleri normal olmasına rağmen spontan HBeAg

serokonversiyon oranı %2'den daha azdır. Fibrozun gerilemesi HBeAg serokonversiyondan sonra birkaç ay veya yılda meydana gelir⁵⁷.

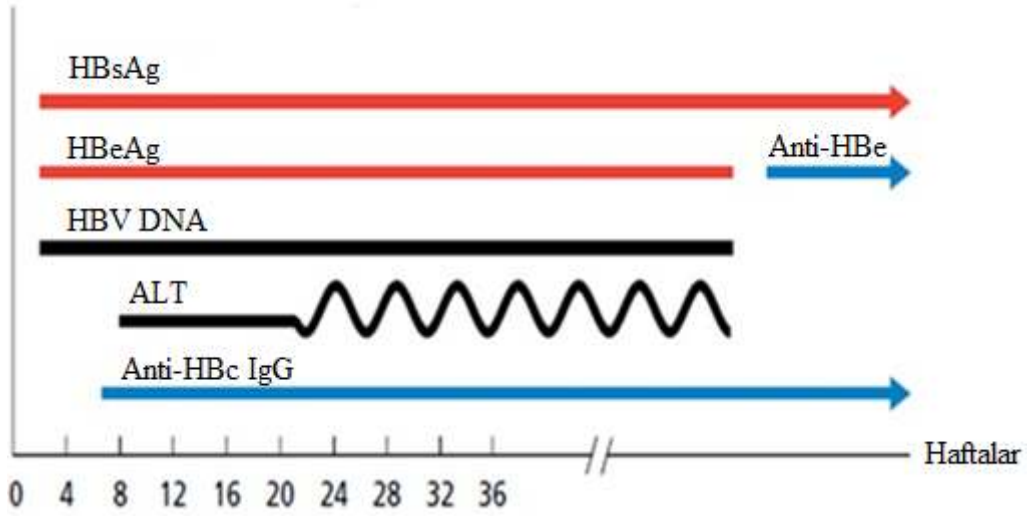
HBV enfeksiyonun inaktif HBsAg taşıyıcılık fazı HBeAg serokonversiyonuna neden olur. Kronik HBV enfeksiyonlu hastaların birçoğu inaktif taşıyıcılardan oluşur. Serokonversiyondan sonra, birçok hastada anti-HBe pozitif, HBeAg negatif, düşük HBV DNA seviyeleri ve normal ALT seviyeleri ile karakterize olan hepatit oluşur, bu durum inaktif taşıyıcılık “inactive carrier state” olarak bilinir. Hastalık immun temizleme fazında ciddi ise biyopsi bulguları hafif inflamasyon, minimal fibrozis ve inaktif siroz arasında olabilir. Birçok hasta birkaç yıl bu fazı sürdürür ve prognoz genellikle iyidir. HBV taşıyıcıları uzun süreli takipte siroz veya HCC'in gelişimi için çok düşük risk gösterebilir. Siroz olmayan hastalarda inaktif HBeAg taşıyıcılarında karaciğer kanseri gelişebilir. İnaktif HBeAg taşıyıcıların yaklaşık %20 ile %30'unda takip sırasında hepatit B'nin spontan reaktivasyonu olabilir. HBV enfeksiyonu çoğunlukla perinatal veya erken çocukluk döneminde kazanılır. Hastalık seyrinde HBeAg'in kaybı gelişebilir, ancak HBsAg klirensi sirozlu hastalarda HCC veya karaciğer dekompanseasyonunun oluşumunu tamamen engelleyemez^{58,59}.

Kronik HBeAg negatif hastalar, kronik inaktif HBsAg taşıyıcıları ve kronik hepatit B'li hastalar biyokimyasal ve virolojik aktivitelerine göre ayrılır. HBeAg negatif kronik hepatit, HBeAg serokonversiyonu olmadan inaktif HBV taşıyıcıların 1/3'ünde tekrarlayabilir. HBeAg'ne karşı anti-HBe serokonversiyonunun karaciğer hastalığının azalmasına ve HBV replikasyonunun durmasına eşlik ettiğine inanılmaktadır. Fakat HBeAg negatif kronik hepatit B, kronik hepatitin önemli bir formu olarak bilinmektedir ve HBeAg negativitesi prekor/kor promoter bölgesi mutasyonlarından dolayı olmaktadır. En sık prekor mutasyonu stop-kodonu oluşturan 1896 nükleotiddeki guanin-adenozin (G-A) değişikliğidir ve en yaygın kor-prekor mutasyonu HBeAg sentezinin kaybına neden olan 1762-1764 nükleotidlerin değişimidir ki bu durum HBeAg sentezinin kaybı ile sonuçlanır. Dolaşımda olan HBeAg'in kaybı HBeAg spesifik T yardımcı tip 2 hücrelerin aktivitesinin indüksiyonunu azaltabilir ve T yardımcı tip 1 hücreleri gibi inflamatuvar hücrelerin baskın olmasına yol açabilir. HBeAg negatif kronik hepatit B (prekor mutant), immun sistemin temizleme fazında (HBeAg serokonversiyon) seçilen predominant türler olan wild tip viruslarla meydana gelir.

Kronik aktif HBV enfeksiyon sırasında özellikle yüksek viral yük varlığında HBeAg negatif mutantların oluşumu karaciğer hasarının artmasıyla ve kötü prognoz ile ilişkidir. Bu fazın ilerlemesi spontan bir şekilde immun baskılanma sırasında inaktif HBV taşıyıcılarında meydana gelmektedir. Bazı hastalar HBeAg pozitifden HBeAg negatif kronik hepatit B' ye ilerleyebilir^{60,61}.

Prekor/kor promoter mutasyonların tespiti ile HBeAg serokonversiyonundan sonra kronik hastalığın geliştiği gösterilmiştir. Yaş HBeAg negatif hastalarda HBeAg pozitiflerden daha yüksektir. ALT ve HBV DNA seviyeleri HBeAg negatif hastalar HBeAg pozitif hastalardan daha düşüktür. Spontan iyileşme nadirdir, uzun vadeli prognoz kötüdür, histolojik lezyonlar HBeAg negatif hastalarda HBeAg pozitif hastalara göre daha şiddetlidir. Nekrotik inflamatuvar aktivite hem HBeAg negatif hemde HBeAg pozitif hastalarda hemen hemen aynıdır. Fakat fibrotik aktivite HBeAg negatif hastalarda pozitif hastalardan daha yüksektir. Sirozun yıllık insidansı HBeAg pozitif kronik hepatit B'li hastalarda %2-6, HBeAg negatif kronik hepatit B'li hastalarda %8-10'dur. HBeAg negatif hastalarda sirozun yüksek insidansı yaş ve fibrozun durumuna göre değişir ve HBV enfeksiyonu HCC ve siroza ilerleyebilir⁶².

Gizli (Occult) HBV enfeksiyonu HBsAg negatif hastalarda karaciğer dokusunda HBV DNA'nın varlığı ile tanımlanır. Gizli HBV enfeksiyonuna sahip hastaların büyük bir çoğunluğu asemptomatik olup genellikle tarama sırasında tespit edilirler. Seropozitif gizli HBV enfeksiyonu anti-HBc ve/veya anti-HBs'nin varlığı ile karakterize iken seronegatif gizli HBV enfeksiyonunda ne anti-HBc ne de anti-HBs belirlenir. Anti-HBc, anti-HBs ve anti-HBe sıklıkla gizli HBV enfeksiyonunda tespit edilir⁶³.



Şekil 5. Akut HBV enfeksiyonun kronik enfeksiyona ilerlemesi

2.11. Epidemiyoloji

Hepatit B virus enfeksiyonu ciddi bir halk sağlığı problemidir, kronik hepatit, siroz ve HCC'in temel nedenidir. Yaklaşık 2 milyar kişi HBV ile enfekte olup bunların 360 milyondan fazlası kronik taşıyıcıdır. Kronik taşıyıcıların yaklaşık %75'i Asya ve Batı Pasifik'de yaşar. HBV enfeksiyonlu hastaların %15–40'ında siroz, karaciğer bozukluğu veya HCC gelişir. HBV ile ilişkili morbidite ve mortaliteden dolayı yıllık 500.000 ile 1.2 milyon insan HBV enfeksiyonu sebebi ile ölmektedir.

Kronik hepatit B enfeksiyonunun prevalansı dünyanın farklı bölgelerinde büyük oranda değişiklik gösterir. Dünyada kronik HBV enfeksiyonunun prevalansı yüksek, orta ve düşük endemisiteli olarak sınıflandırılmaktadır.

Hepatit B ile enfekte olan popülasyonun en az %8'i Güney Doğu Asya, Çin, Sahra altı Afrika, Avustralya ve Amazon Havzası gibi yüksek endemisiteli gelişmekte olan bölgelerde bulunur. Bu bölgelerde popülasyonun %70-95'i HBV enfeksiyonunun serolojik kanıtını gösterir. Enfeksiyonların çoğu bebeklik ve çocukluk döneminde ortaya çıkar. Çocuklarda birçok enfeksiyonun asemptomatik olmasından dolayı HBV ile

ilişkili akut enfeksiyon daha az tanınır, ancak yetişkinlerde ise kronik karaciğer hastalığı ve karaciğer kanseri için bu oran yüksektir⁶⁴.

Doğu ve Güney Avrupa'nın bir kısmı, Orta Doğu Japonya, Güney Amerika'nın bir kısmı ve Türkiye'nin de içinde yer aldığı Akdeniz Havzası HBV enfeksiyonu için orta endemisiteli görülmektedir. Bu ülkelerde popülasyonun %10 ile %60'ı HBV enfeksiyonu ile karşılaşmıştır ve %2-7'si kronik taşıyıcıdır. HBV ile ilişkili akut enfeksiyon bu bölgelerde yaygındır. Çünkü birçok enfeksiyon ergenlik döneminde ve yetişkinlerde meydana gelir. Bebeklerde ve çocuklarda meydana gelen enfeksiyonların çoğunluğu kronikleşir ve kalıcı hale gelir⁶⁵.

HBV'un düşük endemisitesi Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa ve Avustralya gibi birçok gelişmiş ülkede görülür. Bu bölgelerde HBV popülasyonun %5-7'sini enfekte eder ve %0.5-2'si kronik taşıyıcıdır. Ayrıca birçok HBV enfeksiyonu ergenlik döneminde ve damar içi uyuşturucu kullanımı, homoseksüel kadınlar, sağlık çalışanları, düzenli kan transfüzyonu veya hemodiyaliz gereken hastalar gibi yüksek risk gruplarında meydana gelir⁶⁵.

2.11.1. Bulaş Yolları

HBV enfekte vücut sıvıların teması ile yayılır ve doğal konağı sadece insandır. Kan bulaş için en önemli araçtır, ancak tükürük, semen ve vaginal sekresyonlar içeren diğer vücut sıvılarıyla da bulaş olmaktadır. HBV perinatal, cinsel yol, parenteral/perkutan ve horizontal yol olmak üzere 4 farklı yolla bulaşır (Tablo 2). Ancak HBV kontamine yiyecek veya su, böcek ve diğer vektörlerle bulaşmaz⁶⁵.

Perinatal periyod sırasında taşıyıcı annenin bebeğine HBV'un bulaşması perinatal bulaş ile meydana gelir. Özellikle Çin ve Asya gibi yüksek endemik bölgelerde enfeksiyonun prevalansını belirlemede en önemli faktördür. HBV aşısı rutin aşılama programına geçmeden önce HBV taşıyıcı olan bebeklerin oranı HBsAg pozitif ve HBeAg negatif olan anneler için yaklaşık %10-30'dur. Fakat anne hem HBsAg pozitif hemde HBeAg pozitif olduğunda perinatal enfeksiyonun insidansı %70-90

arasındadır. Enfekte annelerden bebeklerine HBV bulaşmanın 3 yolu vardır. Bunlar uterusda HBV'un transplasental geçişi, doğum sırasında geçiş ve doğum sonrasında anne sütü ile geçiştir⁶⁵.

Transplasental bulaş doğumdan önce olduğu için hepatit B aşısı ve HBIG bunu engelleyemez. Çin'de intrauterin HBV enfeksiyonu üzerine yapılan epidemiyolojik çalışmalarda intrauterin enfeksiyon HBsAg pozitif hamile kadınlarda %3,7-%9,9 oranında, HBsAg pozitif ve HBeAg pozitif kadınlarda ise %9,8-%17,39 oranında görülmüştür. HBV'un transplasental geçişi üzerine yapılan çalışmalarda iki muhtemel mekanizma belirtilmiştir. Birinci yol abortus gibi faktörlerin bazıları plasental mikrovasküler bozukluklara neden olabilir. Bu yüzden kanda anneye ait yüksek titredeki HBV fetusun döngüsüne katılır. İkinci yol hücre transferi, plasental doku, anneye ait kanda HBV'un yüksek titresi ile fetus adım adım enfekte olur ve sonunda HBV villus kapiller endotelial hücreler aracılığıyla fetusun sirkülasyonuna katılır.

Perinatal olarak HBV enfeksiyonu geçiren 1 yaşından daha küçük çocuklar ve yeni doğanlar için kronik enfeksiyonun olma riski %90'dır. Çünkü yeni doğanlar olgunlaşmamış immun sisteme sahiptir. HBeAg'nin transplasental geçişi fetusda HBV'a karşı immunolojik toleransa neden olur ve kronikleşmeye yol açar.

Hepatit B'nin cinsel yolla bulaşması dünyanın bütün bölgelerinde enfeksiyonun ana kaynağıdır. Özellikle Güney Amerika gibi düşük endemik bölgelerde hepatit B cinsel yolla bulaşan bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Uzun bir süre eş cinsel erkekler, cinsel yolla bulaş için yüksek risk grubu olarak kabul edilmiştir (Eş cinsel erkeklerin %70'i cinsel aktivitelerin 5 yıl sonrasında enfekte olmuştur). Heteroseksüellerde HBV enfeksiyonunun artan riski ile ilişkili faktörler cinsel aktivite süresi, cinsel partnerin sayısı, cinsel yolla bulaşan hastalığın tarihi ve sifiliz için serolojik test sonucunun pozitif olmasını içerir. Uyuşturucu kullanıcıları, hayat kadınları ve hayat kadınlarla cinsel temas enfeksiyon için yüksek risk faktörüdür⁶⁴.

Parenteral/perkutan bulaş, uyuşturucu kullanımı, kan nakli ve diyaliz, akupunktur, sağlık kurumlarında çalışanlar, dövme ve ev halkı arasındaki bulaşmayı içerir. Amerika'da ve Batı Avrupa'da intravenöz (damar içi) uyuşturucu kullanımı HBV bulaşması için en önemli yoldur (bütün hastaların %23'ü). Enfeksiyonun bulaşma riski

intravenöz uyuşturucu kullanım süresi ile artar. Kan veren kişilerde HBV varlığını göstermek için kanın taranmasından dolayı HBV enfeksiyonu ile ilişkili risk büyük ölçüde azaltılmıştır. Kan veren kimse HBeAg negatif olup asemptomatik taşıyıcı olduğu zaman bile bulaş halen mümkün olmaktadır. Enfeksiyonun başlıca kaynakları kan ve kan ürünleri ile kontamine cerrahi aletler ve diğer muhtemel kontamine eşyalardır. Ayrıca parenteral bulaş ameliyat sırasında da meydana gelmektedir. İğne batması, damar içi uyuşturucu kullanımı, kulak delme, dövme, akupunktur, sünnet işlemi sırasında, hastalara özellikle diyaliz ünitelerinin yanısıra dış ünitelerinden de HBV enfeksiyonun bulaştığı görülmektedir. Enfeksiyon için yüksek riski olan gruplar; sık sık transfüzyon veya hemodiyaliz yapılanlar, doktor, diş hekimi, hemşire ve diğer sağlık çalışanları, laboratuvar teknisyenleri, damar içi uyuşturucu kullanıcıları, polis, itfaiye, çamaşırhane işçileri ve enfekte kan ve kan ürünleri ile temas edenlerdir⁶⁵.

Kronikleşme riski cinsel yolla temas, damar içi uyuşturucu kullanımı, akupunktur ve transfüzyonda düşüktür (%5'den daha az). Bu tip bulaşma ile HBV enfeksiyonu genellikle immun tolerans fazı olmadan ergenlik veya yetişkinlik döneminde geçirirler.

Çocuklarda deri veya mukoza bütünlüğünün bozulması ile diğer çocuklarla yakın temas durumunda horizontal yol aracılığıyla HBV enfeksiyonu bulaşabilir. HBV uzun bir süre için dış ortamda ve en az 7 gün bulaşıcılığını korur. Bu yüzden diş fırçası, jilet ve oyuncak gibi kontamine eşyalarından bulaş mümkün olabilir. HBV DNA, hepatit B taşıyıcılarının çeşitli vücut salgılarında tespit edilmesine rağmen kan dışındaki vücut sıvılarından tükürük yoluyla HBV bulaşmasının herhangi bir somut kanıtı yoktur⁶⁴.

Tablo 2. HBV enfeksiyonunun bulaşma yollarına göre risk grupları

Parenteral/perkütan bulaşma • Çoklu transfüzyon yapılan hastalar • Hemodiyaliz hastalar • Tıbbi aletlerin kullanımı • Damar içi uyuşturucu kullanıcıları • Dövme yaptıranlar • Sağlık personeli	Cinsel yolla bulaşma • Erkek eş cinseller • HBV taşıyıcıların cinsel partnerleri • Hayat kadınları • Çok partnerli heteroseksüeller
Perinatal/vertikal bulaşma • HBV taşıyıcısı annelerin bebekleri	Horizontal bulaşma • Sosyoekonomik düzeyin düşük olduğu ve hijyen şartlarının kötü olduğu topluluklar • Anaokulu, kreş, yurt ve kışla gibi yerlerdeki topluluklar • Mental özürlüler

2.12. Tedavi

Kronik hepatit B tedavisinin primer hedefi HBV replikasyonunun baskılanarak en düşük düzeylerde kalmasını sürdürmektir. Uzun süren viral baskılanmanın amacı karaciğer hastalığının siroza ilerlemesini, karaciğer bozukluğu riskinin azalmasını ve karaciğer hasarı oluşan bu hastalarda HCC'in gelişmesini önlemektir.

Yüksek viral replikasyon, tedavi almayan HBsAg pozitif hastalarda kötü sonuçlarla ilişkilidir. Taiwan'da kronik hepatit B'li hastalarda karaciğer ile ilişkili komplikasyonlar genellikle HBV DNA seviyeleri 10^5 kopya/mL (>20.000 IU/mL)'den daha fazla olan hastalarda bildirilmiştir. Bu bulgular, yüksek HBV DNA düzeylerinin nekroinflamatuvar aktivite ve progresif karaciğer hasarına eşlik etmediği immun tolerans fazında olan genç hastalarda geçerli olmayabilir. Klinik veriler viral replikasyonun sürekli kontrolünün karaciğer dekompanseasyonu ve ölüm olasılığını azalttığını göstermiştir⁶⁶.

HBsAg kaybı HBeAg pozitif ve HBeAg negatif kronik enfeksiyonu olan hastalarda tedavinin son noktasıdır. Fakat HBsAg serokonversiyonu nadirdir ve birçok kısa süreli çalışmalarda primer son nokta olarak kullanılmamıştır. HBeAg pozitif hastalarda antiviral tedavinin amacı HBeAg'in kaybı ve anti-HBe antikörlerinin gelişmesidir. Uzun süreli antiviral tedavi ile artan oranına rağmen HBeAg serokonversiyonu nadirdir. HBeAg serokonversiyonunun tedavinin kesilmesinden sonra viral baskılanma ile sürdürebildiği 6-9 aylık periyoddan sonra antiviral tedavinin sonlandırılışı gösterilmiştir. HBeAg kaybı sürekli değildir, bu yüzden bütün hastaların tedbir amaçlı sürekli gözetimi gerekmektedir.

HBeAg pozitif hastaların çoğunda HBeAg serokonversiyonu meydana gelmez ve bu yüzden birkaç yıl tedavi gerekir. HBeAg negatif hastalarda tedaviyi değerlendirmek daha zordur. Çünkü HBeAg serokonversiyonu son nokta olarak kullanılmaz. HBV DNA'nın baskılanması ve ALT seviyelerin normalleşmesi virolojik ve biyokimyasal cevabın işaretidir. Direnç oranı antiviral ajan ile değişmesine rağmen viral direnç ile ilgili problemler meydana gelebilir⁶⁷.

Antiviral tedaviyi başlatma kararı hastaların yaşı, HBeAg durumları, serum HBV DNA konsantrasyonu, ALT seviyeleri ve HCC'in riskini içeren birçok faktöre dayanır. Karaciğer hastalığının altta yatan histolojik şiddeti tedavinin başlaması için önemli bir faktördür. Tedavinin seçiminde ilacın etkinliği, güvenliği, tedavinin beklenen süresi ve direnç gelişiminin olasılığı dikkate alınmalıdır.

Normalin üst limitinden 2 kat daha fazla olan yüksek serum ALT değeri ve 20.000 IU/mL'den daha fazla HBV DNA seviyeleri olan HBeAg pozitif hastalar antiviral tedavi sırasında dikkate alınmalıdır. Bu hastalarda kronik hepatit B'nin histolojik kanıtını gösteren karaciğer biyopsisi gerektirmektedir.

Genellikle 20.000 IU/mL'den daha az serum HBV DNA'sı olan HBeAg pozitif hastalara tedavi önerilmez. Çünkü bu hastaların büyük çoğunluğu inaktif hastalığa ve normal serum ALT seviyelerine sahiptir. HBV DNA seviyeleri ve karaciğer hastalığının nekroinflamatuvar aktivitesi önemli düzeyde değişebilir ve bu hastalar HBV DNA'nın sabit düzeyde olması ve normal ALT seviyelerinin korunmasından emin olmak için izlenmelidir. Eğer serum ALT seviyeleri artarsa, serum ALT seviyeleri her 3-6 ayda

izlenmelidir. Bazen düşük seviyeli viral replikasyonlu hastalar önemli nekroinflamatuvar aktiviteye veya hepatit fibroza sahiptir.

Serum HBV DNA seviyeleri 20.000 IU/mL'den daha fazla ve normal ALT seviyeleri olan HBeAg pozitif hastalar genellikle gençlerdir. Böyle hastaların ALT seviyelerindeki değişikliklerin izlenmesi önerilir. Fakat yüksek HBV DNA seviyeli ve normal ALT seviyeli bazı hastalarda önemli karaciğer rahatsızlığı olabilir.

Serum HBV DNA seviyeleri HBeAg negatif kronik hepatit B'li hastalarda HBeAg pozitif kronik hepatit B'li hastalardan daha düşüktür. Ama birçok hastada karaciğer biyopsisinde önemli hepatik fibroz veya nekroinflamatuvar aktivite görülebilir. Bu yüzden HBV DNA seviyesi 20.000 IU/mL olan hastalarda antiviral tedavinin başlanması tavsiye edilir. Genellikle HBeAg negatif hastalardaki tedavi HBeAg pozitif olan hastalarla aynıdır⁶⁶⁻⁶⁸.

2.12.1. Pegile İnterferon

Geleneksel interferon kullanımının yerini haftalık dozun ve geliştirilmiş etkinliğinin avantajına sahip olan pegile interferon (PEG-IFN) almıştır. Bu ilaç daha az doza izin veren pegile kısmına sahiptir. PEG-IFN 12 aylık için haftalık verilir. Yan etkileri grip benzeri semptomlar, yorgunluk, lökopeni, sinirlilik, uyku bozukluğu ve depresyon olup geleneksel IFN'unki ile benzerdir.

HBeAg pozitif hastalarda HBeAg serokonversiyonu hastaların %32'sinde tedavi bittikten 6 ay sonra meydana gelir. Uzun süreli cevaplar genotip A (%47) olan kronik hepatit B'li hastalarda genotip D (%25) kronik hepatit B'li hastalardan daha iyidir. IFN'a dayalı tedaviye daha iyi cevap genç, kadın ve yüksek ALT, nispeten düşük HBV DNA seviyesi ve genotip A olan kronik hepatit B olan hastalarda görülmektedir. Uzun süreli çalışmalar tedavi tamamlandıktan sonra yıllar içinde doğal olarak beklenenden daha yüksek bir oranda HBeAg serokonversiyonunun geliştiğini göstermiştir⁶⁹.

IFN ile tedavi edilmiş hastaların yaklaşık %5 kadar önemli bir oranında HBsAg serokonversiyonu meydana gelmektedir. Bu özellikle genotip A'lı hastalarda görülür.

PEG-IFN HBeAg negatif hastaların tedavisinde önemli rol oynar. Viral replikasyonun uzun süreli kontrolü (< 20.000 IU/mL) tedavi tamamlandıktan 6 ay sonra hastaların yaklaşık %30'unda görülür. Bu seviyelerdeki viral replikasyonun kontrolü karaciğer hastalığının ilerlemesini azaltabilir. PEG-IFN'un asıl avantajı HBsAg serokonversiyonun olanağı ve tedavinin değişmeyen devam süresidir. Dezavantajı ise genellikle yorgunluk, sinirlilik ve lökopeni gibi yan etkileridir. Viral hepatit alevlenmeleri gelişmiş immün temizlemeden kaynaklanabilir. Alevlenme hastaların %12-18'inde görülebilir. PEG-IFN dekompanseasyonlu sirozda tedavi için değildir. PEG-IFN kullanıldığında temel kaygı birçok hastada tedavinin tamamlanmasında viral replikasyonun devam etmesidir. Bu kaygı oral antiviral PEG-IFN tedavisinin tamamlanmasından sonra viral replikasyonu sürdüren hastalar için muhtemeldir. Fakat bu yaklaşım klinik deneylerde doğrulanmamıştır^{70,71}.

2.12.2. Nükleoz(t)id Analogları

LAM, ETV ve TEL gibi nükleozid analogları ile birlikte ADV ve TDF gibi nükleotid analogları hepatit B tedavisinde onaylanmıştır. Nükleoz(t)id analogu HBV polimerazın kompetitif inhibitörüdür. Çünkü bu yapılar doğal nükleotidlerle benzerdir. Bu ajanlar viral replikasyon sırasında DNA'ya entegre olur. Hidroksil grubun eksikliğinden dolayı kovalent bağ ile sonraki nükleotidin oluşumu imkansızdır ve DNA zincirinin sonlanmasına sebep olur. Bütün nükleotidler HBV replikasyonun inhibisyonuna yol açmaktadır⁷².

LAM, TEL, ADV, ETV ve TDF nükleoz(t)id analogları güçlü antiviral etkiye sahip oral olarak uygulanan ilaçlardır. Nükleoz(t)id analoglarıyla tedavi genellikle iyi tolere edilmiştir. Bu ilaçların temel sorunu IFN ile karşılaştırıldığında anti-HBe ve anti-HBe serokonversiyonun düşük oranı ve tedavinin devam süresinin belirsizliğidir.

Direnç riski TDF ve ETV için düşük, ADV için orta ve LAM, TEL için yüksek orandadır. Direnç görülen mutasyonlar genellikle HBV polimeraz için kodlanan gende meydana gelir. Çünkü bu gen viral zarfı kodlayan gen ile üst üste gelmektedir. Direnç mutasyonları her iki proteini etkileyebilir. TDF ve ETV diğer nükleoz(t)id analoglarından daha düşük direnç riskine sahip olduğundan bu ilaçlar başlangıç tedavisinde tercihen kullanılabilir⁷³.

2.12.2.1. Lamivudin

Lamivudin, 1998 yılında kronik hepatit B tedavisinde günde 100 mg doz olarak FDA tarafından onaylanan ilk oral sistin nükleozid analogudur. Hücresel kinaz tarafından lamivudin trifosfata fosforile edilir. Difosfat grubun çıkarılmasından sonra LAM 5' monofosfat HBV polimeraz tarafından 3' ucunda uzayan viral DNA zincirine katılır. Viral DNA zincirine lamivudin'in katılması zincir polimerizasyonu için gerekli 3' hidroksil'in yokluğundan dolayı zincirin sonlanmasına neden olur. HBV'una karşı lamivudin'in antiviral etkisi araştırıldığında, in vitro koşullarda HBV DNA ile transfekte hücrelerde 0.01 µM ve 3.3 µM arasında bulunan IC₅₀ değeri belirlenmiştir. Lamivudin ALT'nin normalleşmesinde, HBeAg serokonversiyonu, HBV DNA'nın baskılanmasında ve fibrozda etkilidir. Ayrıca LAM tedavisi almayan hastalarla karşılaştırıldığında, hem sirotik hemde pre-sirotik hastalarda karaciğer dekompanseasyon ve HCC içeren komplikasyonların oranını azalttığı gösterilmiştir. HBeAg pozitif hastalar için tedavinin bitim noktası viral replikasyonun kontrolü ile ilişkili HBeAg serokonversiyonudur. Serokonversiyon oranı tedavisi uzun süren hastalarda artarak devam eder (tedavinin 1 yılından sonra %17.2 yıldan sonra %27 ve 5 yıldan sonra %50). Lamivudin direnci tedavi öncesi HBV DNA'sı yüksek olan, uzun süre tedavi gören ve HBV DNA'sı yüksek olan hastalarda daha fazla gelişebilmektedir. Lamivudin ile tedavinin 8 yılından sonra ilaç direnci mutasyonları %76 kadar yüksek oranda görülür. Direnç geliştiği zaman ilacın etkinliği kaybolur ve bazı hastalarda karaciğer hastalığının şiddetlenmesine neden olur. Bu yüzden tedavi başlangıcında lamivudin

kullanımı artık en iyi seçim değildir, gelişen direnç profilinden dolayı tedavi için diğer antiviral ajanları kullanmak daha uygun olur^{8,74-76}.

2.12.2.2. Telbivudin

Telbivudin 2006 yılında kronik hepatit B tedavisinde günlük 600 mg olarak FDA tarafından onaylanmıştır. Telbivudin doğal olarak timidinin nükleotidi olan modifiye edilmiş L izomeridir. Bu yüzden hücresel kinazlar tarafından aktif telbivudin trifosfat formuna kolayca fosforile olur. Telbivudin 5' trifosfat, doğal substrat timidin 5'trifosfat ile rekabete girerek HBV DNA polimerazını inhibe etmektedir. HBV DNA replikasyonuna telbivudin 5' trifosfatın katılımı DNA zincirinin önceden sonlanmasına sebep olur.

Telbivudin'in HBV'a karşı LAM'den daha güçlü etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Önceki faz IIb çalışmalarında TEL LAM ile karşılaştırıldığında virolojik ve biyokimyasal cevapların daha fazla olduğu, faz III deneylerinde ise HBV baskılanmasının daha üstün olduğu görülmüştür. Çin'deki kronik hepatit B'li hastaların diğer faz III çalışmalarında LAM ile karşılaştırıldığında telbivudin'in direnç oranının düşük ve antiviral etkisinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir⁸.

HBV replikasyonuna karşı telbivudin'in antiviral etkisi için in vitro koşullarda hepG2, 2.2.15 insan hepatoma hücrelerinde ve yaklaşık 0.19 µM IC₅₀ değeri belirtilmiştir. Telbivudin HIV-1'e karşı aktivite göstermez. Klinik deneylerde telbivudin'in kronik hepatit B'li hastalarda adefovir ve lamivudin'den daha etkili olduğu gösterilmiştir^{8,66,77}.

2.12.2.3. Entecavir

LAM dirençli kronik hepatit B tedavisinde 2005 yılında entecavir günlük 0.5 mg ve 1 mg doz olarak FDA tarafından onaylanmıştır. Entecavir intrasellüler fosforilasyon ile aktif 5' trifosfat metabolitine dönüşen guanozin karboksilik analogudur. ETV aktif trifosfat formuna etkili bir şekilde fosforillenir. Doğal substrat olan deoksiguanozin trifosfat ile rekabete girerek ETV trifosfat fonksiyonel bir şekilde HBV polimerazın aktivitesini inhibe eder. ETV guanozin, pregenomik mRNA'nın revers transkripsiyonu ve pozitif iplikli HBV DNA'nın sentezini içeren HBV DNA polimerazı inhibe eder. Zorunlu sonlandırıcı zincir olan diğer NA'ların aksine ETV'in aktif kısmı zincirin sonlanmasından önce birkaç ilave nükleotidin bağlanmasına izin veren 3' hidroksil grubu içerir. Bu yüzden ETV zorunlu olmayan sonlandırıcı zincirdir⁸.

LAM ile karşılaştırıldığında ETV'in in vitro koşullarda viral DNA replikasyonunu azaltmada 30 ila 2220 kat daha etkili olduğu gösterilmiştir. ETV ve LAM'in karşılaştırıldığı erken faz III çalışmalarında ETV ile tedavinin yüksek oranda virolojik baskılanmayı sağlamıştır.

ETV önceki antivirallerden daha etkilidir. Baş ağrısı (%2-4) ve yorgunluk (%1-3) gibi bazı yan etkilere sahiptir. Ayrıca ETV yemekten önce veya 2 saat sonra boş mideye alınmalıdır. ETV, in vitro koşullarda 3.75 µM konsanstrasyonda % 50 kadar HBV DNA sentezini inhibe etmektedir. LAM dirençli HBV yüksek etkili ETV tedavisine duyarlıdır. Klinik deneylerde ETV, LAM ile karşılaştırıldığında hem HBeAg pozitif hemde HBeAg negatif hastalarda daha üstündür^{8,77,78}.

2.12.2.4. Adefovir

Adenozin monofosfat nükleotid analogu olan adefovir'in kronik hepatit B tedavisinde günlük 10 mg doz olarak kullanılması 2002 Eylül'de FDA ve 2003 Mart'da Avrupa Birliği tarafından onaylanmıştır. İki büyük faz III çalışmasında ADV ile ilgili histolojik, virolojik ve biyokimyasal parametler geliştiği, fakat 10 mg dozun yetersiz olduğu ve viral baskılanma oranının nispeten düşük olduğu görülmüştür. Adenozin

monofosfat hücresel kinaz tarafından aktif metabolit adefovir difosfata kolay bir şekilde fosforillenir. ADV difosfat doğal substrat deoksiadenozin trifosfat ile rekabet ederek HBV DNA polimerazı inhibe eder. Uzayan viral DNA'ya ADV difosfatın katılımı ile LAM'e benzer şekilde DNA zincirinin sentezlenmeden sonlanmasına neden olur. ADV'in avantajlarından biri LAM dirençli mutantlara karşı etkili olmasıdır. ADV'in yüksek dozu daha etkili olmasına rağmen nefrotoksisiteden dolayı kullanılmamaktadır. Nefrotoksisite genellikle tedavinin başlamasından sonra 4-12 ayda meydana gelmektedir⁸.

ADV difosfatın HBV polimeraz için inhibisyon değeri (K_i) 0.1 μM 'dir. HBV'a karşı ADV'in antiviral etkisi için in vitro koşullarda HBV DNA ile transfekte insan hepatoma hücrelerinde 0.2 μM ve 6.3 μM arasında bulunan IC_{50} değerleri belirtilmiştir^{8,77}.

2.12.2.5. Tenofovir

TDF (Tenofovir disoproksil fumarate; TDF) HBV ile HIV-1 ve HIV-2 gibi retroviruslara karşı aktivite gösteren asiklik nükleotid analogudur. Tenofovir adefovir'in metil türevidir ve adefovir ile ilişkili antiviral direnç ve etkisi benzer mekanizma göstermektedir. Bu yüzden tenofovir, adefovir gibi in vivo ve in vitro koşullarda LAM dirençli HBV'a karşı antiviral aktivite göstermektedir.

Tenofovir Ekim 2001'de HIV tedavisinde ve Ağustos 2008'de kronik hepatit B tedavisinde günde 300 mg olarak FDA tarafından onaylanmıştır. Tenofovir hücresel kinaz tarafından tenofovir difosfat aktif metabolitine intrasellüler olarak metabolize edilir. Tenofovir difosfat uzayan DNA zincirinin sonlanmasına neden olan doğal substrat deoksiadenozin trifosfat ile rekabete girerek HBV DNA polimerazı inhibe eder. Viral DNA polimeraz için K_i değeri 0.02 μM 'dir⁷⁷.

HBV replikasyonuna karşı tenofovir'in antiviral etkinliği için in vitro koşullarda HBV ile transfekte hepatoma hücrelerinde 2.5 μM IC_{50} değeri belirtilmiştir. Faz III

klirik deney sonuçları günlük 300 mg doz 48 haftalık tenofovir tedavisi ADV ile karşılaştırlıldığında antiviral etkisinin daha üstün olduğu gsterilmiştir^{8,66,78,79}.

2.13. Antiviral İlaç Direnci

2.13.1. İlaç Direnci Gelişmesindeki Mekanizmalar

NA'larına HBV direncinin ortaya çıkması viral, konak ve antiviral ilaç faktörlerinin kombinasyonu ile meydana gelir. Bu faktörler; hızlı viral replikasyon dinamiği, kazanılmış mutasyonlar, seçilen varyantların uygun karakteristiği, benzer türlerin dağılımı, kronik enfeksiyon koşuları altında immün cevap, dirence karşı genetik engel, antiviral ajanın yapısı ve zelliėidir⁶⁸.

HBV günlük 10^{12} – 10^{13} virion gibi yüksek replikasyon oranına ve her replikasyon siklusunda her baz başına yaklaşık 10^{-5} yüksek mutasyon oranına sahiptir ki böylece günde yaklaşık 10^{11} – 10^{12} nokta mutasyonları oluşur. Periferal kanda, viral partiküllerin %50'si günlük yenilenmektedir. Çünkü HBV genomu yaklaşık 3200 baz eşleşmesinden oluşur. Muhtemelen günlük tek baz değişikliği meydana gelebilir. HBV genomik DNA, pgRNA'nın revers transkripsiyonu ile genom replikasyonu yapan DNA virusları arasında benzersizdir. Ancak HBV revers transkriptaz hataya meyilli bir enzimdir. Çünkü hatalı bir şekilde birleşmiş nükleotidleri çıkartan herhangi bir kanıt-okuma aktivitesi bulunmamaktadır. HBV revers transkriptaz'ın düşük duyarlılığı diğer DNA viruslarından yaklaşık 10 kat daha fazla mutasyon oranına sebep olmaktadır⁵.

NA'larına direnç mutasyonları, viral genom replikasyonun reaktivasyonu için bir rezervuar olan cccDNA'da gösterilmiştir. cccDNA'nın yenilenmesi ve stabilitesi, NA ile HBV'un tamamen baskılanması için engeldir ve antiviral tedavinin kesilmesinden sonra viral nksetmeden sorumludur. Ayrıca enfekte hepatositler karaciğerde HBV'un devamlılığına sebep olan uzun bir yarı ömre sahiptir. Bu şekilde ilaç direnci belirlenir ve yeni karaciğer hücrelerine yayılır⁸⁰.

Kronik HBV enfeksiyonu sırasında HBV genomunun değişkenliği, ilaca dirençli HBV suşlarının oluşmasına sebep olur. Bir varyanta selektif avantaj sağlayan daha önceden mevcut veya yeni kazanılan bir mutasyon ortama daha uyumlu olan ve karaciğerde daha hızlı yayılabilecek yeni virusların oluşmasına sebep olur. Bu durumda uygun mutantlar birikir ve antiviral ilaçların varlığında baskın suşlar haline gelirler. NA'larına direnç, HBV'un yüksek replikasyon oranı ve viral polimerazın yanlış eğiliminden dolayı kaçınılmazdır⁸¹.

İmmun cevap, antiviral tedavi sırasında ve sonrasında ilaç direncinin indüksiyonunda önemli bir rol oynar. Antiviral tedavi sırasında, polimeraz bölgesinde direnç mutasyonlarına ek olarak zarfın üst üste gelen okuma çerçevesi seçilir ve aynı zamanda hepatit B yüzey antijeninin (HBsAg) antijenitesini de değiştirir. Böylece virus immun cevaptan kaçabilir. HBV'un immun kaçış varyantlarının ortaya çıkması, HBsAg pozitif hastalarda HBV reaktivasyonuna sebep olur. İmmun ve antiviral seçim baskıları, aşı kaçış mutantlarına ve antiviral direnç varyantlarına neden olur⁸².

2.13.2. İlaç Direncinin Temel Prensibi

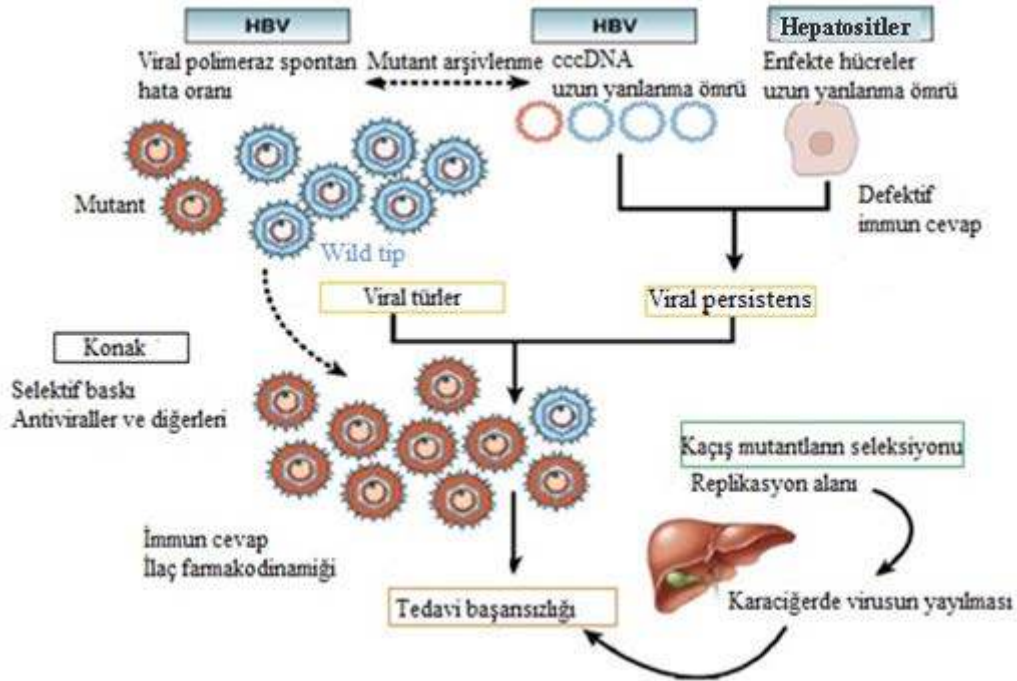
Enfekte hücrelerden HBV'un temizlenmesinde yavaş kinetiğin major belirleyeni cccDNA olarak adlandırılan replikatif DNA formudur. Kronik HBV enfeksiyonu boyunca, cccDNA hepatositin nükleusunda lokalizedir ve uzun yarılanma ömrüne sahiptir. Daha da fazlası, NA'ları ile yapılan antiviral tedavi cccDNA'nın başlangıç formasyonunu almasına engel değildir ve bu durum kalıcı viremi varlığının tedavi boyunca var olduğunu ve enfeksiyonun yeni hücrelere taşındığının göstergesidir. HBV cccDNA viral genomun reaktivasyonu için rezervuar görevi görür, aynı zamanda antiviral tedavinin geri çekildiği durumlarda viral nüksün veya KHB'li hastalarda immun baskılanmanın nedenidir. Ayrıca hepadnavirus'un enfekte ettiği Kuzey Amerika dağ sıçanı modellerinde ilaç dirençlerinin arşivlenerek cccDNA'da biriktiği gösterilmiştir ve bu yüzden çapraz dirence neden olan ilaçlar kullanıldığında hızlı seleksiyon olmaktadır. Dolayısıyla, cccDNA'nın stabilitesi ve tekrarlanma yeteneği

sebebiyle KHB'li hastalarda enfeksiyonun antiviral ajanlarla temizlenmesi oldukça güçleşmektedir⁸³.

Konağın uygunluğu ve viral faktörler viral kalıcılığı ve NA'larına direnci belirler. Enfekte hepatositler oldukça uzun yarılanma ömrüne sahiptir ve HBV persistensinin karaciğerde devamını sağlamaktadır. Matematiksel modelleme hepatositlerin yarılanma ömrünün 30-100 gün arasında değiştiğini göstermektedir ki bu yarılanma ömrü vakanın immun cevabına bağlıdır. Hastalığın kronik fazında HBV genom değişkenliği viral suşların seleksiyonunu etkilemekte ve belirlemektedir. HBV genomlarının araştırıldığı klonal ve pyrosequencing çalışmalarında tedavi başlamadan önce tek mutasyonun tüm viral popülasyonda ortaya çıkabileceği gösterilmiştir, viral alt türlerin enfeksiyon boyunca aynı vakada ortaya çıkması mümkündür. Farklı varyantlar veya mutantlar enfeksiyonun farklı aşamalarında seleksiyona uğrarlar ve bu seleksiyon konak immun cevaba veya antiviral tedaviye göre yapılır⁸⁴.

Antiviral tedavi boyunca ilaç dirençli mutantların seleksiyonunda farklı mekanizmalar söz konusudur. Yukarda tanımlandığı gibi, genetik olarak birbirinden uzak varyantların kompleks miksinin NA'ları ile tedavisi ve buna dayalı selektif baskı nedeniyle replikatif avantajları mevcuttur. Yeni kazanılmış veya önceden var olan mutasyonlar varyanta selektif avantaj sağlamaktadır. Bu yolla yeni virusların oluşumu gerçekleşmektedir ki bu tür oldukça fit ve karaciğerde yayılımı hızlıdır, bu yolla mutant birikmesi ve karaciğerde varyantın dominant hale gelmesi antiviral ilaç varlığında mümkündür. Wild tip ile dominant mutantın karaciğerde yer değiştirmesi yavaş bir süreçtir, hayvan modellerinde çalışmalarda dirençli mutantların öncelikle daha önce enfekte olmamış hücreleri enfekte ettiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla dominant mutantın yayılımı HBV'un replike olabileceği enfekte olmayan hücre sayısı ile bağlantılıdır. Wild tip ile enfekte hücrelerin immun sistem tarafından ortadan kaldırılması aylar alabilmekte, yeni hepatositlerin gelişmesi ve bunların ilaç dirençli HBV mutant tarafından enfekte edilmesi şüphe arz etmektedir. İlaç dirençli mutant HBV'ların enfektif kabiliyetleri seleksiyon hızını ve aynı zamanda viral yüzey antijenini kodlayan gende meydana gelecek mutasyon viral yapı ve enfektiviteyi etkileyebilmektedir. Sonuç olarak, ilaca direnç seviyesi viral polimerazda meydana gelen spesifik mutasyonlarla ilişkilidir^{85,86}.

Antiviral ilaç direnci viral genomda adaptif mutasyonun meydana gelmesi ile kazanılmaktadır. HBV enfeksiyonu yüksek miktarda virus üretimi ve devinim ile karakterizedir ki günlük 10^{11} virion üretilmektedir. Daha da fazlası, viral popülasyon tarafından enfekte edilen bireyler oldukça heterojendir. HBV replikasyonunun yüksek oranı ve yüksek mutasyon oranı ile kombine olması KHB'li hastalarda viral alt türlerin farklılaşmasını beraberinde getirmektedir, her biri 1 veya daha fazla mutasyon taşımaktadır. İlaç direnci ile mutasyon ilişkisinin olasılığı tedavi boyunca kullanılan ilacın potensi ile alakalıdır. Replikasyon yapısı ve replikasyon kapasitesi izolatlarda primer veya sekonder mutasyonun ortaya çıkışını etkilemektedir. HBV replikasyon bölgesinin uygunluğu direncin belirlenmesinde etkindir. Tedavi rejiminde dirence karşı genetik bariyer spesifik mutasyonların sayısını artırmakta ve bu da ilaç direncini artırmaktadır. Sonuç olarak, antiviral ilaç direnci konakta virus ile enfekte hepatositlerin karakteristiği ile ilişkilidir, aynı zamanda immun cevap ve genetik geçmiş de belirleyicidir (Şekil 6)^{85,86}.



Şekil 6. HBV ilaç dirençli mutantların seçim mekanizması

2.13.3. İlaç Direncinin Klinik Sınıflandırılması

Antiviral ilaç direnci klinik olarak primer antiviral tedavi başarısızlığı (cevapsızlık), sekonder antiviral tedavi cevapsızlığı (virolojik kırılma) ve biyokimyasal kırılma olmak üzere 3 kategoride sınıflandırılır.

Primer cevapsızlık, NA tedavisinin başlamasından 6 ay sonra serumda HBV DNA miktarının $1 \log_{10}$ IU/mL veya daha yüksek olması olarak tanımlanmaktadır. Bu bulguda HBV DNA tespitinde değişkenlik de rol oynamakta olup doğru virolojik cevabı yansıtmaktadır, fakat klinik açıdan HBV DNA miktarının $\log_{10}$ IU/mL'nin altına inmesi bir anlam ifade etmemektedir. Primer cevapsızlık konağa bağlı faktörlerden kaynaklı olabilir, ayrıca virus veya ilaç da belirleyicidir. Enzimlerdeki polimorfizmler nedeniyle pro-ilaçların aktif bileşenlere dönüşmesi veya NA'ların fosforillenerek trifosfat hallerini almaları söz konusudur ve bu yolla primer cevapsızlık devam edebilir. ADV'e karşı primer cevapsızlığın geçtiği durumlarda viral suşlar bir veya daha fazla antiviral tedaviye karşı çok az hassasiyet taşımaktadır. Antiviral tedavinin dozu ve potensi de belirleyicidir. Örneğin; ADV'in kabul edilen dozu 10 mg'dır ve yüksek dozlarda yüksek potens göstermemektedir. ADV'e karşı primer cevapsızlık çok önemli bir faktördür. Primer cevapsızlığı gözlemlemek oldukça önemlidir, çünkü 6-12 ay sonunda yüksek rezidüel viral seviye antiviral direncin artan riski ile ilişkili görülmektedir⁸⁷.

Sekonder antiviral tedavi başarısızlığı olarak bilinen viral kırılma antiviral tedavisi tamamlamış ve cevap geliştirmiş vakalarda 1 ay arayla ardışık iki örnekte HBV DNA miktarının $1 \log_{10}$ IU/mL ve üzerinde olması olarak tanımlanmaktadır. Serum HBV DNA'sında artışı doğrulamak için örneğe ihtiyaç yoktur ki bu durum ALT alevlenmesi olan hastalar için geçerlidir. Başlangıçta serum HBV DNA seviyesi aşağı yönlü eğilimlidir, çünkü antiviral direnç taşıyan HBV mutantları wild tiplere nazaran daha az replikasyon döngüsüne sahiptirler. Bununla birlikte, birbiriyle yarışan mutasyonların var olması replikasyon hızını yeniden düzenleyebilir ve tedavi süresince birikme özelliği gösterebilir öyleki bu tip durumlarda serumdaki HBV DNA seviyesi tedavi öncesi seviyeyi geçebilir⁸⁸.

Biyokimyasal kırılma, normal değerleri yakalamış hastada serum ALT seviyesinin tedavi boyunca yükselmesine verilen addır. Serum ALT seviyesi virolojik

kırılmadan sonra birkaç hafta veya birkaç yıl normal kalabilir. Biyokimyasal kırılma sıklıkla virusun da çoğalmasıyla birlikte, bazı vakalarda aminotransferazlardaki belirgin artış hepatit alevlenmesi olarak adlanmaktadır ki bu durumda ALT düzeyi normal düzeyin neredeyse beş katından fazladır ve nadiren hepatik dekompanseasyona sebep olur⁸⁷.

2.13. 4. İlaç Direncinin Moleküler Mekanizması

HBV polimerazın revers transkriptaz bölgesinin moleküler modelleri NA'larına karşı HBV direncine neden olan mekanizmaları belirlemek için oluşturulmaktadır. Kullanılan bu modelde, antiviral direnç görülen mutasyonların aminoasit değişiklikleri, dirence sebep olan mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlamak için fonksiyonel bölgeler haritalanmıştır. Örneğin, LAM direnç mutasyonlarına neden olan moleküler modelde metillenmiş dNTP ile birlikte oxathiolane halkasının aminoasitlerle ters düşmesi sonucu uzaysal konformasyon değişmektedir ve buna neden olarak da yapısal engel gösterilmektedir. Replike olan HBV DNA'ya trifosfat bağlanmasını sağlayan enzimin katalitik aktivitesi inhibe olur ve wild tip suşlara nazaran NA'larına karşı affinite oldukça azalır. ADV'e direncin mekanizması ile ilgili olarak A ve D bölgelerinde meydana gelen mutasyonların HBV polimeraz bölgesine trifosfat bağlanmasını indirekt yolla engellediği tahmin edilmektedir. Doğal substrat olan dATP'ye karşı affinite oldukça artmakta, buna karşın analog olan ADV difosfata affinite azalmaktadır. B bölgesinde var olan rtA181V/T mutasyonu rtM204'ün pozisyonunun değişmesine sebep olmakta ve katalitik bölgenin konformasyonunda allosterik değişiklik meydana gelmektedir. Bu durum, katalitik bölgede nispeten nükleik asit kalıp zincirinin pozisyonunda değişim meydana getirmekte, mutasyonlu suşun pregenomunun zarfla kapanmasını azaltmakta, HBV DNA sentezinde hataları indüklemekte ve gelecekte mutasyonlu suşun replikasyonunu inhibe etmektedir. C ve D bölgelerinde meydana gelen rtV214A ve rtQ215S mutasyonları polimeraz fonksiyonunu allosterik etki meydana getirerek inhibe etmektedir^{5,84}.

2.13. 5. Çapraz Direnç

Çapraz direnç daha önce virusun maruz kalmadığı ilaçlara tepki olarak tanımlanmaktadır. Çapraz direnç perspektifine göre; kabul gören 5 NA’u mevcuttur ve yapısal karakterlerine göre 3 gruba ayrılmaktadır; L-nkleozidler, alkil fosfonatlar ve D-siklopentan grubu.

NA tedavi hatasına bağlı olarak iki mutasyon ön plana çıkmaktadır; primer direnç mutasyonları ki bunlar direkt ilaç direncinden sorumludur ve sekonder mutasyonlar ise replikasyon bileşenlerini güçlendirmektedirler. Sekonder mutasyonlar viral polimerazda dirençle ilişkili seleksiyon ile ortaya çıkmaktadırlar ve virus replikasyon düzeni bunda belirleyicidir. Sekonder mutasyonlar antiviral direnç açısından önemlidirler ve cccDNA’da primer ilaç direnç mutasyonlarının arşıvlenmesine neden olmaktadırlar. LAM ve TEL’e karşı direnç geliştiren ortak mutasyonlar diğer L-nkleozidlerine de direnç göstermektedir ve ETV’e duyarlılık azalmakta, fakat TDF veya ADV’e duyarlılık devam etmemektedir. Aksine, ADV ve TDF’e direnç gösterenlerde L-nkleozidlere ve ETV’e duyarlılık devam etmektedir. L-nkleozidler (LAM ve TEL) ve alkil fosfonatlar da (ADV ve TDF) rtA181T/V mutasyonunu seçer, böylece çoklu ilaç direnci için rtA181T/V’nin bir markır olma özelliği ortaya çıkmaktadır. Çoklu mutasyonlar LAM ve TEL’e karşı ilaç direncinin devamını sağlamaktadır ve ETV’e karşı yüksek seviyeli direnç için de gereklidirler⁸⁴.

NA grupları arasında çapraz direncin var olmasının üstesinden ancak NA’larından farklı olarak viral yaşam siklusunu bloke eden ilaçların devreye sokulması ile gelinebilir. Yakın gelecekte bu tip ilaçların uygunluğu mümkün görülmemektedir. Dolayısıyla, NA direncinin moleküler mekanizmasının tam anlaşılması gerekmektedir ve kullanımlarının optimize edilmesi elzemdir, bunların gerçekleşmesi için ilaç direnci ve çapraz direncin kantifikasyonunun belirlenmesi ve tanımlanmasına yönelik metodlar geliştirilmelidir^{85,87}.

2.13. 6. Çoklu İlaç Direnci

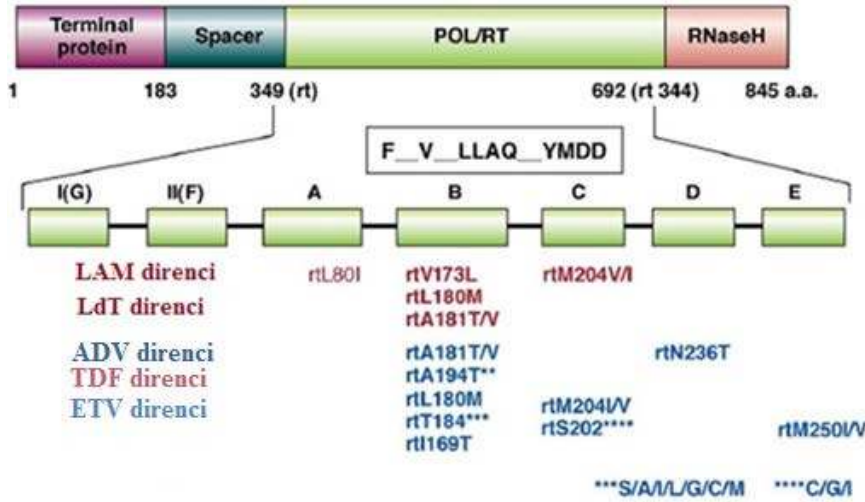
KHB'li hastalar LAM ile tedaviyi takiben ETV veya ADV gibi benzer ilaçlarla tedavi edildiği zaman ardışık monotedavi ile HBV çoklu ilaç direnci suşu gelişebilir. Klonal analizlerde çoklu ilaç direncinin genellikle aynı viral genomda direnç mutasyonlarının birbirine eklenmesiyle meydana geldiği gösterilmiştir. Bu seleksiyon sürecinde oluşan mutantlar her iki ilaca karşı direnç gösterir. Eklenen tedavi stratejisi ile hızlı viral baskılanma oluşmaz, özellikle de mutantların yayılması için büyük replikasyon alanı var ise çoklu ilaç direnç suşları ortaya çıkmaktadır.

Karaciğer transplantasyonu sonrası HBV çoklu ilaç direnci suşu taşıyan hastalarda varyantların uzun süreli klonal ve fenotipik analizi, üst üste çıkan polimeraz ve yüzey genlerinde meydana gelen mutasyonların LAM ve ADV direnci verdiğini ve virusun anti-HBs antikorları tarafından tanısının azaldığını göstermiştir. Bu bulgular antiviral tedavi sırasında tam viral baskılanmayı elde etmenin gerekli olduğunu vurgular^{85,89}.

Bazı spesifik tek mutasyonlarda çoklu ilaç direnci görülmektedir. Çoklu ilaç direnci, sadece LAM ve TEL'e duyarlılığı değil aynı zamanda ADV ve TDF'e duyarlılığı azaltmada sorumlu olan rtA181V/T yerdeğişimi ile gösterilmiştir. Bu durum direnç mutasyon profilini belirlemek için tedavi başarısızlığı olan hastalarda genetik direnç testinin gerekli olduğunu belirtmektedir^{90,91}.

2.13. 7. Antiviral İlaç Direnci Mutasyonları

HBV polimeraz bölgesi son zamanlarda A-G olarak belirlenmiş 7 farklı fonksiyonel kısma ayrılmıştır (Şekil 7). Mutasyon bölgeleri revers transkriptazın A ve D kısımlarında yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Direnç mutasyonlarının 2 temel kısmı NA ile monotedavi sırasında seçilebilir. Bunlar katalitik bölgenin bir kısmında bulunan rtM204 kodonu içeren ve içermeyenlerdir⁵.



Şekil 7. HBV ilaç direnci mutasyonları

2.13.7.1. Lamivudin İlaç Direnci Mutasyonları

LAM HBV'un replikasyonunu baskılayan ve KHB tedavisinde kullanılan ilk NA'dur. İlaç direncinin yüksek oranları uzun süreli LAM tedavisi sırasında bulunmuştur. LAM direnci ilk yılda hastaların yaklaşık %20'sinde, 5 yıl sonra ise tedavi alan hastaların yaklaşık %70'inde görülmüştür. Direncin yüksek oranından dolayı LAM tercih edilen ilk basamak ilaç olarak tavsiye edilmemektedir. LAM direncinin moleküler mekanizması dNTP bağlanma bölgesinde LAM'in oxathiolane halkasının valin veya izolösünün β -uzantılı yan grubu ile çakışmasına sebep olduğu sterik engeldir.

LAM ilaç direnci mutasyonları başlıca rtM204V/I/S, rtA181T, rtL180M/C, rtV173L, rtL80V/I, rtL169T, rtT184S/G ve rtQ215S'dir (Şekil 8)⁸⁵.

YVDD (tyrosine-valine-aspartate-aspartate) ve YIDD (tyrosine-isoleucine-aspartate-aspartate) ile sonuçlanan sırasıyla rtM204V ve rtM204I mutasyonlarının primer direnç mutasyonları olarak yaygın olduğu kabul edilmektedir. Mutasyonların LAM'e duyarlılığı 100 kat kadar azalttığı in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. rtM204V/S değişiklikleri rtL180M ile birlikte kombinasyonda belirlenirken rtM204I değişimi tek başına bulunabilir. Daha az yaygın olan rtA181T mutasyonunun rtM204V/I yokluğunda geliştiği belirtilmiştir.

rtL180M mutasyonu genelde LAM direncini artırarak rtM204V/I/S ile ilişkili mutasyonlarda belirlenir. rtL80V/I mutasyonu ilk olarak birçok hepatitli hastadan izole edilen HBV genotip C’de saptanmıştır. rtV173L mutasyonu ise karaciğer nakli olan hastalarda yüksek oranda bulunan LAM dirençli hastaların %9’unda meydana gelmektedir⁵.

2.13.7.2. Telbivudin İlaç Direnci Mutasyonları

Telbivudin HBV DNA polimerazın spesifik güçlü inhibitörüdür. HBeAg pozitif hastalarda TEL genotip direncinin giderek artan sıklığı 52 haftada %5 ve 104 haftada %25.1 iken HBeAg negatif hastalarda direnç insidansı %2.2 ve %10.8’dir. İki yıldaki bu direnç oranı LAM’dan daha düşük, ADV ve ETV’den daha yüksektir⁸.

TEL ile tedavi başarısızlığı olan izolatlarda yapılan genotipik analizde rtM204V/I mutasyonunun virolojik başarısızlık ve nüksetmeden sorumlu olduğu gösterilmiştir. rtM204I yerdeğişimi TEL tedavisinde primer ilaç direnci olarak görülmüş ve sık sık rtL80V/I ve rtL180M’in mutasyonları ile bulunmuştur. İlaç duyarlılık deneylerinde in vitro koşullarda rtM204I, rtM204V+rtL180M, rtI169T/rtM250V ve rtT184G/rtS202I mutasyonlarının TEL tedavisinde güçlü dirence sebep olduğu görülmüştür (Şekil 8). Çünkü TEL L nükleozid analogudur ve TEL direnci ADV, TDF ve ETV ile çapraz direnç göstermez⁹².

2.13.7.3. Entecavir İlaç Direnci Mutasyonları

ETV hem viral replikasyonun uzama aşamasını hem de olgunlaşma aşamasını inhibe eden siklopentan guanozin analogudur. ETV in vitro koşullarda HBV’a karşı LAM ve ADV’dan 100 kat daha etkilidir. ETV’e direnç naif hastaların tedavisinde nadir olarak belirtilmiştir. ETV ile monotedaviden 5 yıl sonra naif HBeAg negatif

hastalarda %1.2 gibi düşük direnç oranı gözlenmiştir. ETV ile ilişkili mutasyonlu HBV mutantları in vivo ve in vitro koşullarda ADV ve TDF'e duyarlıdır⁷⁷.

ETV'e primer direnç ile ilişkili mutasyonlar karmaşıktır ve tam anlaşılmamıştır. ETV direncinin ortaya çıkması ile ilişkili viral polimerazdaki mutasyonlar B bölgesinde (rtI169T, rtL180M, rtS184G) C bölgesinde (rtM204V/I, rtS202I) ve E bölgesinde (rtM204V/I) gösterilmiştir (Şekil 8). rtM204V/I ilişkili LAM mutasyonları ile diğer mutasyonlar sıklıkla ETV direnci görülen hastalarda belirlenmektedir. Hücre kültüründe ilaç duyarlılık deneylerinde de in vitro koşullarda LAM direnci varlığında ETV direncinin birkaç yüz kat artışa neden olduğu gösterilmiştir. ETV direnci ADV ve TDF'e çapraz direnç göstermez^{85,93}.

2.13.7.4. Adefovir İlaç Direnci Mutasyonları

ADV doğal substrat olan dATP'nin yapısal benzerliğine sahip olan bir asiklik nükleotid fosfatdır. ADV, bağlanmayı kolaylaştıran küçük ve elastik bağdan dolayı HBV DNA replikasyonun baskılanmasında yüksek etki gücüne sahiptir. Antiviral direncin ortaya çıkma oranı LAM tedavisi ile karşılaştırıldığında ADV tedavisi sırasında daha düşüktür. HBeAg negatif KHB'li hastalarda ADV ile tedavinin 2 yılından sonra hastaların yaklaşık %2'sinde, tedavinin 5 yılından sonra ise %30'unda ilaç direnci görülmüştür. Fakat son çalışmalarda LAM dirençli hastalarda sıklıkla ADV direnci için ilk yıl %18 insidans oranı bildirilmiştir.

HBV polimerazın B bölgesindeki 181. kodondaki rtA181T/V mutasyonu valin veya treonin'in alanin ile ve D bölgesindeki 236. kodondaki rtN236T mutasyonu asparjin'in treonin ile yer değiştirmesi genellikle primer ADV ilaç direnci mutasyonu olarak kabul edilir (Şekil 8). Bu mutasyonların ADV'e duyarlılığı 5 ile 10 kat azalttığı belirtilmiştir. Bu yüzden, bu tek nükleotid değişiklikleri ADV'in klinik başarısızlığa sebep olduğunun göstergesidir. Son zamanlarda primer mutasyon rtI233V tanımlanmıştır. Ancak ADV'e duyarlı olan bu mutant tartışmalı bir şekilde kalmıştır. İlaç duyarlılık deneylerde rtN236T mutasyonunun LAM, TEL ve ETV'e duyarlılığı

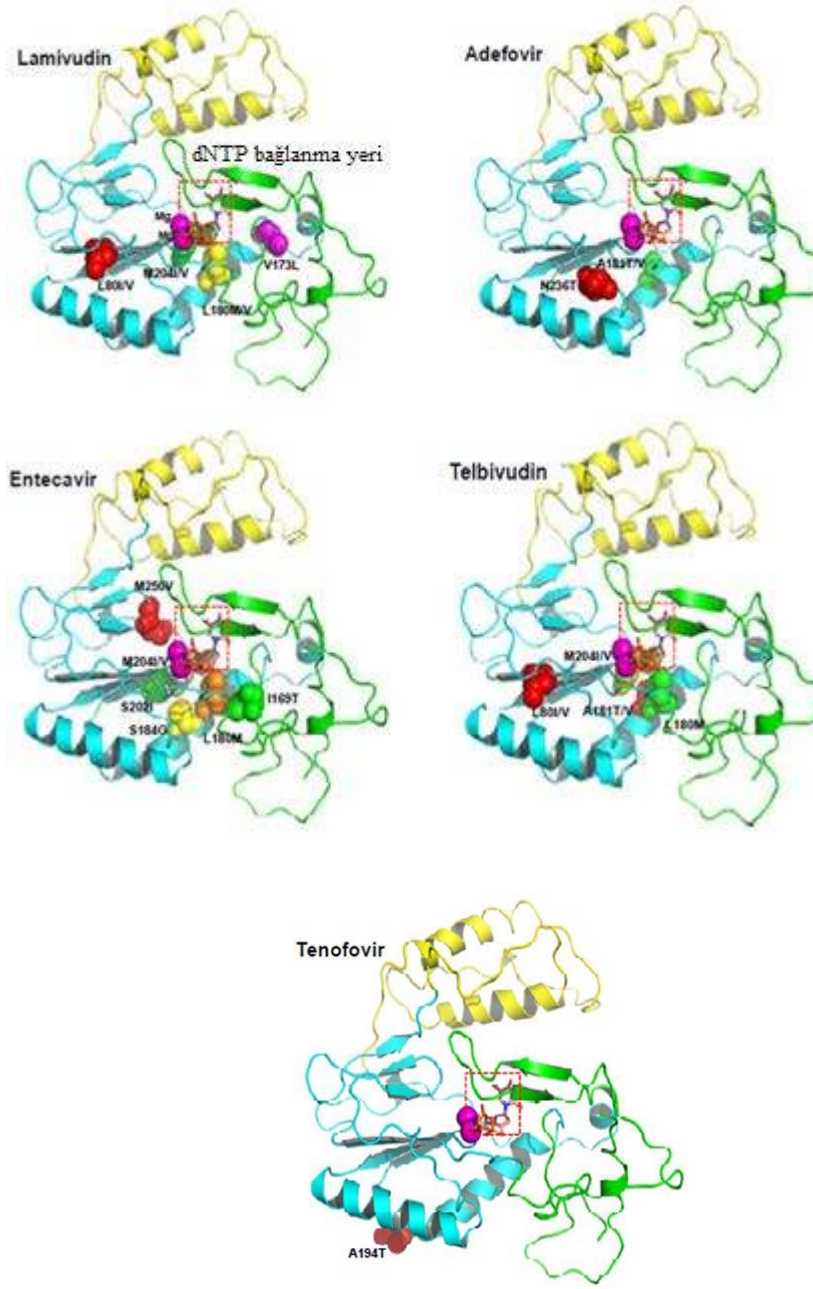
etkilemediği, ancak rtA181T mutasyonunun LAM (<10 kat), ADV (2-8 kat) ve TDF (2-3 kat) duyarlılığı azalttığı gösterilmiştir.

ADV başarısızlığını kapsayan diğer revers transkriptaz değişiklikleri rtP273H, rtN238T/D, rtL80V/I, rtV84M ve rtV214A mutasyonlarını içerir. Bu mutasyonlar ya tek başına ya da rtN236T ve rtA181V/T ile kombinasyonda bulunabilir ve klinik önemi yönünden sekonder mutasyonlar olarak düşünülür^{5,81,84}.

2.13.7.5. Tenofovir İlaç Direnci Mutasyonları

Tenofovir, ADV ile benzer özellik gösteren asiklik nükleotid analogudur. TDF HBV'a karşı güçlü aktivitesinden dolayı son yıllarda KHB tedavisinde kullanılmıştır. TDF ile tedavi sırasında virolojik kırılma veya klinik kötüleşme son zamanlarda bildirilmemiştir.

TDF tedavisine direnç olarak gösterilen rtL180M+rtM204V ile birlikte rtA194T yerdeğişimi HIV/HBV koenfektif hastalarda bulunmuştur (Şekil 8). rtM204V+rtL180M mutasyonlarına bakılmaksızın rtA194T mutasyonu in vitro çalışmalarda, LAM mutantların varlığında TDF ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Eğer bu mutasyon varlığında HBeAg negatif hastalarda oluşan prekor veya bazal kor promoter değişimi meydana gelir ise rtA194T mutantının viral replikasyonunu wild tipdeki seviyelere onarabilir. TDF'e fenotipik dirençle ilişkili revers transkriptazda herhangi bir genotipik değişim 48 haftalık tedavi sırasında tespit edilmemiştir. TDF'in antiviral aktivitesi üzerine yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda LAM ve ADV'e dirençli mutantların TDF'e duyarlı olduğu gösterilmiştir^{8,77}.



Şekil 8. HBV revers transkriptazda HBV ilaç direnci mutasyonlarının yerleşimi

2.13.8. İlaç Dirençli HBV ile Enfekte Hastaların Tedavisi

Antiviral direnç taşıyan HBV'una karşı tedavi önerileri HBV tedavisi ile elde edilen tarihsel bilgilere göre şekillenmektedir, aynı zamanda bu süreçte virolojik cevap, virolojik kırılma sırasında elde edilen mutasyon modeli ve HBV'una karşı NA'ların in

vitro antiviral aktivitesi de önemlidir. Son veriler virolojik kırılma başladığında geciktirmeden kurtarıcı tedavinin uygulanmasının, viral yükün tekrar yükselmesi ve biyokimyasal kırılmaya kadar tedavinin geciktirilmesinden daha fazla yarar sağladığını ortaya koymaktadır⁸⁷.

LAM, TEL ve diğer L-nükleozid direnci ile ilgili in vitro çalışmalar ADV, TDF ve ETV'in, LAM veya diğer L-nükleozid analoglarına dirençli olan HBV mutantlarına karşı antiviral aktiviteye sahip olduklarını ortaya koymuştur. LAM dirençli HBV ile enfekte hastalarda yapılan bir pilot çalışmada, ADV monoterapisinin uygulanan kombinasyon tedavisi kadar (LAM ve ADV) serumda viral yükü düşürdüğü tespit edilmiştir. Buna karşın, ADV ve LAM kombinasyon tedavisi ADV direncinin engellenmesinde, TDF'in ise LAM dirençli HBV'un baskılanmasında oldukça yarar sağladığı görülmüştür^{87,94}.

Her ne kadar TDF ADV'e nazaran daha yüksek etki gücüne sahip olsa da, LAM ile kombine kullanılması ilaç direncinden koruma sağlamaktadır. Önceden var olan LAM direnci ETV direnç riskini de artırmaktadır, dolayısıyla LAM dirençli HBV taşıyan hastalarda ETV kullanımı optimal tedavi değildir. Şayet ETV kullanılıyor ise LAM tedavisi kesilmelidir.

ADV ile ilgili in vitro çalışmalarda ADV dirençli HBV mutantlarına karşı LAM ve ETV'in antiviral aktivite taşıdığı tespit edilmiştir. ADV dirençli HBV mutanları taşıyan hastalarda LAM'in serum HBV DNA'sını baskılamada verimli olduğu vaka raporları ile doğrulanmıştır. Buna karşın, cevabın süresi özellikle önceden LAM direnci taşıyan hastalarda bilinmemektedir. Daha da fazlası, hastada LAM tekrar devreye sokulursa LAM dirençli mutasyonların ortaya çıkışı gözlenlenmektedir. ADV'e karşı primer cevapsızlık taşıyan hastalarda TDF'e geçildiğinde viral baskılanmanın olduğu vaka raporlarında bildirilmiştir, buna sebep olarak ise klinik tedavide TDF'in yüksek dozda kullanılması gösterilmektedir. Aynı sebepten dolayı, TDF ve ADV dirençli HBV taşıyan hastalarda viral baskılanmada aynı sonucu vermektedir.

ETV ile ilgili in vitro çalışmalar ETV dirençli HBV mutantlarına karşı TDF ve ADV'in antiviral aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur, fakat ETV dirençli HBV'una karşı bu tip bir tedavinin verimine yönelik klinik veri henüz mevcut değildir.

Çoklu ilaç direnci taşıyan HBV'una karşı en verimli tedavi modeli aşırı NA kullanımından kaçınmaktır ve aynı zamanda ardışık NA monotedavilerden kaçınmak da faydalıdır. Dolayısıyla, minimal düzeyde hastalığı olanlar ve kalıcı cevabın oluşmayacağı vakalarda NA tedavisi kullanılmamalıdır, özellikle genç bireyler söz konusu ise süreç en düşük genotipik dirence sahip olanda en yüksek etkiye sahip NA'un kullanılması şeklinde idame ettirilmelidir. Cevap çok kısa zaman aralıklarıyla gözlemlenmeli ve primer cevapsızlık söz konusu ise tedavi modifikasyonu gerçekleştirilmelidir. Yapılan de novo çalışmalarda LAM ile birlikte PEG-IFN kullanımının LAM monotedavisine nazaran virolojik kırılmayı daha fazla baskıladığı ortaya konulmuştur, fakat direnç gelişimini tamamen engelleyemez^{74,76,87,95}.

2.13.9. Antiviral İlaç Direncinin Önlenmesi

İlaça dirençli HBV mutantların yayılması gereksiz ilaç kullanımından kaçınarak, uygun kombinasyonlu ilaç seçerek ve sürekli olarak ilaç direnci için takip edilerek azaltılabilir. HBV'da oluşan gereksiz replikasyon stratejisinden dolayı viral popülasyonlar genetik bir şekilde heterojendir. Bu yüzden naif hastalar antiviral ilaç kullanımından sonra selektif baskının yokluğunda popülasyonun sadece az bir kısmını oluşturan ilaç direnci mutantlarına sahiptir. Hastaların büyük çoğunluğunda antiviral tedavi gerekmebilir. Birçok profesyonel kuruluş klinisyenlerin KHB'yi tanınması, önlemesi ve yönetimini değerlendirmesi için güncellenmiş öneriler yayınlamaktadır. Tedavi başladığı zaman, tedavi algoritmaları hastaların tedavisini belirlemede yardımcı olmak için geliştirilmiştir. Çünkü replikasyon aracılığıyla ilaç dirençli HBV popülasyonları oluşur ve yayılır. İlaç direnci başladığında, antiviral tedavi ile mümkün olduğunca hızlı bir şekilde viral replikasyonun baskılanması hedeflenmelidir. TDF ve ETV'e direncin düşük riski özellikle hepatit veya sirozlu olanlarda ve karaciğer nakli olan hastalarda birinci basamak tedavi olarak kullanımını sağlamaktadır. Çünkü bu gruplarda gelişen ilaç direncinin klinik kötüleşmeyi başlatması daha muhtemeldir.

KHB tedavi etmede kemotedavinin kombinasyonu daha sıklıkla kullanılmaktadır. Uygun kombinasyon kullanıldığında daha etkilidir ve ilaç direnci

riskini azaltabilir. Tedavi başlamadan önce hastalarda tekli ilaç direnci HBV mutantları oluşması ve gelişmesine rağmen çoklu ilaç direnci HBV mutantları tedavi öncesinde çok az bir şekilde oluşabilir. İdeal olarak, kombinasyonlu ilaçlar kullanıldığında farklı bir mekanizma olmasından dolayı bu ilaçlar sinerjik etkiye sahiptir.

NA'ları ile kombinasyon tedavisi çapraz direncinin gelişmesini engellemektedir. Ancak tek ilaçlı tedavi ile karşılaştırıldığında antiviral etki artmamaktadır. NA ile kombinasyonda kullanılan interferonlar muhtemelen ileriki adımdır. Böyle kombinasyonların ilk klinik denemeleri hayal kırıklığı olmasına rağmen sonraki denemeler daha ümit verici olmuştur. Ancak tedavinin kesilmesinden sonra kombinasyonun faydası kaybolma eğilimindedir.

L nükleozidlerin kombinasyonu, tek L nükleozid tedavisinden daha etkili olup, antagonistik etkiye sahip olabilir. Çünkü L nükleozidlerin kombinasyonu hücresel aktivasyon mekanizması ve viral hedef için yarışmaktadır. LAM ve ADV'e HBV mutantların çapraz direncinin olmaması in vitro koşullarda gözlenmiştir (rtA181T/V) ve bazı klinik çalışmalarda bu ilaçların kombinasyonda daha etkili olduğu gösterilmiştir. Daha önceki bilgilerde ADV ve TDF ile kombinasyonda ETV'in kullanımı desteklenmiştir. Ancak bazı tavsiyeler için sonraki klinik denemelere ihtiyaç vardır.

Antiviral tedaviye hastanın cevabı dikkatli bir şekilde izlenmelidir. Böylece ilaç direnci, virolojik kırılma ve hastalığın ilerlemesinden önce erken dönemde belirlenebilir. HBV DNA ve ALT serum seviyelerinin ölçülmesi tedavinin başlamasından 3-6 ay sonra yapılmalıdır. Tedavinin ilk 2 yılında 6 ay aralıklarla yapılan ölçümler hafif karaciğer hastalığı olan bireylerde tavsiye edilmektedir. Tedavinin ilk 2 yılından sonra hastalar her 3 ayda bir viral yük ve ALT seviyelerine baktırılmalıdır. Bu, gelişen direnç için olası süredir. Direncin klinik sonuçları hızlı bir şekilde ortaya çıkar ve hastalarda yaşam tehdidi oluşturabilir. Viral yük $1\log_{10}$ IU/mL arttığı zaman direnç mutasyonunu tespit ve sonraki tedavi yaklaşımını belirlemek için HBV polimeraz bölgesinin dizi analizi yapılmalıdır^{66,68,74,95}.

2.14. Tanı

HBV enfeksiyonun tanısı ve doğal seyrinin belirlenmesi primer olarak serolojik, biyokimyasal parametreler ve viral nükleik asitin gösterildiği moleküler yöntemlerle yapılmaktadır. Serolojik parametreler; HBsAg, HBeAg ve konağın immun yanıt olarak geliştirdiği spesifik antikorlar; anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc IgG ve IgM'dir.

HBV'un kesin tanısı serumda HBsAg'in saptanmasıyla konmaktadır. Biyokimyasal tanı kriterleri olarak özellikle serum transaminazları olmak üzere karaciğer enzim değerleri incelenir. HBV DNA'nın tespiti ve kantifikasyonunun yapıldığı moleküler yöntemler ise tedavi ve hastalık seyrinin değerlendirilmesinde kilit rol oynamaktadır. Ayrıca diğer belirleyici bulguların yetersiz kaldığı (gizli HBV enfeksiyonu) özel durumlarda asıl tanı koyucu görevi üstlenmektedir.

2.14.1. Serolojik Tanı

HBV ile enfeksiyon oluşumu sırasında konakta virusa ait çeşitli antijenlere (HBsAg, HBcAg ve HBeAg) karşı antikorlar meydana gelmektedir. HBV enfeksiyonlarının özgül tanısını yapmak amacıyla hasta serumunda bu antijenlerin ve antikorların varlığı araştırılmaktadır. Bunların saptanması için günümüzde duyarlılığı, özgüllüğü ve verimliliği yüksek serolojik yöntemlerden faydalanılmaktadır. Bu amaçla önceleri radioimmunoassay test kullanılırken bu yöntem yerini ELISA testlerine bırakmışlardır. Bu testlerden, akut ve kronik enfeksiyon ayrımında, enfektivitenin değerlendirilmesinde, bağışıklık durumunun tayininde, kan ve organ vericilerinin taranmasında yararlanılmaktadır⁹⁶.

HBsAg, akut HBV enfeksiyonu sırasında virusa ait saptanan ilk antijendir. HBsAg HBV ile maruz kaldıktan sonra 1-10 haftada ve semptomlar veya aminotransferaz seviyeleri yükselmeden önce serumda ortaya çıkar. İyileşen hastalarda, HBsAg genellikle 4-6 aydan sonra belirlenemez hale gelir. Akut hepatit B'de çok nadir bir şekilde HBsAg beklenen zamanında belirlenmeyebilir, çünkü HBsAg'in tespit seviyesine ya ulaşılmamıştır ya da HBsAg düzeyi testin belirlenebilir eşiğinin altına

düşmüştür. HBsAg'in varlığı 6 aydan fazla sürede devam ederse kronik enfeksiyonu ifade eder. HBsAg'in yokluğu ise anti-HBs'nin varlığı ile takip edilir. Anti-HBs hepatit B'nin iyileştiğini işaret eder. Birçok hastada anti-HBs yaşam boyu sürmekte ve böylece uzun süreli immunité görülmektedir. Anti-HBs antikorı akut HBV enfeksiyonunun erken fazı sırasında üretilmesine rağmen rutin test ile belirlenmez. Çünkü HBsAg fazla miktarda mevcuttur ve anti-HBs ile birleşir. Bu yüzden anti-HBs antikorı akut fazda HBsAg seviyesi düştüğü zaman belirlenir. HBsAg'in ortadan kaybolduğu ve henüz anti-HBs antikorlarının ortaya çıkmadığı döneme "pencere dönemi" ismi verilmektedir. Bu dönemde hem HBsAg hem de anti-HBs antikorı negatif olarak bulunmaktadır. HBsAg ve anti-HBs'nin bir arada bulunması HBsAg pozitif bireylerin yaklaşık %10-25'inde bildirilmiştir. Bu durum kronik hepatit B'li hastalarda yaygın bir şekilde görülmektedir. HBsAg ve anti-HBs'nin birlikte bulunması S genlerindeki mutasyonlardan dolayı immün sistemden kaçan mutantların seçimine bağlı olabilir⁹⁷.

HBcAg enfekte hepatositlerde ifade edilen intrasellüler antijen olup serolojik tanıda kor bölgesi ile ilgili kullanılabilecek gösterge anti-HBc antikorlarıdır. Anti-HBc, HBsAg saptandıktan kısa süre sonra ve anti-HBs ortaya çıkmadan önce görülmektedir. Akut HBV enfeksiyonu sırasında belirlenen ilk antikor anti-HBc IgM'dir. Anti-HBc IgM antikorı genellikle HBsAg'in ortaya çıkmasından 1 ay sonra ve aminotransferaz seviyesi yükselmeden yaklaşık 1-2 hafta önce ortaya çıkar. Anti-HBc IgM pencere dönemi sırasında HBV enfeksiyonunun tek göstergesidir. İyileşme döneminde, anti-HBc IgG titresi artarken, anti-HBc IgM titresi azalır. Bu yüzden IgM belirlenmesi genellikle akut HBV enfeksiyonun göstergesi olarak kabul edilir. Ancak hastaların %20'sinde anti-HBc IgM akut enfeksiyondan sonra 2 yıla kadar belirlenmeyi sürdürür. Ayrıca anti-HBc IgM alevlenme sırasında kronik HBV enfeksiyonlu hastalarda tespit edilebilir. Bu durum kronik hepatit B enfeksiyonu olduğu bilinmeyen hastalarda akut HBV enfeksiyonu olarak yanlış tanı konulmasına neden olabilir.

Aktif viral replikasyonun ve enfektivitenin göstergesi olan HBeAg, HBsAg'den önce ortadan kaybolmaktadır. HBeAg'in ortadan kalkmasından (genellikle 12-14 haftada ortadan kaybolur) kısa bir süre sonra anti-HBe antikorları ortaya çıkmaktadır. Anti-HBe antikorlarının ortaya çıkması viral replikasyonun azaldığını ve hastalığın iyileşmeye doğru gittiğini göstermektedir. Ancak prekor bölgesinde mutasyon sonucu

oluşan mutant suşların meydana getirdiği enfeksiyonda anti-HBe pozitif olmasına rağmen aktif viral replikasyon ve enfeksiyon tablosu devam etmektedir^{14,98}.

2.14.2. Moleküler Tanı

HBV tanısında 1980'li yıllardan itibaren serolojik tanı yöntemlerinin yanı sıra moleküler tanı yöntemlerinin de kullanımı gündeme gelmiş ve HBV tanısı için çeşitli yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemleri iki grupta toplamak mümkündür. Bunlar; hibridizasyon temelli testler ve PCR temelli hedef nükleik asit amplifikasyon testleridir.

Hibridizasyon temelli testler, hedef nükleik aside spesifik probların viral DNA'ya bağlanması ile bir dizi hibridizasyon sonucu olabildiğince yüksek sinyalin eldesi esasına dayanır. Ancak bu yöntemler ile 10^5 virus partikülü/mL belirlenebilmekte, örnekte daha az sayıda DNA varlığında yöntem yetersiz kalmaktadır. Bu sıkıntıları aşmak için, PCR gibi ortamdaki nükleik asit miktarını saptanabilir düzeye kadar çoğaltacak yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerle önceleri örnekte viral genomun varlığı kalitatif yönden araştırılmakta iken geliştirilen tekniklerle bunun yanı sıra kantitatif olarak genomun örnekteki miktarı da saptanmaya başlanmıştır. Günümüzde kronik hepatitlerin tanısında real-time PCR kullanılmaktadır.

Real-time (gerçek zamanlı) PCR, floresan işaretli özgün probların kullanılarak floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle de hem kalitatif hem de kantitatif sonuçlar elde edilir^{94,99}.

2.14.3. HBV İlaç Direnç Testleri

HBV ilaç direncinin tespiti için birçok teknik vardır. Bu yöntemler genotipik, fenotipik ve indirekt yöntemler şeklinde gruplandırılabilir. Bu yöntemler duyarlılık, uygulanabilirliği, maliyetleri ve sonuçların yorumlanabilirliği açısından farklılık göstermektedir.

2.14.3.1. Genotipik Metodlar

PCR ürünlerinin direkt sekanslaması da dahil olmak üzere direnç mutasyonlarını belirlemek için PCR amplifikasyonu sonrası ampliconlardan derive olan multiple klonların sekans analizi, spesifik prob içerikli allel spesifik PCR formatlı real-time PCR, LiPA (Line probe assay) benzeri hibridizasyon teknikleri, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), son olarak yeni geliştirilen MALDI-TOF MS/ RFMP (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) gibi bir çok test mevcuttur¹⁰⁰.

Direkt PCR sekanslama, en az sensitiviteye sahip testlerden birisidir, çünkü direnç mutasyonunun belirlenebilmesi için HBV havuzunda mutantların oranı %20'ye ulaşmalıdır, bu seviyeye ulaşırsa direkt PCR sekanslama yöntemi ile direnç mutasyonu gözlemlenebilir. Geniş çaplı taramalarda direkt PCR sekanslama kullanışa elverişli değildir. Bununla birlikte, direkt PCR sekanslaması, var olan tüm mutasyonları tanımlayabilmektedir ki buna potansiyel yarışmacı mutasyonlar ve yeni tanımlanmamış mutasyonlar da dahildir. Ayrıca tedavide ortaya çıkan direnç ve buna bağlı yeni mutasyonların tanımlanmasında kullanılabilir ve in vitro şartlarda fenotipik doğrulama gerekmektedir⁸⁷.

RFLP analizleri ile total viral popülasyonda oranı %5 kadar düşük olan mutasyonlar bile belirlenebilmektedir. Bununla birlikte, ilgilenilen her bir mutant için endonükleaz reaksiyonu spesifik olarak dizayn edilmelidir. Bazı mutasyonlar yeni restriksiyon bölgesinin ortaya çıkmasına sebep olur ve RFLP bu yüzden kolay metoddur. Bazı diğer mutasyonlar ise restriksiyon bölgesini yok eder, bu durumda RFLP analizi dikkatli kullanılmalıdır, zira restriksiyon bölgesinin kaybindan dolayı

enzim sindiriminde problem ortaya çıkabilmektedir. RFLP analizi tüm mutasyonlar için uygulama zeminine sahip değildir.

Revers hibridizasyon ile teste dayalı LiPA için ticari test olan reverse hybridization Assay (Innogenetics, Belgium)'dir. Bu test hatalı tek nükleotid eşleşmelerini belirleyebilmektedir ve membrana bağlı kısa oligonükleotid problemleri mevcuttur. Total viral popülasyonda direnç mutasyonu %5'in üzerinde ise LiPA belirleyebilmektedir. En büyük sıkıntı her bir mutant için spesifik problemlerin yeni setine ihtiyaç duyulması ve tek bir nükleotid değişiminin tespiti için oldukça fazla sayıda probun gerekliliğidir.

Yeni mutantların belirlenmesinde oligonükleotid mikroçip prensibine dayalı mikroçip bazlı sekanslama teknolojileri kullanılabilmektedir. Bu teknoloji oldukça pahalı ve geniş çapta kullanıma müsait değildir.

MALDI TOF/MS, varyasyon bölgelerini içeren küçük DNA fragmanlarının kütle spektrofotometrik analizi temeline dayanmaktadır. Çok sensitif olduğu kanıtlanmıştır ve viral popülasyonunun %1'inde baskın olan mutasyonlar bile belirlenebilmektedir. Buna karşın, her biri yeni mutasyonu belirlemek için yeni primer setine ihtiyaç söz konusudur ve aynı zamanda kütle spektrofotometresi gerekmektedir.

Tek genom sekanslama, antiviral dirençli HIV mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntem oldukça yorucudur ve mutasyonların kesin frekansı hakkında bilgi vermektedir. HBV replikasyonu süresince kendiliğinden mutasyonların kazanılma oranı çok yüksektir, viral popülasyonda %0.1'in altında olan mutasyonların klinik önemi kesin değildir. Hepatit B tedavisinde kabul edilen 5 NA mevcuttur ve birçoğu geliştirilme aşamasındadır, dizayn edilen testler bu NA'larına karşı gelişen tüm mutasyonları belirlemektedir, fakat bu gittikçe zorlaşmaktadır. Yukarıda bahsedilen testler araştırma amaçlı kullanılmaktadır, fakat klinik pratikte en çok kullanılan testler direkt sekanslama ve LiPA tekniğidir⁸⁷.

HBV izolatlarının genetik analizi zahmetli ve pahalı olan Sanger dizi analizine dayalı testler ile yapılmaktadır. Bu durum ultradeep dizi analizi platformlarının "next generation"nın geliştirilmesi ile yeni bir dönemi başlatmıştır. Ultradeep dizi analizi

karışık virus popülasyonun bulunduğu örnekte direkt dizi analizine izin vererek klonal Sanger dizi analizinin temel eksikliklerini ortadan kaldırır^{29,87,101}.

Ultradeep dizi analizinin birçok yönleri birbirine benzememesine rağmen tümünde DNA hazırlanmasının aşamaları, çoğaltma ve sentez ile ardından dizi analizi kullanılmaktadır. Sentez ile dizi analizi komplementer ipliğin sentezi ile tek DNA ipliğinin dizi analizini, her bir adımda bir baz, ve eklenen her nükleotidin tespitini içerir. DNA zincirine her bir nükleotidin eklenmesiyle floresan (Illumina) veya ışıma (pyrosequencing; Roche ve PyroMark, Qiagen) açığa çıkar. Bu testler eş zamanlı güvenilir dizi analizinin belirlenmesini ve viral mutasyonlarının araştırmaları için kullanılan kesin bilgileri sağlar^{102,103}.

Pyrosequencing'in temel amacı DNA sentezi sırasında salınan pirofosfatın luminesans deneyi ile tespitine dayanır. PCR reaksiyonundaki forward primerler biyotinli olup sentezlenen biyotinli amplifikasyon ürünleri streptavidin ile kaplı sefaroz boncuklara bağlanarak tek sarmallı DNA ayrıştırılır. Tek iplikli DNA zincirine nükleotidlerin DNA polimeraz ile bağlanması sonucu pirofosfat açığa çıkar. Daha sonra salınan pirofosfat, ATP-sülfürlaz ile adenosin 5' fosfasülfat varlığında ATP'ye (Adenosin Trifosfat) çevrilir. Işık, pyrogramda pik olarak belirlenir. Lusiferaz ATP varlığında lusiferini okside edip ışık oluşturması için enerji verir. Reaksiyona girmeyen nükleozid trifosfatlar ise apiraz enzimi ile önce nükleozid difosfata sonra da nükleozid monofosfata dönüştürülür. Ayrıca reaksiyona girmeyen ATP yine apiraz ile adenosin difosfat ve adenosin monofosfata çevrilir.

Ultradeep dizi analiz metdodu olan 454 pyrosequencing (Roche Dignostics), diğer ultradeep dizi analizi metodları ile karşılaştırıldığında nispeten yüksek maliyet ve çalışma süresine rağmen 700 bp kadar uzunluktaki ampikonların dizi analizi için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve emülsiyon PCR ile tek sarmallı DNA'nın çoğaltmasına dayanır. Emülsiyon PCR, tek sarmallı DNA zincirlerini yağ içindeki su damlacıklarını mikroreaktör gibi kullanarak çoğaltır. Her bir su damlacığı tek DNA kalıp zincirinin amplifikasyonu için tüm gerekli reagentleri içerir. Dizi analizinden önce her bir mikroreaktör (klonal çoğaltılmış DNA) cam bir lam üzerindeki ayrı kuyucuklara konulur ve sonra dizi analizi için enzimler eklenir. Uzayan DNA zincirine her bir nükleotid eklendiğinde ışıma oluşturmak için pyrosequencing reaksiyonu kullanılır. Bu

yaklaşımın %2'den düşük tek nokta mutasyonlarının tespiti için birçok raporda son derece duyarlı olduğu bildirilmiştir^{29,104,105}.

Illumina pyrosequencing (Illumina/Solexa) testte, klonal amplifikasyon ve dizi analizi için solid faz “flow cell” kullanılarak ultradeep dizi analizi platformu geliştirmiştir. PCR ampliconları milyonlarca primer ile kaplanmış cam lamda komplementer diziye hibridize olan universal adaptöre bağlanır. Klonal amplifikasyon, hibridize DNA'nın denatürasyonu ve bağlanmış adaptör/primer dizisinin 3'ucundan uzamayla komplementer DNA ipliğinin sentezi ile gerçekleşir. Sonra yeni sentez edilen dizinin 3'ucuna yakın komplementer, yüzeye bağlı primer, bir köprü ve sonraki PCR siklusunda DNA sentezi için yeni yeri oluşturur. Son olarak dizi analizi floresan ile işaretli reversible terminatörler kullanılarak yapılır ki sensitivitesi 454 pyrosequencing testinkine yakındır. Bu sistemin maliyeti diğer ultradeep platformlara göre azdır ve 500 baz kadar uzunluktaki ürünler değerlendirilebilir^{29,103}.

PyroMark sequencing (Qiagen), 454 pyrosequencing ve illumina dizi analizi platformları yeni dizi analizi metodları olarak uygun olmasına rağmen PyroMark önceden bilinen mutasyonların varlığının tespiti için hızlı sürede sonuç vermesiyle idealdir. Bu platformda, ilk önce biyotinli revers transkriptaz kullanılarak PCR testi yapılır. Ardından çift sarmallı DNA PCR ürünleri streptavidin ile kaplı sefaroz boncuklara bağlanır. Denatürasyonu takiben revers sarmala komplementer olan dizi analizi primerinin hibridizasyonu gerçekleşir ve bunu primerin 3'ucuna nükleotidlerin hemen bağlanması ile pyrosequencing izler. Bu methodda pyroMark sequencing doğru dizi analizi verileri sağlar ve her örnekte 20 baz kadar uzunluktaki spesifik mutantları yaklaşık 40 dakikada tespit eder^{29,106}.

2.14.3.2. Fenotipik Metodlar

Antiviral duyarlılık testleri polimeraz aktivitesini veya HBV replikasyonunu belirlemeyi kapsamaktadır. Bu metodlar oldukça zaman tüketici olup teknik düzeyde uzmanlık gerektirmektedir.

Enzimatik tespiti dayalı fenotipleme testlerinden günümüzde, HBV polimeraz aktivitesinin belirlenmesinde baculovirus vektör aracılı böcek hücreleri kullanılmaktadır ve HBV nükleokapsidinden purifiye edilmiş HBV polimeraz ekspresyonu sağlanmaktadır. Hücre kullanmadan tespit ördek hepatit B virusu için geliştirilmiştir, fakat HBV polimeraz geni uzun insersiyon bölgesi içermektedir ki bu ördek hepatit B virus'unda ve diğer hepadnavirus polimeraz genlerinde mevcut değildir ve bu insersiyon fenotipik test sonuçlarının yorumunu etkileyebilir.

Hepatositlerden derive hücre hatlarının geçici transfeksiyonuna dayalı fenotipleme için 2 yaklaşım kullanılmaktadır. İlk yaklaşım iyi karakterize edilmiş laboratuvar rekombinant teknik ile geliştirilmiş HBV replikasyonu tam olan klonların belirli gen bölgelerinde ilaç direnci ile ilişkili nokta mutasyonları oluşturmaktır. Bu yaklaşım spesifik mutasyonların antiviral duyarlılığı azaltıp azaltmadığını tespit etmek yönünden araştırmalar için avantajlı olabilir. İkinci metod ise klinik izolatlarda elde edilen HBV genomunun tamamının amplifiye edilmesine dayanmaktadır. Buna karşın, birçok mutasyon ve/veya klonal varyantlar var olabilir, bu durum revers transkriptaz bölgesindeki tüm değişimlerin birikmesi sonucu olabilir.

Rekombinant baculovirus/HBV'unun hepatositlerden derive hücre dizilerine transdüksiyona dayalı fenotipleme de kullanılmaktadır. Bu sistemde, HBV replikasyonu endojen promoterler tarafından sürdürülür ve bu yüzden çalışmalar fenotipik replikasyon ürünü ile yapılır, ancak bu yöntem oldukça yorucudur.

HBV genomu ile transfekte edilmiş stabil olarak HBV-ekspresyonu yapan hücre dizileri ilaç direncini araştırmak için spesifik olarak dizayn edilmektedir. Fenotip testi için stabil hücre hatları kullanılmasının avantajı çapraz direnç testinin aynı ortamda yapılabilmesidir, fakat her bir yeni mutant için yeni hücre hatlarının oluşturulması gerekmektedir. Hücre kromozomunda integre olan HBV DNA bölgesi HBV replikasyonunu ve hücre fonksiyonu etkileyebilir, bu yüzden bu hücre hatları antiviral direnci kodlayan HBV'un replikasyon etkinliğinin belirlemek için kullanılmayabilir⁸⁷.

2.14.3.3. İndirekt Metodlar

İndirekt metodlar kapsamında, HBV DNA'nın ölçümü (viral yük deneyi) ve bu kantitatif analizin değerlendirilmesi temelinde tedaviye yanıt ve direncin olup olmadığı dolaylı olarak değerlendirilebilir. Bu temelde, ilaç direnç oluşumu ve sonucunda viral yükün artması tedaviye yanıtın durması ile sonuçlanmaktadır. HBV DNA miktarındaki anormal değişiklikler fenotipik direnç oluşumunun başladığına işaret edebilmektedir, ancak bunun spesifik genotipik yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir⁸⁷.

2.15. Korunma ve Kontrol

HBV enfeksiyonun önlenmesi için 3 temel strateji vardır. Bunlar; hastalığın bulaşmasını önlemek için davranış değişiklikleri, pasif immunoprofilaksi ve aktif aşılamadır.

Davranış değişikliği, cinsel davranışlardaki değişiklikler ve kan ürünlerinin gelişmiş ayırma yöntemleri hepatit ile ilişkili bulaşın riskini azaltmaktadır. Davranış değişikliklerinin, yeni doğanlar ve çocukların enfeksiyonu kazanmada en büyük riske sahip olduğu gelişmekte olan ülkelerden daha faydalı olduğu düşünülmektedir. Bu gruplarda hem pasif hemde aktif immunoprofilaksi daha etkili olacaktır⁶⁵.

Pasif immunoprofilaksi, HBIG hepatit B'ye karşı hazır yapılan antikorun steril solüsyonudur. HBIG pasif immunoprofilakside kullanılan ve hepatit B'ye karşı oluşan antikorların yüksek seviyesine sahip seçilmiş donörlerden hazırlanır. Pasif immunoprofilaksi hepatit B ile enfekte annelerin yenidoğan bebeklerinde, iğne batması, cinsel ilişki ve karaciğer transplantasyonundan sonra kullanılır. İmmunoprofilaksi bütün HBsAg pozitif annelerden doğan bebeklere önerilmektedir. Tavsiye edilen doz doğumdan sonra veya rekombinant aşı ile birlikte doğumdan sonra 12 saat içinde 0.13 mL/kg HBIG'dir. Kombinasyon HBV'un perinatal geçişine karşı korumanın %90 seviyelerinden daha yüksek bir oranı ile sonuçlanmaktadır. Çocuklarda immunoprofilaksiye rağmen HBV enfeksiyonlu annelerden HBV enfeksiyonu %3.7 ile %9.9 oranında perinatal yolla bulaşır. Bu gruptaki pasif ve aktif immunoprofilaksi

başarısızlığı HBV'un uterusdaki bulaşı, yüksek inokulum ile ilişkili perinatal bulaş ve yüzey kaçış mutantların varlığı ile meydana gelmektedir¹⁰⁷.

HBIG karaciğer transplantsyonu yapılan HBV enfeksiyonlu hastalarda profilaksinin temel bileşeni olarak kalmaktadır. Yüksek dozda belirlenen HBIG tedavisi hastaların %65 ile %80'inde hastalığın nüksetmesini önleyebilir. Yüksek doz HBIG ile uzun süreli profilaksinin maliyeti oldukça yüksektir ve HBIG ile NA'u kullanılan kombinasyon tedavisi eşit oranda etkilidir. Şimdiki protokol, karaciğer transplantasyondan sonra HBIG ile NA'u kombinasyondur. Bu kombinasyon protokolü virolojik kırılmayı %10 veya daha düşük oranda azaltmaktadır^{65,108}.

Aktif bağışıklanma, aşı ile primer enfeksiyonun önlenmesi, kronik HBV enfeksiyon riskini ve sonraki komplikasyonlarını azaltmak için önemli bir stratejidir. İnaktif plazmadan türetilen ilk hepatit B aşısı 1982 yılında yapılmıştır. Hepatit B aşısının ikinci geliştirilen tipi rekombinant DNA aşısı 1986 yılında genel kullanımda mevcut olmuştur. Her iki aşı HBV enfeksiyonunun önlenmesinde güvenli olup etkili olduğu kanıtlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü; DSÖ (World Health Organization; WHO) 1991 yılında hepatit B aşılmasını, 1995 yılında hepatit B virus taşıyıcısı prevalansının (HBsAg) %8 veya daha fazla olduğu ülkelerde ve 1997 yılında ise bütün ülkelerde yapılması gerektiğini tavsiye etmiştir. Yenidoğanlarda hepatit B aşısı ile aşılama 154 ülkede 2002 Mayıs itibarıyla rutine girmiştir.

HBV enfeksiyonu için dünyanın ilk ulusal aşılama programı 1984 yılında Taiwan'da başlatılmıştır. Aşı, programın ilk 2 yılı sırasında temel olarak HBsAg taşıyıcı annelerden doğan bebeklere uygulanmıştır. Aşılama ilk olarak tüm yenidoğanlarda ve sonra aşılanmamış okul öncesi ve ilköğretim çağındaki çocuklar için yapılmıştır. Yakalama aşıları 1991 yılından bu yana. 1. sınıftaki çocuklara uygulanmaktadır. Bu program ile HBsAg prevalans oranı 15 yaşından küçük çocuklar arasında 1984'de %9.8'den 1994'de %1.3'e azaltılmıştır. Aşılama oranları 1999 yılında küçük çocuklarda %0.7 oranına düşürülmüştür¹⁰⁸.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Kasım 2013 ve Mayıs 2014 tarihleri arasında yapılan bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Gastroenteroloji polikliniğine başvuran, kronik hepatit B enfeksiyonu olan, yaşları 18 ile 77 arasında değişen 52'si kadın 85'i erkek hastadan kan örnekleri alınarak real-time PCR ve pyrosequencing metodu kullanılarak (PyroStar HBV Drug Resistance Test, Altona Diagnostics, Germany) HBV ilaç direnci mutasyonlarının varlığı araştırıldı.

Çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'ndan "Etik Kurul Onayı" alındı. Hastaların demografik verileri, hepatit B virusun serolojik markırları, karaciğer fibroz skoru, önceden tespit edilen hepatit B ilaç direnci ve kullandıkları antiviral ilaçlar gibi veriler bilgi formlarına dolduruldu.

Hastalardan yaklaşık 10 mL kadar kan örneği alındı. Serum kısmının ayrılması için kan örnekleri 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılıp hepatit B viral DNA'sının ekstraksiyon işlemine kadar -80°C'de saklandı.

3.1. Viral DNA Ekstraksiyonu

Serum örneklerinden viral DNA eldesi için yapılan ekstraksiyon işleminde EZ1 virus mini kit v2 (Qiagen, Germany) kullanıldı. DNA ekstraksiyonu üretici firmanın önerilerine göre aşağıdaki gibi yapıldı.

Hasta serum örneklerden viral DNA ekstraksiyonu için otomotize nükleik asit izolasyon cihazı olan EZ1 Advanced (Qiagen) kullanıldı.

1. Cihazın çalışma bloğunun A1 sırasına 1.5 mL'lik boş elüsyon tüpleri numaralandırılarak yerleştirildi. İşlem sonunda DNA ekstraktları bu tüplerde toplandı (Şekil 9).
2. Pipet tutucuları içine pipet uçları yerleştirilerek A2 sırasına konuldu (Şekil 9).

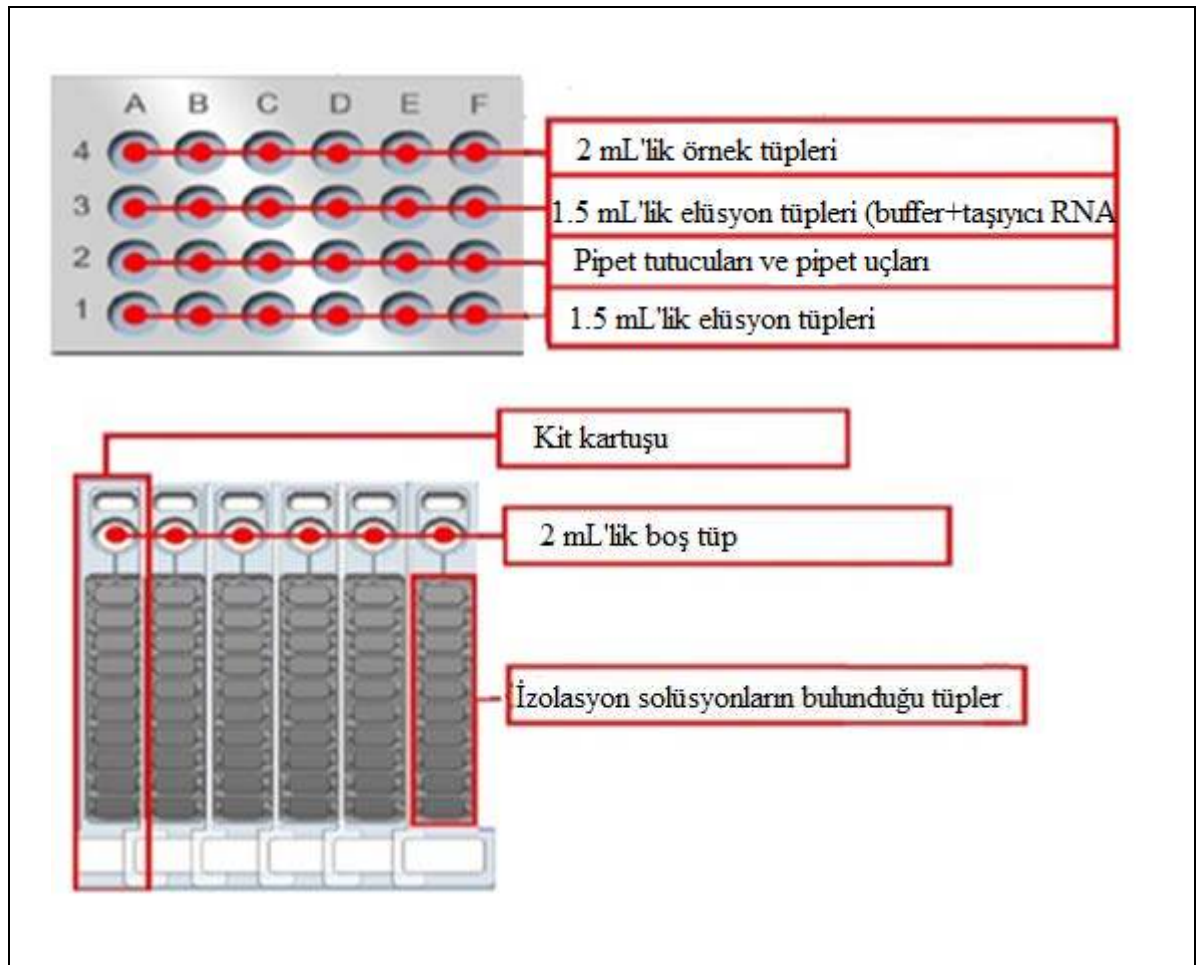
3. Çalışma bloğunun A3 sırasında bulunan her bir 1.5 mL'lik elüsyon tüplerine 4 µL taşıyıcı (carrier) RNA ve 56 µL elution buffer eklendi.

4. A4 sırasına yerleştirilen 2 mL'lik tüplere ise 400 µL serum örnekleri eklendi.

Kartuş bloğuna her bir örnek için bir DNA izolasyon kartuşu, bloğun üzerindeki ok yönünde yerleştirildi (Şekil 9). Kartuşun üstündeki boş kuyularına 2 mL'lik boş tüpler konuldu. Hazırlanan kartuş ve çalışma bloğu cihaza uygun bir şekilde yerleştirilerek cihaz çalıştırıldı.

Yaklaşık 45 dakika sonra DNA ekstraktları elde edildi ve ardından ultraviyole ışığı 20 dakika süreyle çalıştırılarak dekontaminasyon sağlandı.

DNA ekstraktları real-time PCR işleminde kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.



Şekil 9. Örneklerin izolasyon cihazına yerleştirilmesi

3.2. PyroStar HBV İlaç Direnç Testi

PyroStar HBV İlaç Direnç Testi (PyroStar HBV Drug Resistance Test, Altona Diagnostics, Germany), HBV real-time PCR test ve pyrosequencing olmak üzere 2 aşamadan oluşmaktadır. HBV real-time PCR testi, HBV polimeraz geninin 169, 173, 180, 181, 184 ve 194 kodonlarındaki mutasyonların tespiti için bir real-time PCR (PCR-1) ve 202, 204, 236 ve 250 kodonlarındaki mutasyonların tespiti için ikinci bir real-time PCR (PCR-2) testi içerir. Daha sonra HBV ilaç direnci mutasyonlarının tespiti için 2 ayrı PCR testine ait pozitif bulunan ürünlerin spesifik primerler kullanılarak pyrosequencing metodu ile dizi analizi yapılır.

3.2.1. HBV Real-Time PCR Testi

Real-time PCR ana reaksiyon karışımları, kontaminasyonun engellenmesi için ekstraksiyon işleminin yapıldığı ayrı bir kabinde hazırlandı. PCR reaksiyonunda ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirilmesi için, ince duvarlı DNase ve RNase enzimlerinden arındırılmış steril 0.2 µL'lik PCR tüpleri (Qiagen, thin-walled PCR tüpleri) kullanıldı. Real-time PCR cihazı olarak Rotor-Gene Q 5plex real-time-PCR (Qiagen) kullanıldı.

HBV spesifik DNA'nın amplifikasyonu:

1. Real-time PCR kiti buzdolabından çıkarıldıktan sonra reagenlerin çözünmesi beklendi. Ardından vortekslenip kısa süreli spin attırıldı. Her bir hasta örneği için PCR-1 ve PCR-2'ye ait master A (5µL) ve master B (15 µL)'den oluşan toplam 20 µL'lik ana karışımlar ependorf tüplerde hazırlandı.
2. Ayrıca HBV wild tip ve HBV mutant tip kontroller için de PCR-1 ve PCR-2 ana karışımları yukardaki gibi hazırlandı.
3. Her çalışma aşamasında 10 hasta örneği, 1 HBV wild tip ve 1 HBV mutant tip kontroller olmak üzere toplam 12 PCR-1 ve PCR-2 ana karışımları (20 µL) üzerine sırasıyla hastalara ait DNA ekstraktlarından 10 µL, kontrol tüplere 10 µL wild tip örneği ve 10 µL mutant tip örneği eklendi.
4. Toplam 30 µL PCR reaksiyon karışımı içeren PCR tüpleri Rotor-Gene Q 5plex cihazının karusel (Carousel) aparatına yerleştirildi ve cihaz Tablo 3'de verilen ısı döngüsü programında çalıştırıldı. Yaklaşık 2 saat sonra sonuçlar değerlendirildi.

Tablo 3. HBV real-time PCR sıcaklık döngüleri

Rotor-Gene Q 5plex				
Adım	Siklus	Floresan tespit	Sıcaklık	Zaman
1	1	-	95 °C	10 dakika
2	50	-	95 °C	15 saniye
		FAM (Yeşil)	58 °C	20 saniye
		-	72 °C	30 saniye

HBV PCR-1 ve PCR-2 sonuçları FAM kanalında (yeşil) gözlemlendi ve eşik değerinin üstündeki değerler pozitif kabul edildi.

3.2.3. Pyrosequencing Metodu

Her iki PCR reaksiyonundaki forward primerler biyotinli olup sentezlenen biyotinli amplifikasyon ürünleri streptavidin ile kaplı sefaroze boncuklara bağlanarak tek sarmallı DNA ayrıştırıldı ve pyrosequencing primerlerle analizi yapıldı. Polimeraz bölgesinde oluşabilecek mutasyonların bulunduğu 10 kodon bölgesi real-time PCR tekniği ile çoğaltıldıktan sonra, pozitif çıkan örneklerin ilaç direncine yönelik 6 farklı primer kullanılarak PyroMark Q24 (Qiagen) cihazında pyrosequencing metodu ile dizi analizi gerçekleştirildi. Bu işlem sırasında 4 örnek çalışabilecek 24 kuyucuklu (3 satır, 8 sütun) örnek plağı (sample plate) kullanıldı.

Pyrosequencing test aşamaları:

1. HBV PCR-1 ve PCR-2 pozitif olan 4 hasta örneğine ait 30 µL'lik PCR amplifikasyon ürünleri üzerine 90 µl saf su ilave edildi. Böylece elde edilen bir hastaya ait 120 µL'lik karışımdan 40'ar µL örnek plağının ilk sütundaki üç kuyusuna, PCR-2'ye ait karışımdan da 40'ar µL sonraki 2. sütundaki üç kuyuya dağıtıldı. Ardından bu işlem diğer 3 pozitif hasta örneği için tekrarlandı.
2. Örnek plağının her bir kuyusuna 3 µL sefaroze solüsyonu ve 37 µL binding buffer olmak üzere 40 µL sefaroze karışımı dağıtıldı.

3. Örnek plağının üzeri “sample preparation foil” ile kapatıldıktan sonra çalkalayıcıda (shaker) 1400 rpm’de 10 dakika bekletildi.
4. Bekleme sırasında ayrı bir 24 kuyucuklu (3 satır 8 sütunlu) plağın her bir kuyusuna 22 μ L annealing buffer dağıtıldı. Ardından PCR-1 ürünlerine karşılık gelen ilk sütundaki 1. kuyucuğa 169, 173 kodon bölgesini hedef alan primerden 3 μ L, altındaki 2. kuyucuğa 180, 181, 184 kodon bölgesini hedef alan primerden 3 μ L, en altındaki 3. kuyucuğa 194 kodon bölgesini hedef alan primerden 3 μ L eklendi. PCR-2 ürünlerine karşılık gelen 2. sütundaki 1. kuyucuğa 202, 204 kodon bölgesini hedef alan primerden 3 μ L, altındaki 2. kuyucuğa 236 kodon bölgesine yönelik primerden 3 μ L, en altındaki 3. kuyucuğa 250 kodon bölgesi için primerden 3 μ L eklendi ve diğer kuyulara benzer şekilde sekans primerleri dağıtıldı.
5. Çift iplikli PCR ürünlerinden biyotinli ürünlere bağlı DNA’dan tek iplikli DNA’ların ayrışması için kullanılan çalışma istasyonu (Work station) cihazının (Şekil 10) her ayrı bölümüne sırasıyla %70’lik etil alkol, denatürasyon solüsyonu (Denaturation solution) ve yıkama solüsyonu (Washing buffer) konuldu.
6. Çalkalayıcıdan alınan örnek plağı çalışma istasyonu cihazının uygun bölgesine konuldu. Cihaza bağlı vakum çalıştırılarak örnek plağındaki örnek çekildikten sonra %70’lik etil alkolde 5 sn, denatürasyon solüsyonunda 5 sn, yıkama solüsyonunda 10 sn bekletilerek böylece probun üstünde sadece sefaroz boncuklara bağlı biyotinle işaretli tek iplikli PCR ürünleri elde edildi (Şekil 10).
7. Vakum makinası kapatıldıktan sonra 6 farklı primer ve annealing buffer karışımlarının bulunduğu 24 kuyucuklu plak üzerine sefaroz boncukları tutan problemlerin 1 dakika süreyle temas etmesi sağlanarak tek iplikli PCR ürünlerinin kuyulara aktarılması gerçekleştirildi.
8. Mikroplak 80°C’de 2 dakika bekletildi.
9. Bilgisayar üzerinden PyroMark programı açılarak protokole göre program kurulup flash diske kaydedildi.
10. DNA polimeraz, ATP-sülfürilaz, lusiferaz ve apiraz enzimlerinden oluşan enzim karışımı (Enzyme mixture), adenozin 5’ fosfosülfat ve lusiferinden oluşan substrat karışımı (Substrat mixture) ve dNTP’ler kartuştaki (Pyromark Q24, Cartridge), protokole göre belirlenen kuyucuklara 120 μ L enzim ve 120 μ L substrat ve herbiri 96 μ L olmak üzere dATP α S, dTTP, dCTP ve dGTP eklendi (Şekil 11).

11. Enzim, substrat ve dNTP'lerin bulunduğu kartuş ve plak, PyroMark Q24 cihazına (Qiagen) konularak flash diskteki programa göre çalışması başlatıldı.

12. Yaklaşık 40 dakika sonra sonuçlar elde edildi.



Şekil 10. Çalışma istasyonu (Work station)



Şekil 11. Kartuş

Sonuçlar değerlendirilirken, her bir pozitif örneğe ait 10 kodon bölgesindeki dizi analizine bakıldı. Örneğe ait bulunan dizi, protokolde olan wild tip ve mutant tipe ait diziler ile karşılaştırıldı. HBV ilaç direnci mutasyonu belirlendiğinde hangi mutanta denk geldiği kit protokolüne göre tespit edildi.

4. BULGULAR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı ve Gastroenteroloji Bilim Dalı'na başvuran kronik hepatit B enfeksiyonu olan 137 hastadan alınan kan örnekleri, HBV ilaç direnci mutasyonlarını tespit etmek amacıyla pyrosequencing testi ile çalışıldı.

Kronik Hepatit B olan toplam 137 hastanın 85'i (%62) erkek, 52'si (%38) kadındı. Erkeklerin kadınlara oranı 1.63 idi. Toplam 137 hastada tedavi alan ve almayanların cinsiyet dağılımına bakıldığında hepatit B tedavisi için ilaç alan 48 (%35) hastanın 30'u (%62.5) erkek ve 18'i (%37.5) kadındı. Tedavi almayan 89 (%65) hastanın 55'i (%61.8) erkek ve 34'ü (%38.2) kadındı (Tablo 4).

Hastaların yaşı 17 ile 77 arasında idi. Erkek hastaların yaş ortalaması 44.1 iken kadın hastaların yaş ortalaması 39.1 idi. Toplam 137 hastanın yaş ortalaması ise 42.6 idi. Serum örneklerin 82'si (%59.9) gastroenteroloji polikliniğine, 55'i (%40.1) enfeksiyon hastalıkları polikliniğine başvuran hastalara aitti.

Tablo 4. Hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı

KHB olan hastalar	Naif hastalar n %	Tedavi alan hastalar n %	Toplam n %
Erkek	55 61.8	30 62.5	85 62
Kadın	34 38.2	18 37.5	52 38
Toplam	89 65	48 35	137 100

Kronik hepatit B olan 89'u tedavi almayan naif, 48'i ise tedavi alan toplam 137 hastanın demografik bilgilerine ve klinik özelliklerine bakıldığında tedavi almayan naif hastaların ortalama HBsAg değeri 4830.9 IU/mL idi. Tedavi almayan naif toplam 89 hastanın 8'i (%8.9) HBeAg pozitif, 9'u (%10.1) anti-HBe pozitif ve 2 hastada (%2.2) ise HDV ile koenfeksiyon mevcut idi. Naif hastaların HBV DNA kantitasyonunun ortalama değeri 8.99×10^6 IU/mL iken ortalama ALT değeri 34.7 IU/L ve ortalama AST değeri 30.2 IU/L olarak gözlenmiştir. Karaciğer biyopsisinde fibroz skora bakıldığında naif hastalarda %4.4'ünde fibroz skoru 1, %3.3'ünde fibroz skoru 2, %5.6'sında ise fibroz skoru 3 olarak tespit edilmiştir (Tablo 5).

Antiviral ilaçlarla tedavi alan 48 hastada ortalama HBsAg değeri 4991.5 IU/mL idi. Hastaların 16'sı (%33.3) HBeAg pozitif, 11'i (%22.9) anti-HBe pozitif idi. İki (%2.2) hastada ise HDV ile koenfeksiyon mevcut idi. Tedavi alan hastaların ortalama HBV DNA kantitasyonu 4.62×10^6 IU/mL olarak belirlenmiştir. Ortalama ALT değeri 53.4 IU/L, ortalama AST değeri 44.7 IU/L olan tedavi almış hastalarda karaciğer biyopsi sonuçları incelendiğinde %6.2'sinde fibroz skoru 1, %18.7'sinde fibroz skoru 2, %16.6'sında fibroz skoru 3, %4.6'sında fibroz skoru 4 ve %2.08'inde fibroz skoru 6 olarak bulunmuştur (Tablo 5).

Tablo 5. Hastaların HBV'una ait serolojik, biyokimyasal ve histolojik bulguları

	Tedavi almayan hastalar (89)	Tedavi alan hastalar (48)
HBsAg (IU/mL) ortalama	4830.9	4991.5
HBeAg pozitif	8 (%8.9)	16 (%33.3)
Anti-HBe pozitif	9 (%10.1)	11 (%22.9)
Anti-HDV pozitif	2 (%2.2)	2 (%4.1)
HBV DNA (IU/mL) ortalama	8.99×10^6	4.62×10^6
ALT (IU/L) ortalama	34.7	53.4
AST (IU/L) ortalama	30.2	44.7
Fibroz skoru	skor 1(%4.4), skor 2(%3.3), skor 3(%5.6)	skor 1 (%6.2), skor 2 (%18.7), skor 3 (%16.6), skor 4 (%4.6), skor 6 (%2.08)

Pyrosequencing yöntemi ile HBV ilaç direnci mutasyonlarının insidansı tedavi almayan grupta %1.1 (1/89) tedavi alan hasta grubunda %8.3 (4/48) olarak bulunmuştur. Tedavi almayan grupta bir vaka da HBV ilaç direnci mutasyonu bulunmuş olup 52 yaşında erkek hasta idi. Bu hastada HBsAg 8004 IU/mL, HBeAg negatif ve anti-HBe pozitif olarak gözlenmiş olup HBV DNA kantitasyonu 590 IU/mL, ALT değeri 20 IU/L ve AST değeri 19 IU/L olarak bulunmuştur. Karaciğer biyopsisi yapılmayan ve tedavi almayan naif hastada TDF'e karşı duyarlılığı azaltan rtA194T mutasyonu tespit edilmiştir (Tablo 6).

Tedavi alan grupta HBV ilaç direnci bulunan vakalardan 18 yaşındaki erkek hastada HBsAg değeri 996.8 IU/mL, HBeAg pozitif, anti-HBe negatif idi. Bu hastada HBV DNA kantitasyonu 1.930.000 IU/mL, ALT değeri 34 IU/L ve AST değeri ise 23 IU/L olarak saptanmıştır. Karaciğer biyopsisi yapılmayan bu hastada daha önce LAM'e karşı direnç görülmüştür. Hastanın kullandığı antiviral ilaç tedavisi, LAM (6yıl), ETV (2yıl) ve IFN (1yıl) idi. Çalışmamızda rtM204I mutasyonu tespit edilmiş olup LAM ve TEL'e karşı direnç ve ETV'e ise çapraz direnç görülmüştür.

LAM (5yıl), ADV (1yıl), IFN (6ay) antiviral tedavisi alan ve daha önce LAM ve ADV'e direnç görülen 3. vakada kompensatuvar mutasyon olan rtL180M tespit edilmiştir. Karaciğer biyopsisinde fibroz skoru 4 saptanan bu hastanın ALT değeri 104 IU/L, AST değeri 56 IU/L ve HBV DNA kantitasyonu 170.000.000 IU/mL idi. Onsekiz yaşındaki kadın hastanın HBsAg değeri 285.2 IU/mL, HBeAg pozitif, anti-HBe negatif olarak bulunmuştur.

HBsAg değeri 387.5 IU/mL, HBeAg pozitif anti-HBe negatif olan 19 yaşındaki kadın olan 4. vakada HBV DNA kantitasyonu 1.340.000 IU/mL idi. ALT değeri 48 IU/L, AST değeri 41 IU/L ve karaciğer biyopsisi olmayan bu hastada daha önce LAM ilaç direnci görülmüştür. Bu hasta LAM (5yıl), ADV (1.5yıl), TDF (4ay) ve IFN (2yıl) tedavisi almıştır. Çalışmamızda rtL180M kompensatuvar mutasyonu saptanmıştır.

ALT değeri 172 IU/L, AST değeri 112 IU/L olan 40 yaşındaki kadın olan 5. vakada karaciğer biyopsisi alınmamıştır. HBsAg 5654 IU/mL, HBeAg negatif, anti-HBe pozitif olan bu hastada HBV DNA kantitasyonu 715.000 IU/mL idi. LAM (5yıl) tedavisi alan ve herhangi bir ilaç karşı direnç görülmeyen hastada rtT184S mutasyonu

ile birlikte rtM204V varlığı saptanmış olup ETV'e karşı ilaç direnci tespit edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. İlaç direnci görülen hastaların demografik verileri ve laboratuvar bulguları

	Naif (89 hasta)	Tedavi alan (48 hasta)			
	Vaka 1	Vaka 2	Vaka 3	Vaka 4	Vaka 5
Cinsiyet	E	E	K	K	K
Yaş	52	18	18	19	40
HBsAg (IU/mL)	8004	996.8	285.2	387.5	5654
HBeAg	-	+	+	+	-
Anti-HBe	+	-	-	-	+
HBV DNA (IU/mL)	590	1.930.000	170.000.000	1.340.000	715.000
ALT (IU/L)	20	34	104	48	172
AST (IU/L)	19	23	56	41	112
Fibroz skoru	-	-	4	-	-
Tedavi süresi	Tedavi yok	LAM (6 yıl) ETV (2 yıl) IFN (1 yıl)	LAM (5 yıl) ADV (1 yıl) IFN (6 ay)	LAM(5 yıl) ADV (1.5 yıl) TDF (4ay) IFN (2 yıl)	LAM (5 yıl)
Önceden tespit edilen ilaç direnci	-	LAM	LAM+ADV	LAM	-
Saptanan direnç mutasyonu	rtA194T	rtM204I	rtL180M	rtL180M	rtM204V + rtT184S
Mutasyonlar ile ilişkili ilaçlar	TDF	LAM, TEL, ETV	LAM, TEL, ETV	LAM, TEL, ETV	ETV, LAM, TEL,

Tedavi verilen toplam 48 hastanın 11 (%22.9)'i tek başına LAM, 11 (%22.9)'i TDF ve 8 (%16.6)'i ETV kullanmıştır. TDF ile birlikte 5 (%10.5) hasta LAM ve 2 (%4.1) hasta LAM ve ADV tedavisi almıştır. (Tablo 7).

Tablo 7. Kronik HBV enfeksiyonu olan 48 hastanın tedavisinde verilen ilaçlar

Tedavi verilen ilaçlar	Sayı	%
LAM	11	22.9
TDF	11	22.9
ETV	8	16.6
LAM, ETV, IFN	1	2.1
LAM, ETV	1	2.1
LAM, ADV, IFN	1	2.1
LAM, TEL	1	2.1
LAM, TDF	5	10.5
LAM, TDF, ADV	2	4.1
LAM, TDF, ADV, IFN	1	2.1
LAM, TDF, IFN	1	2.1
TDF, IFN	2	4.1
TDF, ETV	1	2.1
ETV, IFN	1	2.1
IFN	1	2.1

5. TARTIŞMA

Kronik HBV enfeksiyonunda antiviral tedavinin temel hedefi konaktan virusu temizlemek, karaciğer hastalığının siroz ve HCC'e ilerlemesini önlemektir. Ancak kronik HBV enfeksiyonu enfekte hepatositlerin nükleusunda cccDNA'nın varlığından dolayı tamamen eradike edilmez. HBV polimerazın revers transkriptaz domaini hepatit B tedavisinde kullanılan LAM, TEL, ETV, ADV ve TDF gibi NA'ları için hedefdir. Mevcut tüm NA'ları ilk reaksiyon olan kısa negatif DNA ipliğinin sentezi, pgRNA'dan revers transkripsiyon ile negatif DNA sentezi veya DNA bağımlı DNA replikasyonu olmak üzere 3 adımdan 1 veya daha fazlasını hedefleyerek antiviral etki gösterir. NA'ları, şeker halka veya baz grubunun modifikasyonu hariç doğal nükleotidlere benzer yapıya sahiptir. Bu yüzden NA'ları polimeraza bağlanmada doğal nükleotidler ile yarışır³⁹.

Viral persisten ve antiviral ilaçlara direncin sebebi farklı viral ve konak faktörlerinin kombinasyonun içerir ki majör faktörler enfekte hepatositlerin uzun yarılanma ömrü olması (30-100 gün), mutasyonların oluşmasına yol açan HBV'un doğal genetik çeşitliliği ve bunların cccDNA'da arşivlenmesidir. Tekli mutantların tedavi başlamadan önce bile viral popülasyonda ortaya çıktığına inanılmaktadır. Farklı varyantlar veya mutantlar enfeksiyonun seyri sırasında antiviral tedavi veya immun cevap sonucu konakta seçilir. İki tip mutasyon NA'larına karşı direnç ile ilişkilidir. İlaç direncinden sorumlu primer direnç mutasyonları ve dirençli suşlarda replikasyon gücünü uyarıcı veya artıran sekonder kompensatuvar mutasyonlardır. Baskın mutant ile karaciğer hücrelerinde wild tip virusun yer değiştirmesi yavaş bir süreçtir. Çünkü dirençli mutantlar temel olarak enfekte olmayan hücreleri enfekte eder. Baskın mutantların etkili yayılması replikasyon için virus ile enfekte olacak karaciğer alanının

bulunmasına bağlıdır. Bu, NA'ları arasında direnç insidansının farklı olması ile kısmen açıklanabilir³⁹.

LAM en yüksek direnç profiline sahiptir. Çünkü direnç tedavinin ilk yılında gelişmeye başlar ve zamanla artar. Direncin yıllık oranı %15-25 iken tedavinin 5 yılından sonra bu oran %80'dir. Direncin yüksek oranından dolayı LAM, "European Association for the Study of Liver" ve "American Association for the Study of Liver Diseases" önerilerine göre kronik hepatitli naif hastalarda ilk tercih ilaç olarak önerilmemektedir. ADV ve TEL'e direnç oranları orta seviye olarak tanımlanır. TEL ile 2 yıllık tedaviden sonra direnç oranı %10-25, ADV ile 5 yıldan sonra yaklaşık %30'dur³⁹. HBeAg pozitif hastalarda TEL'e genotipik direncinin kümülatif sıklığı 52 haftada %5 ve 104 haftada %25.1 iken HBeAg negatif hastalarda direnç insidansı sırasıyla %2.2 ve %10.8'dir. iki yıldaki direnç oranı LAM'den daha düşük (%42), ADV (%3) ve ETV (<%1)'den daha yüksektir. ADV dirençli viruslarda seleksiyon oranı oldukça düşüktür. HBeAg negatif KHB'li hastalarda 2 yıl ADV tedavisinden sonra direnç yaklaşık %2 oranında ortaya çıkmaktadır. Buna karşın, 5 yıl ADV monoterapisi alan hastaların %30'unda direnç tespit edilmiştir⁷⁷. LAM'e direnç taşıyan vakalarda ADV'in devreye girmesi ile birlikte ve 12 ay süre ile kullanılmasının ardından hastaların %20'sinde genotipik analizle direnç tespit edilmiştir. ETV direnç mutasyonlarına karşı yüksek engele sahip antiviral olup tedavinin 5 yılından sonra direnç oranı %1.2'dir. TDF ile ise tedavinin 4 yılından sonra halen herhangi bir direnç oluşmadığı bildirilmiştir. Ancak ETV dirençli HBV'un oluşmasındaki risk, daha önce varolan LAM dirençli hastalarda ETV ile tedavinin 5 yılından sonra %51 kadar yüksektir. LAM direnci olan hastalarda, TDF ile viral kırılma durumu HBV/HIV koenfektif hastalarda bildirilmiştir. Hastalarda düşük prevalansdaki direnç mutasyonlarını ultradeep pyrosequencing gibi modern teknikler direkt PCR sequencing metodlara göre daha kısa sürede tespit eder³⁹.

Moleküler mekanizmanın araştırılması direncin NA yapısına spesifik olduğunu göstermiştir. Son zamanlarda beş direnç yolu tanınmıştır. Bunlar; L nükleozid yolu, alkil fosfonat yolu, L nükleozid ve alkil fosfonat arasında paylaşılan yol, D siklopentan yol ve çoklu ilaç direncidir.

L nükleozidler (LAM ve TEL) benzer moleküler yapıya sahiptir. Bu yüzden antiviral ilaç direnci mutasyonlarının profili benzerdir. L nükleozid yolu için en iyi bilinen mutasyon revers transkriptazın katalitik bölgesinde YMDD motifinin 204. pozisyonundaki rtM204V/I değişimidir. Bu mutasyon tek başına direnç için yeterlidir. Ancak sıklıkla kompensatuvar mutasyonlarla (rtL180M/C, rtV173L) birlikte bulunur. LAM ile ilgili başlıca mutasyonlar rtM204V/I/S, rtA181T, rtL180M/C, rtV173L, rtI80V/I, rtL169T, rtT184S/G ve rtQ215S'dir³⁹. LAM direncine sebep olan başlıca mutasyonlar rtM204V ve rtM204I mutasyonlarıdır. Bu mutasyonların LAM'e duyarlılığını in vitro çalışmalar 100 kat azalttığını göstermiştir. rtM204I yer değişimi tek başına tespit edilebilir. Oysa rtM204V/S diğer mutasyonlar ile kombine tespit edilir. rtA181T direnç ile ilgili daha az yaygın bir mutasyon olup rtM204V/I yokluğunda geliştiği belirtilmiştir⁵.

Kompensatuvar mutasyonlardan rtL180M mutasyonu, başlıca rtM204V/I/S ile birlikte tespit edilip HBV replikasyonunu HBV wild tip'in düzeylerine yakın olacak şekilde onarılmasını sağlayan başlıca kompensatuvar bir mutasyon olarak görev görür. rtL80V/I mutasyonu başlangıçta belirgin LAM direnci görülen ciddi hepatitli hastalarda genotip C HBV izolatlarında tespit edilmiştir. Yine kompensatuvar mutasyon olan rtV173L LAM direnci olan hastaların %9'unda ortaya çıkmıştır ki bu karaciğer transplantasyonu yapılan hastalarda bulunur⁵. Kompensatuvar mutasyonun rolü wild tip'e yakın seviyelere viral polimerazın fonksiyonunu onarmaktadır. Bu mutasyonlar in vitro şartlarda tek başına bulunduğu zaman çok düşük direnç seviyeleri ile ilişkilidir³⁹.

TEL, L nükleozid olarak LAM gibi benzer direnç mutasyon profiline sahip olup mutasyonlar YMDD motifinde oluşur. rtM204V ve rtL180M mutasyonları in vitro TEL'e direnç göstermektedir. Sekonder mutasyonlar rtL80V/I ve rtL80V/I+rtL180M'in bazen rtM204I ile olduğu görülür. TEL ile ilişkili mutasyonlar da 80. 180. 181 ve 229 bölgelerinde belirlenir, ancak ilaç direnci ve klinik önemin özelliği halen çözülememiştir⁵.

Alkil fosfonat grubunda olan ADV ve TDF için mutasyonlar revers transkriptazın B ve D domaininde YMDD motifi dışında tanınmıştır. Alkil fosfonatlar için başlıca iki primer direnç mutasyonu rtA181T ve rtN236T vardır³⁹. Genotipik analiz ile ADV direnci, HBV polimerazın D domaininde 236. kodondaki treoninin asparajine

dönüşmesi (rtN236T) ve 181. kodondaki alaninin treonin veya valine dönüşmesi (rtA181T) sonucu görülmüştür. İlaç duyarlılık deneylerinde rtN236T mutasyonunun LAM, TEL ve ETV'e karşı duyarlılığı etkilemediği, rtA181T mutasyonun LAM (<10 kat), ADV (2-8 kat) ve TDF'e (2-3 kat) duyarlılığı azalttığı in vitro şartlarda gösterilmiştir⁷⁷. Diğer bir mutasyon olan rtI233V ADV dirençli HBV varyantlarında belirlenmiştir. Bu mutasyonun tam önemi tartışmalı bir şekilde kalmıştır. Çünkü ADV direncinde rolü bazı araştırmacılar tarafından doğrulanmış, bazıları tarafından kabul edilmemiştir. Son çalışmalar HBV'un 3 boyutlu modelinin kullanılmasıyla 233. kodondaki izolösünün valine dönüşmesinin revers transkriptazın katalitik bölgesini etkilemediğini göstermiştir ve bağımsız olarak ADV'in antiviral etkisini değiştirmeyebilir³⁹.

rtA194T mutasyonun ortaya çıkması TDF direnci ile ilişkilidir. Fakat bu mutasyonun klinik önemi hala bilinmemektedir. Amini-Bavil Olyae ve arkadaşları tarafından yapılan sonraki in vitro çalışmada rtA194T polimeraz mutasyonunun kısmi TDF direnci ile ilişkili olduğu, ancak HBV'un replikasyon yeteneğine negatif etki ettiği bildirilmiştir. Benzer bir şekilde, Qin ve arkadaşları tarafından yapılan yeni bir çalışmada rtA194T mutasyonun varlığında hem in vivo hem de in vitro şartlarda TDF'e duyarlılık değerlendirilmiş ve HBV replikasyon kapasitesi yeterli bulunmamıştır. Ancak bu çalışmada rtP177G ve rtF249A mutasyonları olan suşların replikasyon yeteneğinin azaldığı, fakat hem in vivo hemde in vitro analizlerde TDF direncinin arttığı gösterilmiştir. Bu aminoasit değişimleri ile gelişen TDF direncinin moleküler mekanizmaları hala tam açıklanmamıştır. Diğer taraftan hastalarda TDF direncinin olmadığını gösteren klinik bulgularla uyumlu olarak Kitrinos ve arkadaşları 6 yıldan uzun süreli tedavide TDF direnci ile ilişkili önemli bir mutasyon seçilimi olmadan TDF monoterapisinin viral süpresyonu sağladığını göstermiştir^{39,109,110}.

Revers transkriptazın B domaininde olan rtA181T/V mutasyonunun hem L nükleozid hemde alkil fosfonatlara direnç verdiği gösterilmiştir. rtA181T mutasyonu aynı zamanda üst üste çakışan zarf proteinlerinin S bölgesinde (sW172*) 172. aminoasitte bir stop kodonu kodlar ve zarf proteinlerin kısalmasına sebep olur. Warner ve Locarnini'nin belirttiği gibi, rtA181T/sW172* varyantında virionun serbest bırakılmasında bozukluk vardır ve wild tip HBV virionun salınmasına negatif etki

gösterir. Bu durumda ilaç başarısızlığı için sadece viral yük tek kriter olarak kullanıldığında ilaç direnç tanısı atlanabilir. Aynı zamanda enfekte hücrelerde kısa HBsAg birikiminin hücresel promoterlerin transaktivasyonu yoluyla HCC'in başlamasını desteklediği gösterilmiştir³⁹.

D siklopentan grubunda ETV'e karşı tam direnç, rtL180M ile birlikte rtM204V veya rtT184G/S veya rtS202I/G veya rtM250V olmak üzere en az 3 mutasyon olduğunda görülür. Bu sebeple LAM direnci ile ilişkili mutasyonlar ETV'e virolojik kırılmanın gelişmesi için gereklidir. LAM direnç mutasyonlarının yokluğunda ETV direnci çok yavaş gelişir. Buna karşılık LAM tedavisi başarısız olan hastalarda ETV kullanıldığında ETV direnç gelişimi daha çok beklenir³⁹. ETV direncinin ortaya çıkması ile ilişkili HBV polimerazındaki mutasyonlar B domainde (rtI169T, rtL180M ve/veya rtS184G), C domainde (rtS202I ve rtM204V) ve E domainde (rtM250V) gösterilmiştir. rtL180M ve rtM204V/I gibi LAM direnci mutasyonlarının yokluğunda rtM250V ETV'nin IC₅₀ değerini 10 kat artırır iken rtI169T, rtT184G veya rtS202I IC₅₀ değerinde sadece az bir etkiye sahiptir⁸⁵.

Birden fazla NA'larına dirençten sorumlu tek mutasyon örneği olan rtA181T/V dışında çoklu ilaç direncinden sorumlu birden fazla mutasyon bildirilmiştir. Genellikle farklı NA'ları ile ard arda monoterapiler yapıldığında zaten dirençli olan suşa yeni direnç mutasyonların eklenmesi ile ortaya çıkar. İkili direnç (LAM ve ADV veya ETV) olan hastalardan elde edilen klonların analizinde aynı viral genomda lokalize her iki ilaca direnç veren mutasyonların varlığı gösterilmiştir³⁹.

Ayrıca HBV genomunda polimeraz ve zarf genleri üst üste geldiğinden NA'ları ile tedavi hem revers transkriptaz hemde zarf proteinlerde mutasyonlar taşıyan kompleks HBV varyantlarının ortaya çıkışına da sebep olabilir. Antiviral ilaç ile ilişkili S geni mutasyonları (Antiviral-Drug Associated S gene Mutations) 3 farklı sonuca sebep olabilir; yüzey proteinlerinde aminoasit yerdeğişimine bağlı mutasyonlar, kısa yüzey proteinlerinin oluşumu ile sonuçlanan anlamsız (nonsense) ve sessiz mutasyonlar HBsAg mutasyonları tedavi almamış (naif) hastalarda bulunduğundan antiviral ilaç ile ilişkili S geni mutasyonlarının muhtemel klinik etkisi antijenitenin değişmesi, viral replikasyondaki değişim ve onkojenik potansiyeldir. Üçlü mutasyon olan HBV mutantında (rtV173L+rtL180M+rtM204V) üst üste çakışan yüzey genlerinde

(sE164D+I195M) 2 aminoasit değişikliği gösterilmiştir ve aşından kaçan mutant sG154R'ye benzer etkiye sahiptir. LAM tedavisinin ardından bir çok hasta S geninde “aşından kaçan” P120T ve G145R mutasyonları olan suşları taşır. Bunlar revers transkriptazda rtT128N ve rtW153Q değişikliklerini yapar ki bu mutasyonların LAM dirençli suşun replikatif kapasitesini in vitro koşullarda kısmen onardığı böylece kompensatuvar mutasyon olarak görev gördüğü bulunmuştur³⁹.

HBV ilaç direnci ile ilgili tedavi almayan (naif) hastalarda yapılan araştırmalardan Pastor ve ark¹¹¹. Fransa'da, Strazburg Üniversite Hastanesine 2005 ve 2006 döneminde başvuran tedavi almayan kronik HBV enfeksiyonu olan 14 hastada HBV polimeraz geninin dizi analizini yapmıştır. Çalışma sonucunda 2 hastada ADV ve TDF ile ilişkili mutasyonlar tespit etmiştir. Bir hastada ADV direnci ile ilişkili rtV214A ve rtN238T varlığı, diğerinde de TDF direnci ile ilişkili rtA194T mutasyonu bulmuştur. Bu sebeple tedavi edilmeyen hastalarda mutasyonların dikkatli taranması gerektiği vurgulanmıştır.

Salpini ve ark¹¹². İtalya'da, Roma'da 2011 yılında yaptıkları çalışmada HBV D genotipi ile enfekte 140 tedavi almayan hastada ilaç direnci mutasyonlarını dizi analizi yöntemiyle araştırmıştır. Naif 140 hastanın 2 (%1.4)'sinde rtA181V (%0.7) ve rtA194T (%0.7) primer ilaç direnci mutasyonu bulunmuş olup oysa 3 (%2.1) hastada kompensatuvar mutasyon olan rtV173L (%1.4) ve rtL180M (%0.7) tespit edilmiştir. İlaç direncinde rolü olan 5 poliformik mutasyon rtQ215S (%12.8), rtI233V (%4.3), rtV214A (%3.6), rtV191I (%0.7) ve rtV207L (%0.7) tespit edilmiştir. YMDD mutasyonları (rtM204V/I) bulunmamıştır. Sonuç olarak, HBV D genotipi ile enfekte naif hastalarda ilaç direnci mutasyonların oranı çok düşük olup tedavide birinci aşamada kullanılan yeni nesil antiviral ilaçların etkin olacağı bildirilmiştir.

Mantovani ve ark¹¹³. Brezilya'da, Sao Paulo'da 2013 yılında yaptığı bir çalışmada 61'i gönüllü kan donörü ve 19'u tedavi almamış hepatit B hastasına ait olmak üzere 80 serumdan 34'ü PCR pozitif bulunmuştur. Kan donörü olan 21 hasta ve tedavi almayan 13 hastaya ait örneklerin dizi analizi ile LAM direnci araştırılmıştır. Toplam 34 örnekten 1 (%2.94)'inde LAM direnç mutasyonu olan rtM204V ve rtL180M varlığı hiç antiviral ilaç kullanmayan kan donöründe bulunmuştur. Diğer 9 (%26.4) örnekte ise rtL80F (%5.88), rtL80V (%2.94), rtL82V+rtV207L (%2.94), rtT128P

(%5.88), rtT128N/S (%2.94) ve rtS219A (%5.88) gibi sadece kompensatuvar mutasyonlar gözlenmiştir. Bulunan kompensatuvar mutasyonlardan sadece rtS219A (%2.94) tedavi almayan 13 hasta grubunda idi. Sonuç olarak, LAM'e dirençli suşların diğer kişilere bulaşabileceği ileri sürülmüştür.

Sayan ve ark.¹¹⁴ Kocaeli'nde Nisan 2008 ile Ocak 2009 tarihleri arasında tedavi verilmeyen toplam 88 kronik hepatit B hastasında (65 erkek ve 23 kadın; 15-61 yaşları arasında, yaş ortalaması; 34) doğal olarak meydana gelen veya önceden var olan NA ile ilişkili direnç mutasyonlarını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada dizi analizi ile hastaların %19'unda (17) manuel yorumlama ve %34'ünde (30) geno2pheno veri tabanına dayalı analiz ile HBV polimeraz geninde doğal olarak oluşan mutasyonları bulmuştur. Her bir mutasyon tek başına olup rtA194T, rtV214A, rtQ215S, rtI233V ve rtN236T tespit edilmiştir. TDF direnci ile ilişkili rtA194T mutasyonu iki hastada (%2.2) ve ADV direnci ile ilişkili rtN236T mutasyonu bir hastada (%1.1) bulunmuştur. Hastaların %75'i (66) HBeAg negatif ve %25 (22)'i HBeAg pozitifdir. Viral yük, ALT ve AST için ortalama değerler sırasıyla 3.3 log₁₀ (2.0-6.0) IU/mL, 36 (12-515) U/L ve 27 (13-284) U/L olup polimeraz bölgesinde gözlenen mutasyonlarla ile korele değildir. Dizi analizi ile HBV genotip D hastalarda baskın olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, hastada tedavi seçeneklerinin daha etkili yönetimi için KHB tanısı alan her hastanın tedavi başlamadan önce izlenmesi önerilmiştir.

Sayan ve ark.¹¹⁵ Kocaeli'nde Ocak 2010 ve Şubat 2011 döneminde yaptıkları diğer bir çalışmada ise kronik hepatit B hastası olan naif 248 hemodiyaliz hastasında NA'larına karşı genotipik direnç ve HBsAg aminoasit değişimleri ("Antiviral Drug-Associated Potential Vaccine-Escape Mutation" ile tipik HBsAg aminoasit değişimleri) polimeraz genini dizi analizi ile araştırılmıştır. HBsAg pozitif hastaların sadece %38'inde (94) HBV DNA pozitifliği tespit edilmiştir. Doğal olarak oluşan primer direnç mutasyonları 94 hastanın %30'unda (28) ve kompensatuvar direnç mutasyonları %52'sinde (49) bulunmuştur. Primer direnç mutasyonları 28 hastadan 5'inde (%5.5) rtA181G/L/S/T (LAM, TEL, Clevudine, ADV, TDF), 2'sinde (%2.2) rtT184I/K/S (ETV), 3'ünde (%3) rt194S/X/T (TDF), 3'ünde (%3) rtS202N/R/T (ETV), 10'unda (%10.5) rtM204I/L/K/V±rtV173L±rtL180M (LAM, TEL, Clevudine, Emtricitabine), 2'sinde (%2.2) rtM204V/I+rtT184K/S (LAM, TEL, ETV), 1'inde (%1) rtI233V

(ADV) ve 2'sinde (%2.2) rtM250I/R (ETV) iken kompensatuvar direnç mutasyonları 49 hastadan 14'ünde (%15) rtQ149K (ADV), 2'sinde (%2.2) rtL180V/R (LAM, Clevudine, Emtricitabine, TDF), 9'unda (%10) rtV214A (LAM, Clevudine, Emtricitabine, TDF), 19'unda (%20) rtQ215H/P/S (LAM, Clevudine, ADV, TDF) ve 5'inde (%5) rtN238D/T (ADV) tespit edilmiştir. Buna karşılık hastaların %10.6'sında (10) altı tip ADAPVEM ve %46'sında kırksekiz tip tipik HBsAg aminoasit değişimi gözlenmiştir. Sonuç olarak, kronik hepatitli hemodiyaliz hastalarında tedavi başlamadan önce direnç mutasyonlarının araştırılmasının uygun tedavi seçimi için gerektiği savunulmuştur.

Ergünay ve ark¹¹⁶. Ankara'da, 2013 yılında yaptığı çalışmada kronik HBV enfeksiyonu olan ve tedavi almamış hastalarda NA'larına karşı antiviral ilaçlarla ilişkili direnç mutasyonlarını araştırmıştır. Toplam 42 vakada HBV'un polimeraz geninin 470-720 nükleotidler arasında yer alan yaklaşık 250 baz uzunluğundaki kısmı "nested" PCR ile çoğaltıp, ürünler Invisorb Rapid PCR (Invitex, Almanya) kiti ile purifiye edildikten sonra sens primerleri ve "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, USA) kullanılarak dizi analizi yapılmıştır. İncelenen 42 örneğin 30 (%71.4)'unda kısmi diziler elde edilmiş ve tüm olgular genotip D olarak saptanmıştır. Olguların 19 (%63.3)'unda çeşitli nükleotid değişiklikleri izlenmiş; 8 (%26.6) olguda aminoasit değişikliğine neden olmayan sessiz mutasyonlar, 7 (%23.3) olguda önemi bilinmeyen mutasyonlar ve 3 (%10) olguda ise antiviral direnç ile ilişkili mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar bir olguda ETV ve LAM (rtS202G, rtM204V, rtL180M, rtT184N), bir olguda muhtemel LAM ve ADV (rtL180P, rtA181Q), bir olguda ise muhtemel TDF direnci (rtA194V) şeklinde belirlenmiştir. Sonuç olarak, önceden ilaç tedavisi almamış kronik hepatit B hastalarında, NA'larına karşı direnç ile ilişkili mutasyonların varlığının tespitinin optimal tedavi rejiminin seçimi açısından yol gösterici olduğu belirtilmiştir.

HBV'a karşı antiviral tedavi alan hastalarda yapılan çalışmalardan Margeridon-Thermet ve ark¹¹⁷. Kaliforniya'da 2013 yılında yaptıkları çalışmada önceden LAM tedavisi alıp ara verilen HBV ile enfekte hastalarda LAM direncine ait minör varyantların araştırılmasını yapmışlardır. Direkt PCR dizi analizi ve ultradeep pyrosequencing ile HBV revers transkriptazın dizi analizini gerçekleştirmişlerdir. Kırkbeşi LAM tedavisi almayan ve 46'sı LAM tedavisi alıp ortalama 24 ay önce

tedavinin kesildiği hastalara ait örnekler çalışılmıştır. LAM direnç mutasyonu LAM alan 10 hastada (%22), LAM almayanlarda ise bulunmamıştır. LAM direnç mutasyonu olan 10 hastada LAM almama süresi 12.8 ay iken LAM direnç mutasyonu olmayan LAM alan 36 hastada 39.5 ay idi. LAM direnç mutasyonu pyrosequencing ile Sanger dizi analizine göre daha çok tespit edilmiştir. Sanger dizi analizi ile LAM alan 46 hastadan 5 (%11)'inde ≥ 1 LAM direnç mutasyonu (rtL80V/I, rtM204I, ve rtA181T) tespit edilirken, LAM almayan 45 hastanın hiç birinde bulunmamıştır. Ultradeep pyrosequencing testi ile LAM alan 46 hastanın 10 (%22)'unda ≥ 1 LAM direnç mutasyonu (rtL80V/I, rtV173L, rtL180M, rtA181T ve rtM204V/I) bulunmuş olup hastaların 5'inde Sanger dizi analizi ile mutasyon tanınmamıştır. On hastadan 8 (%17.69)'inde LAM direnci ile ilişkili rtM204V/I ile birlikte rtL80V/I, rtV173L ve rtL180M gibi kompensatuvar mutasyonlar 1 (%2.2) hastada sadece kompensatuvar mutasyonlar olan rtL180M ve rtL80V/I varlığı ve 1 (%2.2) hastada çoklu mutasyonlar ile ilişkili rtA181T bulunmuştur. Ultradeep pyrosequencing testinin, Sanger dizi analizi ile kıyaslandığında LAM direnç mutasyonunun tespiti önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir.

Wong ve ark¹¹⁸. Çin'de, Hong Kong'da Nisan 2007 ve Ocak 2010 tarihleri arasında 18 yaş ve üzerindeki 51 KHB hastasında dizi analizi yöntemi ile HBV ilaç direncini araştırmıştır. Bu hastaların 37'si (%73) HBeAg pozitif ve 14'ü (%28) siroz idi. İlaç direnci testi sırasında, hastaların büyük çoğunluğu LAM, ADV ve ETV ile monoterapi almıştır. On (%20) hasta LAM ve ADV kombinasyonu ile tedavi almasına rağmen HBV DNA tespit edilmiştir. Antiviral ilaç direnci 34 (%67) hastada belirlenmiş olup 4 (%8) hastada düşük viral yükten dolayı dizi analizi başarısız olmuştur. Wild tip HBV 13 (%25) hastada bulunmuştur. Hastaların tedavisi sırasında LAM ile ilişkili 4 (%7.9)'ünde rtM204V/I, 7 (%13.8)'sinde rtM204V/I+rtL80V/I, 11 (%21.6)'inde rtM204V/I+rtL180M, 3 (%5.9)'ünde rtM204V/I+rtL180M+rtL80V/I, 1 (%1.9)'inde rtM204V+rtV173L+rtL80I, 1 (%1.9)'inde rtM204I+rtL180M+rtL80I ve rtV173L bulunmuştur. ETV ile ilişkili 4 (%7.9)'ünde rtM204V+rtL180M+rtS202G, 1 (%1.9)'inde rtM204V+rtL180M+ rtT184I/S, ADV ile ilişkili 1 (%1.9)'inde rtN236T ve çoklu direnç ile ilişkili rtA181T 1 (%1.9) hastada tespit edilmiştir. En yaygın rtL180M ve rtM204V/I mutasyonu bulunmuş olup rtL80V/I, rtV173L ve rtS202G gibi kompensatuvar mutasyonlar da tespit edilmiştir.

Wen ve ark¹¹⁹. Çin’de, Nanjing’de kronik HBV enfeksiyonu olan ve 1-2 yıl (2003-2006) LAM monoterapisi alan 271 hastanın serum örneklerini LAM direnci ile ilişkili HBV mutasyonları için pyrosequencing testi ile analiz etmiştir ve 189 hastada (%69.7) YMDD mutasyonları tanınmıştır. Hastaların 79 (%29.2)’u YIDD (rtM204I), 55 (%20.3)’i YVDD (rtM204V) ve 55 (%20.3)’i YIDD ve YVDD ile birlikte bulunmuştur.

Tuma ve ark¹²⁰.’nın İspanya’da, Madrid’de Aralık 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada antiretroviral tedavi verilmemiş 4.419 HIV-1 ile enfekte hastaların 223 (%5.1)’ünde HBsAg pozitif bulunmuştur. Ancak sadece 73 hastaya ait serum örneklerinde ilaç direnci mutasyonları için dizi analizi gerçekleştirilmiştir. İlaç direnci mutasyonu görülen 4 (%5.5) hastanın 2 (%2.7)’sinde rtL180M, 1 (%1.4)’inde rtL80V ve 1 (%1.4)’inde ise rtV173L tespit edilmiştir. Sonuç olarak, İspanya’da HIV ve HBV ile koenfeksiyonu olan yeni tanı almış hastalarda direnç oranı (%5.5) düşük olup LAM direnci ile ilişkili kompensatuvar mutasyonlar bulunmuştur. Bu sebeple oral antiviral tedavi verilmeden önce HBV ilaç direnç testinin yapılmasının direnç oranı düşük olduğundan dolayı gerekli olmadığı belirtilmiş, ancak periyodik taramanın yapılması tavsiye edilmiştir.

Ülkemizde HBV ilaç direnci ile ilgili çalışmalardan Çiftçi ve ark¹²¹. İstanbul’da, 2013 yılında yaptıkları çalışmada kronik HBV enfeksiyonu olan 12’si HBsAg pozitif toplam 16 tedavi almamış (naif) hastada antiviral direnç mutasyonları 42 potansiyel NA direnç mutasyon yeri ultradeep pyrosequencing (Roche Diagnostics, Co.) ile araştırılmıştır. Ardından tedavi uygulanıp ilaç direnç mutasyonları LiPA ile tespit edilmiştir. Tedavi öncesi alınan örneklerde klasik primer veya kompensatuvar ilaç direnci bulunmamıştır. Ancak 6 izolatda (%37.5) rtL91I, rtT128I, rtQ215P, rtF221Y, rtN238D, rtC256S ve rtI266G gibi primer olmayan direnç mutasyonları tespit edilmiştir. Bu mutasyonların dağılımı 1 (%6.3) vakada rtI91L ve rtI266G, 2 (%12.5) vakada rtT128I, rtQ215P ve rtN238D ve 3 (%18.8) vakada rtF221Y ve rtC256S’dir. NA tedavisinden sonra ilaç direnci gelişen tedaviye cevapsız 3 hastada 3 direnç mutasyonu (rtT128I, rtN238D ve rtC256S) bulunmuştur. LAM tedavisi alan 1 hastada da aynı zamanda rtI266G ilaç direnci mutasyonu gelişmiştir. Buna karşılık rtI266G mutasyonu ile antiviral ilaç direnci arasındaki ilişki daha önce bildirilmemiştir. Bu sonuçlar, primer ve sekonder kompensatuvar mutasyonlarının yanı sıra potansiyel mutasyonlarla ilişkinin

araştırılması gerektiğini göstermektedir. Tedavi öncesi antiviral direnç mutasyonlarının araştırılmasının tedavi başarısı için önemli olduğu bildirilmiştir.

Sayan ve ark.¹²² Kocaeli’nde, Mart 2007 ve Eylül 2008 tarihleri arasında yaptığı çalışmada LAM tedavisi almış ve ETV naif 87 hasta ve hiçbir tedavi uygulanmamış olan 75 hastada HBV polimeraz geninde 80 ve 250. pozisyonları arasında kalan aminoasit bölgesini DNA dizi analizi metodu kullanılarak ETV ilaç direnci ve HBV polimeraz geni ile örtüşen hepatit B yüzey geni (S geni) mutasyonları yönünden araştırmıştır. Tedavi almayan 75 hastada primer LAM ve ETV direnci saptanmamıştır. Tedavi alan 87 hastanın 37’sinde (%42.6) primer LAM direnci ve 4 (%4.5)’ünde primer ETV ilaç direnci tanımlanmıştır. Hastaların 2 (%2.3)’sinde rtL180M kompensatuvar mutasyonları ile ETV’e direnç veren rtT184A mutasyonu, 1(%1.1)’inde kompensatuvar mutasyon olan rtQ215S ile birlikte rtT184I ve 1 (%1.1)’inde rtL180M+rtQ215S kompensatuvar mutasyonu ile birlikte rtT184S mutasyonu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, ETV’in kronik HBV enfeksiyonlu hastalarda tedavi seçeneği olması durumunda LAM dirençli varyantların varlığı önem kazanmaktadır. Bu sebeple LAM, ADV ve ETV tedavilerinde direncin izlenmesinin hem gelişen direncin mekanizmalarını ve prevalansını aydınlatmak hem de hastaların tedavi seçeneklerinin daha etkin bir biçimde ele alınması açısından yararlı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca LAM tedavisi almış ve LAM direncinden sorumlu rtM204V/I+rtL180M mutasyonlarının geliştiği ETV naif, kronik B hepatitli hastalarda, ETV’e direnç gelişebileceği vurgulanmıştır.

Sayan ve ark.¹²³. Kocaeli’nde, Mart 2007 ve Kasım 2010 tarihleri arasında yaptıkları diğer bir çalışmada ise toplam 194 hastada HBV ilaç direnci paternlerinin sıklığını DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA) kullanarak ABI PRISM 310 Genetic Analyzer cihazında direkt dizi analizi ile araştırmıştır. Primer ilaç direnci mutasyonları, LAM alan 84 (%43), ETV alan 10 (%5) ve ADV alan 16 (%8) hastada tespit edilmiştir. En yaygın LAM ve ETV direnç mutasyonları sırasıyla rtM204V/I, rtL180M ve rtT184A/I/S iken rtA181T/V ve rtN236T değişimleri en çok ADV dirençli mutasyonlar olarak gözlemlenmiştir. Çalışmada LAM direnci ile ilişkili kompensatuvar rtL180M 6 (%3) hastada tek başına bulunmuş olup rtM204V/I mutasyonu 26 (%14), rtM204V/I+rtL80V/I mutasyonu 16 (%8), rtM204V/I+rtL180M mutasyonu 24 (%12) ve

rtM204V/I+rtV173L+rtL180M veya rtA194G mutasyonları 12 (%6) hastada bulunmuştur. ETV direnci ile ilişkili ise 8 (%4) hastada rtM204V/I+rtL180M+rtT184A/I/S ve 2 (%1) hastada rtM204V+rtL180M+rtS202C olmak üzere toplam 10 (%5) hastada ETV direnci bulunmuştur. rtA181T/V mutasyonu 6 (%3) hastada, rtN236T mutasyonu 8 (%4) ve rtA181T+rtN236T mutasyonu 2 (%1) hastada olmak üzere 16 (%8) hastada ADV ile ilişkili mutasyonlar görülmüştür. Toplam 60 (%31) hastada TEL direnci ile ilişkili olmak üzere 24 (%12.4) hastada rtM204I, 28 (%14.4) hastada rtM204I+rtL180M+rtL80V/I, 8 (%4.2) hastada rtM204I+rtL180M+rtV173L veya rtL80V/I tespit edilmiştir. Ayrıca diğer kompensatuvar mutasyon olan rtQ215H/P/S+/- rtV214A/P 12 (%6) vakada bulunmuştur. Hastaların 72 (%37)'sinde mutasyon belirlenmemiş olup böylece %63 oranında ilaç direnci mutasyonları tespit edilmiştir. Sonuç olarak, LAM dirençli hastalarda tedavi stratejilerinin belirlenmesi için direnç mutasyonlarının araştırılması gerektiği rapor edilmiştir.

Aydoğan ve ark¹²⁴. Ankara'da Eylül 2009-2010 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada KHB tanısı ile takip edilen, bir yıl veya daha uzun süre LAM tedavisi alan 71 hastada DNA dizi analizi (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) ve ters hibridizasyon temeline dayalı Line Prob (LiPA) yöntemleri (Inno-Lipa HBV DRv2 ve Inno-Lipa HBV DRv3, Innogenetics, Belgium) ile HBV ilaç direnci mutasyonlarının araştırılması ve iki yöntemin performanslarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Düşük HBV DNA düzeyinden (ortalama 204.6 IU/mL) dolayı 20 hastada amplifikasyon işlemi ve dizi analizi işlemi gerçekleştirilmemiştir. LiPA yöntemi ile ise tüm hasta örneklerine uygulanan konsensus PCR pozitif örnekler çalışmaya alınmıştır. Bu nedenle dizi analizi ile 51 hasta örneği ve LiPA testleri ile 56 hasta örneği değerlendirilmiştir. Dizi analizi ile hastaların %25.5'inde (13/51), LiPA testleri ile de %16'sında (9/56) dirençle ilişkili primer mutasyonlar ve onarıcı mutasyonlar saptanmıştır. Dizi analizi ile saptanan mutasyonlar; 5 (%9.8) hastada LAM direnciyle ilişkili primer mutasyonlar ve onarıcı çoklu mutasyonlar (4 hastada rtL180M+rtM204I mutasyonu ve 1 hastada rtL180M+rtM204V mutasyonu) ve 3 (%5.8) hastada LAM direnciyle ilişkili primer tekli rtM204I mutasyonu olmak üzere 8 hastada (%15.6) LAM direnci bulunmuştur. LAM direnciyle ilişkili çoklu mutasyonu olan 1 (%1.9) hastada ETV direnciyle ilişkili rtS202G mutasyonu ve 2 (%3.9) hastada ADV direnciyle ilişkili primer rtN236T mutasyonu tespit edilmiştir. Ayrıca 3 hastada tek başına ve 1 hastada çoklu mutasyona

eşlik eden ilaç direnci ile ilişkisi tam bilinmeyen rtQ215S mutasyonu görülmüştür. Inno-LiPA HBV DRv2 testi ile 9 hastanın 5'inde LAM direnciyle ilişkili primer ve onarıcı çoklu mutasyonlar (1 hastada rtM204I+rtL180M mutasyonları, 2 hastada rtL80I+rtL180M+rtM204I mutasyonları, 1 hastada rtL80I + rtM204I mutasyonları ve 1 hastada rtL80V/I+rtM204I mutasyonları) bulunmuş iken 4 hastada LAM direnciyle ilişkili primer tekli mutasyonlar (3 hastada rtM204I ve 1 hastada rtM204V) gözlenmiştir. Inno-LiPA HBV DRv3 testi ile ise LAM direnciyle ilişkili çoklu mutasyon olan 2 hastada ETV direnciyle ilişkili iki farklı mutasyon (S202G ve TILFM184) varlığı görülmüştür. Ancak TILFM184 mutasyonuna ait olan bant zayıf pozitif olarak değerlendirilmiştir. LiPA testi ile örneklerin hiçbirinde ADV direnciyle ilişkili bir mutasyon saptanmamıştır. Çalışmada kullanılan testlerin benzer performans gösterdiği belirlenmiştir.

Alagözlü ve ark¹²⁵. LAM ve ADV tedavisi sırasında kronik HBV enfeksiyonu olan hastaların viral polimeraz geninde yaygın YMDD motif mutasyonlarının tespiti için Mart 2006 ve Ocak 2010 tarihleri arasında Sivas'da yaptıkları çalışmada, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran 24'ü erkek 17'si kadın yaşları 34 ile 68 arasında değişen tek başına veya kombine LAM ve ADV tedavisi alan 41 kronik B hastasına ait serum örneklerinde HBV ilaç direnci tespiti için line probe assay (LiPA HBV DR v2 Innogenetics N.V, Ghent, Belgium) ve dizi analizi yapmıştır. LAM, ADV ve/veya kombine ilaç direncine sebep olan çeşitli mutasyonlar 17 (%41.5) hastada tespit edilmiştir. Mutasyon bulunan 8 (%19.5) hastada LAM'e direnç veren rtM204V/I/A mutasyonu bulunmuştur. Üç (%7.5) mutantda da ADV'e direnç veren ve iki baz değişimi olan rtG215H gözlenmiştir. Altı (%14.6) mutantda direnç ile ilişkili kompensatuvar rtL180M mutasyonu bildirilmiştir. Üç (%7.5) mutantda ADV ve LAM'e çoklu ilaç direnç veren rtL181V mutasyonu tespit edilmiştir. Sonuçlara göre kronik hepatit B'li hasta grubunda konvansiyonel tedavi sırasında LAM'e direnç gösteren rtM204V/I/A ve rtL180M mutasyonlarının daha fazla görüldüğü belirtilmiştir.

Avcı ve ark¹²⁶. Ankara'da, 2007 ve 2008 tarihleri arasında yaptıkları çalışmasında LAM tedavisi alan kronik HBV enfeksiyonu olan hastaların karaciğer dokusunda LAM direnci veren mutasyonların tespiti için serumlarında HBV DNA bulunmayan 14 hastadan karaciğer biyopsisi alınmıştır. Karaciğer dokusundan HBV

DNA ekstraksiyonu yapıp, TaqMan real-time PCR ile analiz edilmiştir. Toplam 14 hastanın hepsinde LAM direnci veren mutasyonlar bulunmuş olup 1 hastada rtM204V, 2 hastada rtM204V+rtL180M, 4 hastada rtM204I+rtL180M, 3 hastada rtM204I+rtM204V+rtL180M ve 4 hastada kompensatuvar tek başına rtL180M mutasyonu tespit edilmiştir.

Bozdayı ve ark.¹²⁷ Ankara’da, 2002 yılında yaptıkları çalışmada HBV DNA polimeraz geninin YMDD motifinde meydana gelen mutasyonları araştırmıştır. Kronik HBV enfeksiyonu olan ve 104 hafta LAM tedavisi alan 31 hastanın 20’si HBeAg pozitif 11’i ise HBeAg negatif idi. Hastalara ait serum örneklerinden HBV spesifik dizisi PCR testi ile amplifikasyon yapıldıktan sonra dizi analizi işlemi gerçekleştirilmiştir. Virolojik kırılma, 9 ve 18 ay arasında tedavi alan 31 hastanın 7’sinde (%22.6) belirlenmiştir. Yedi hastanın 6’sı HBeAg pozitif olup 4 (%12.9) hastada rtM204V ve rtL180M mutasyonu var iken 2 (%6.4) hastada rtM204I tespit edilmiştir. Bir (%3.2) hastada ise rt204 pozisyonunda ATG’den AGT’ye değişim; T’den G’ye ve G’den T’ye 2 baz değişimi olup metioninden serine (YMDD’den YSDD’ye değişim) dönüşmüştür. Bu farklı DNA polimeraz mutasyonu LAM tedavisinin 18. ayında belirlenmiştir. Ayrıca bu yeni suş rtL180M mutasyonuna da sahiptir ve pre-S1 bölgesinde 43-54 nükleotidleri arasında 12 baz çiftlik bir eksiklik bulunmuştur. YSDD mutasyonu LAM tedavisi kesildikten 6 ay sonra da halen varlığını sürdürmüştür. Sonuç olarak, rtL180M mutasyonu ile birlikte YMDD motifinde metioninden valine ve metioninden löisine değişimin yanı sıra, in vivo ve in vitro koşullarda LAM direnci veren rt204 pozisyonunda metioninden serine olan değişikliğin LAM tedavisi sırasında ortaya çıkabildiği bildirilmiştir.

Arslan ve ark.¹²⁸ Konya’da, Kasım 2006 ve Mart 2007 yılında yaptıkları çalışmada LAM tedavisine cevap vermeyen 20 kronik hepatit B’li vakada YMDD motif değişiklikleri Inno-LiPA yöntemi (Inno-LiPA HBV DR; Innogenetics N.V., Ghent, Belgium) ile incelenmiştir. Örneklerin 12 (%60)’sinde YMDD motif değişikliği belirlenmiş olup bu örneklerin 11 (%91.6)’inde YMDD değişikliği ve wild tip kombinasyonu birlikte tespit edilmiştir. YMDD motif değişikliği olan 12 örneğin 8 (%66.6)’inde rtL180M bulunurken 4 (%33.4) örnekte ise YVDD tek başına olup kompensatuvar mutasyon rtL180M eşlik etmemiştir. YMDD+YVDD kombinasyonu 6 örnekte belirlenirken YMDD+YIDD kombinasyonu sadece bir örnekte ve

YMDD+YVDD+YIDD karma kombinasyonu ise dört örnekte saptanmıştır. LAM tedavisi sırasında olguların fenotipik direnç göstermelerini beklemeden genotipik direncin tespit edilmesi ve tedaviye erken dönemde ADV eklenmesinin mutant suş ile hepatit gelişmesini önleyebileceği ve bu sebeple LAM tedavisi alan tüm kronik hepatit B'li hastalarda LAM direncinin yakından takip edilmesi gerektiği belirtilmiştir.

Kronik HBV enfeksiyonu sebebiyle Kasım 2013 ve Mayıs 2014 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı ve Gastroenteroloji Bilim Dalı'na başvuran 17 yaş ve üstündeki 89'u tedavi almayan (naif), 48'i tedavi alan toplam 137 hastadan alınan serum örneklerinde HBV ilaç direnci mutasyonlarının pyrosequencing metodu ile tespiti için yaptığımız bu çalışmada hastaların 85'i erkek, 52'si kadındı. Erkeklerin kadınlara oranı 1.63 idi. Antiviraller ile tedavi alan ve almayan toplam 137 hastanın cinsiyet dağılımına bakıldığında hepatit B tedavisi için ilaç alan 48 (%35) hastanın 30'u (%62.5) erkek ve 18'i (%37.5) kadındı. Tedavi almayan 89 (%65) hastanın 55'i (%61.8) erkek ve 34'ü (%38.2) kadındı. Erkek hastaların yaş ortalaması 44.1 iken kadın hastaların yaş ortalaması 39.1 idi. Toplam 137 hastanın yaş ortalaması ise 42.6 idi. Serum örneklerin 82'si (%59.9) gastroenteroloji polikliniğinden, 55'si (%40.1) enfeksiyon hastalıkları polikliniğinden gönderildi.

Pyrosequencing metodu ile LAM, TEL, ETV, ADV ve TDF'e karşı HBV ilaç direnci mutasyonları araştırılan serum örneklerinde tedavi almayan (naif) 1 (%1.1) hastada TDF'e karşı duyarlılığı azaltan rtA194T mutasyonu tespit edildi. rtA194T mutasyonun ortaya çıkması TDF direnci ile ilişkilidir. Ancak bu mutasyonun klinik önemi hala bilinmemektedir. Bir çalışmada rtA194T polimeraz mutasyonunun kısmi TDF direnci ile ilişkili olduğu ve HBV'un replikasyonunu azalttığı bildirilmiştir¹⁰⁹.

Tedavi edilen grupta ise %8.3 (4 hasta) oranında HBV ilaç direnci bulundu. Direnç görülen 4 hastanın 1 (%2.1)'i LAM (6yıl), ETV (2yıl) ve IFN (1yıl) tedavisi almakta olup bu hastada LAM ve TEL'e karşı direnç, ETV'e ise çapraz direnç gösteren rtM204I mutasyonu tespit edildi. LAM direnci veren rtM204V/I ve rtL180M değişimi taşıyan HBV suşlarının aynı zamanda ETV'e karşı da çapraz direnç gösterdiği bildirilmiştir⁸⁹.

LAM (5yıl), ADV (1yıl) ve IFN (6ay) ile tedavi alan 1 (%2.1) hastada sekonder kompensatuvar mutasyon olan rtL180M ve LAM (5yıl), ADV (1.5yıl), TDF (4ay) ve IFN (2yıl) tedavisi verilen diğer 1 (%2.1) hastada da yine aynı şekilde kompensatuvar mutasyon olan rtL180M tek başına bulundu. Sadece rtL180M varlığı çok düşük direnç ile ilişkili olup genellikle rtM204V/I mutasyonu olan suşlarda sonradan gelişen onarıcı bir mutasyondur. Böylece çalışmamızda tedavi alan 48 hastanın 1'inde (%2.1) primer mutasyon rtM204I ve 2'sinde (%4.2) tek başına rtL180M olmak üzere toplam 3 (%6.3) hastada LAM direnci ile ilişkili mutasyon bulunmuştur.

LAM (5yıl) ile tedavi alan 1 (%2.1) hastada ise ETV karşı ilaç direnci gösteren rtT184S ile birlikte rtM204V mutasyonun varlığı bulundu. Kompensatuvar mutasyon rtL180M olmadan tek başına rtM204V bazı çalışmalarda bildirilmiş olup bu tip vakalarda onarıcı rtL180M mutasyonu sonradan gelişebilir¹²⁶. ETV'e karşı ilaç direnci hiçbir nüklez(t)id analogu tedavisi almayan hastalarda 4 yıllık tedaviden sonra %1'den daha az oranda gözlenmiştir. ETV, dirence yüksek genetik bariyer gösterir ve HBV DNA replikasyonunu baskılayan ETV direnci için HBV revers transkriptazda üç değişim gerekir. Bu üç değişim primer LAM mutasyonları rtM204V ve rtL180M'e ilaveten rtT184, rtS202 veya rtM250'dir. Bu durum sadece bir veya iki primer direnç mutasyonu gerektiren LAM ve ADV direncinden farklıdır. Ancak bizim çalışma grubumuzda olduğu gibi önceden LAM tedavisi alan ve muhtemelen LAM dirençli HBV ile enfekte hastalarda direnç oranı artar. Çünkü bu popülasyonda ETV biraz daha az güçlüdür ve viral kırılma için revers transkriptazda sadece bir ilave baz değişimi gerekir ve ETV'e karşı duyarlılığın wild tip ile kıyaslandığında yaklaşık 8 katdan başlayarak 400 katdan daha fazla azaldığı tespit edilmiştir. ETV direnç mutasyonlarının ETV terapisinden önce LAM dirençli HBV popülasyonunun küçük bir oranında mevcut olduğu bulunmuştur. Bu durum LAM tedavisinin primer ETV direnç mutasyonlarını seçebildiğini gösterir. LAM dirençli HBV hastalarında rtT184, rtS202 ve rtM250 pozisyonlarında birçok ETV direnci taşıyan mutasyonlar ortaya çıkabilir. Her ne kadar hepsi yüksek düzeyde direnç vermeyebilir veya daha sonra virolojik kırılmaya sebep olabilir. ETV direnç değişiklikleri olan bütün hastalar virolojik kırılma veya primer cevapsızlık göstermeyebilir, ancak bazıları ETV direnç pozisyonlarında daha fazla değişiklikten sonra virolojik kırılmayı gösterir. Farklı ETV direnç mutasyonları olan

izolatların ETV'e duyarlılıkları değişen düzeydedir⁹. Bizim bir hastada bulduğumuz rtM204V+rtT184S mutasyon profili muhtemelen ETV'e karşı düşük duyarlılığı gösterir.

Çalışmamızda tedavi almayan 89 hastanın 1'inde (%1.1) TDF'e karşı duyarlılığı azaltan rtA194T mutasyonu bulundu. rtA194T mutasyon oranı olan %1.1'lik bulgumuz yurt dışında yapılan çalışmalardan Roma'da Salphini ve ark.'nın %0.7'lik rtA194T mutasyon oranına benzerdir¹¹². Strazburg'da Pastor ve ark. da kronik HBV enfeksiyonu olan naif 14 hastadan 1'inde rtA194T tespit etmiştir¹¹¹. Ayrıca bir hastada da ADV direnci ile ilişkili rtV214A ve rtN238T varlığı gözlenmiştir. Diğer araştırmacılar Salpini ve ark. naif hastalarda rtA181V (%0.7), rtL180M (%0.7) ve rtV173L (%1.4) ve Brezilya'da Mantovani ve ark. ise LAM direnci ile ilişkili rtM204V+rtL180M (%2.9) ve diğer rtL80F, rtL80V, rtL82V+rtV207L, rtT128P, rtT128N/S ve rtS219A gibi kompensatuvar mutasyonları (%26.4) naif hepatit B hastalarında bulmuştur^{112,113}.

Ülkemizde yapılan çalışmalardan Kocaeli'nde Sayan ve ark. tedavi verilmeyen 88 kronik hepatit B hastasının %34'ünde (30) ilaç direnci mutasyonu bulmuştur¹¹⁴. rtA194T 2 hastada %2.2 oranında olup bizim %1.1'lik rtA194T oranımızdan yüksektir. Bir hastada da rtN236T (%1.1) tespit edilmiştir. Aynı araştırmacıların yaptıkları diğer bir çalışmada ise kronik hepatit B hastası olan naif 94 hemodiyaliz hastasının %30'unda (28) primer direnç mutasyonları ve %52'sinde (49) kompensatuvar direnç mutasyonları bulunmuştur¹¹⁵. TDF direnci ile muhtemel ilişkili rt194S/X/T mutasyonu hastaların %3'ünde (%3) belirlenmiş olup bizim %1.1'lik rtA194T oranımızdan yüksektir. Ankara'da Ergünay ve ark. ise kronik HBV enfeksiyonu olan naif 42 hastada muhtemel TDF direnci veren rtA194V mutasyonunu %3.3 oranında bulmuş olup yine bizim %1.1'lik oranımızdan yüksektir. Ayrıca Ergünay ve ark. naif hastaların %3.3'ünde ETV ve LAM (rtS202G, rtM204V, rtL180M, rtT184N) ve %3.3'ünde muhtemel LAM ve ADV (rtL180P, rtA181Q) direnç mutasyonlarını tespit etmiştir¹¹⁶.

Çalışmamızda tedavi alan 48 hastanın 1'inde (%2.1) primer mutasyon rtM204I ve 2'sinde (%4.2) tek başına onarıcı kompensatuvar mutasyon rtL180M olmak üzere toplam 3 (%6.3) hastada LAM direnci ile ilişkili mutasyon bulunmuştur. LAM direnci ile ilişkili %6.3'lük bulgumuz yurt dışında yapılan çalışmalardan Çin'de Wen ve ark.'nın bildirdiği %69.7, Hong kong'da Wong ve ark.'nın %52.9 ve Kaliforniya'da Margeridon-Thermet ve ark.'nın %17.3'lük bulgulardan oldukça düşüktür¹¹⁷⁻¹¹⁹. Wen

ve ark. izole rtM204I mutasyon oranını %29.2 olarak bildirirken bizim çalışmamızda %2.1 bulunmuştur. Çalışmamızda %4.2 oranında sadece rtL180M onarıcı mutasyon tespit edilmiştir. Benzer şekilde Tuma ve ark. HIV ve HBV ile enfekte hastalarda %2.7 oranında tek başına rtL180M bulmuştur ve diğer kompensatuvar mutasyonlar rtL80V ve rtV173L ise herbiri %1.4 oranında görülmüştür¹²⁰.

Bu çalışmada rtM204V+ rtT184S'e bağlı ETV direnç oranı %2.1 olup Wong ve ark.'larının bildirdiği rtT184I/S mutasyonuna bağlı toplam %1.9'luk oranına yakın, ancak 4 hastada rtM204V+rtL180M+rtS202G ve 1 hastadaki rtM204V+rtL180M+rtT184I/S mutasyonlarına bağlı toplam 5 hastada görülen %9.8'lik orandan düşüktür¹¹⁸.

Tedavi alan kronik hepatit B'li hastalarda HBV ilaç direnç oranını Wen ve ark. %69.7, Wong ve ark. %67 ve Margeridon-Thermet ve ark. %22 bulmuş olup bizim %8.3'lük oranımızdan yüksektir¹¹⁷⁻¹¹⁹.

Ülkemizde yapılan çalışmalardan HBV enfeksiyonu için antiviral tedavi verilen hastalarda LAM direnç oranlarını Konya'dan Arslan ve ark. %60, Kocaeli'den Sayan ve ark. %43, Ankara'dan Bozdayı ve ark. %22.6, Alagözlü ve ark. %19.5 ve yine Ankara'dan Aydoğan ve ark. %15.6 olarak bulmuş olup bizim %6.3 oranından oldukça yüksektir^{123-125,127,128}. Tek başına rtM204I direnç oranını Aydoğan ve ark. %5.8, Bozdayı ve ark. %6.4 olarak bildirmiş olup bizim %2.1'lik oranımızdan yüksektir^{124,127}. Sayan ve ark. bildirdiği tek başına onarıcı mutasyon rtL180M oranı %3 olup bizim %4.2'lik bulgumuza benzerdir¹²³. Avcı ve ark. HBV DNA negatif 14 kronik hepatit hastasının karaciğer biyopsi örneklerinden 4 (%28.6)'ünde tek başına rtL180M ve 10 (%71.4)'unda LAM direnç oranı tespit etmişlerdir¹²⁶.

ETV direnç insidansı Sayan ve ark.'nın çalışmasında (2007-2008) onarıcı mutasyonlarla birlikte rtT184A/S'e bağlı %4.5, yine aynı araştırmacıların başka bir çalışmasında (2007-2010) %5 oranında olup (%4'ü rtT184A/I/S ve %1'i rtS202G'e bağlı) bizim rtT184S ile ilişkili %2.1'lik direnç oranımızdan biraz yüksektir^{122,123}. Ankara'da Aydoğan ve ark.'nın bildirdiği rtS202G ile ilişkili ETV direnç oranı %2 olup bizim %2.1'lik ETV direnç oranımıza benzerdir¹²⁴.

Tedavi alan kronik hepatit B'li hastalarda HBV ilaç direnç oranı Sayan ve ark. %63, Aydoğan ve ark. %25.5 ve Bozdayı ve ark. %22.6 tespit etmiş olup bizim %8.3'lük oranımızdan yüksektir^{122,124,127}.

Çalışma grubumuzda HBV ilaç direnci mutasyonlarının diğer çalışmalardakine göre %8.3'lük bir oranla düşük olması tedavi verilen hastaların doğru seçimi ve uygun tedavi kombinasyonunun uygulanmasına bağlı olabilir. Toplam 48 hastadan 11 (%22.9)'i tek başına TDF ve 12 (%25)'si TDF ile birlikte LAM ± ADV ± ETV ± IFN almış olup toplam 23 (%47.9) hastaya TDF verilmiştir. ETV ise 8 (%16.6) hastanın tedavisinde ilk verilen ilaç olmuştur. İlaç direnci için genetik bariyeri düşük olan ve tedavide ilk ilaç olarak genellikle önerilmeyen LAM ise sadece tek başına 11 (%22.9) hastada verilmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı ve Gastroenteroloji Bilim Dalı'na Kasım 2013 ve Mayıs 2014 tarihleri arasında başvuran kronik hepatit B enfeksiyonu olan hastalarda LAM, ETV, TEL, ADV ve TDF ilaçlarına karşı HBV ilaç direnci gen mutasyonlarının tespiti için yapılan çalışmanın sonuçları;

1. Çalışma grubunu 89'u tedavi almayan (naif), 48'i ise tedavi alan hastalar idi.
2. Toplam 137 hastanın 85'i (%62) erkek, 52'si (%38) kadındı. Erkeklerin kadınlara oranı 1.63 idi. Antiviraller ile tedavi alan ve almayanların toplam 137 hastanın cinsiyet dağılımına bakıldığında hepatit B tedavisi için ilaç alan 48 (%35) hastanın 30'u (%62.5) erkek ve 18'i (%37.5) kadındı. Tedavi almayan 89 (%65) hastanın 55'i (%61.8) erkek ve 34'si (%38.2) kadındı.
3. Yaşları 17 ile 77 arasında değişen toplam 137 hastanın yaş ortalaması ise 42.6 idi. Erkek hastaların yaş ortalaması 44.1 iken kadın hastaların yaş ortalaması 39.1 idi.
4. Serum örneklerinin 82'si (%59.9) gastroenteroloji polikliniğine, 55'si (%40.1) enfeksiyon hastalıkları polikliniğine başvuran hastalara aitti.
5. Tedavi almayan (naif) 1 (%1.1) hastada TDF'e karşı duyarlılığı azaltan rtA194T mutasyonu tespit edilmiştir.
6. Tedavi alan 4 hastada direnç bulunan grupların 1 (%2.1)'inde LAM ve TEL'e karşı direnç ve ETV'e ise çapraz direnç gösteren rtM204I mutasyonu, 2 (%4.2)'sinde sekonder kompensatuvar mutasyon olan rtL180M, ve 1 (%2.1)'inde ETV'e karşı ilaç direnci gösteren rtT184S ile birlikte rtM204V mutasyonun varlığı görülmüştür.

Sonuç olarak, HBV ilaç direnci mutasyonlarının insidansı tedavi alan hasta grubunda %8.3 ve tedavi almayan grupta %1.1 olarak bulunmuştur. Kronik hepatit B virus enfeksiyonu olan hastalarda tedavi öncesi ve sırasında pyrosequencing metodu ile HBV direnç mutasyonlarının erken tanısı yapılarak zamanında uygun antiviral tedavinin planlanması hastanın tedavi yönetimine önemli katkı sağlayacaktır. Böylece gereksiz ilaç kullanımının azaltılması ve hastalığın etkin tedavisiyle hepatit B'ye bağlı siroz ve karaciğer kanseri gibi ileri komplikasyonlar engellenmiş olur.

7. KAYNAKLAR

1. **Goldstein ST, Zhou F, Hadler SC.** A mathematical model to estimate global hepatitis disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol*, **2005**; 34:1329-39.
2. **Ayub A, Ashfaq UA, Haque A.** HBV induced HCC: major risk factors from genetic to molecular level. *Biomed Res Int*, **2013**; 810-461.
3. **Koziel MR, Thio CL.** Hepatitis B virus and hepatitis D virus, principles and practice of infectious diseases, 7. Edition USA, *Churchill-Livingstone*, **2010**; 2059-2087.
4. **Bowden S.** Serological and molecular diagnosis. *Semin Liver Dis*, **2006**; 26(2):97-103.
5. **Deng L, Tang H.** Hepatitis B virus drug resistance to current nucleos(t)ide analogs: Mechanisms and mutation sites. *Hepatology Research*, **2011**; 41:1017–1024.
6. **Yuen MF, Seto WK, Chow DH.** Long-term lamivudine therapy reduces the risk of long-term complications of chronic hepatitis B infection even in patients without advanced disease. *Antivir Ther*, **2007**; 1295–1303.
7. **Villet S, Pichoud C, Billioud G.** Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure. *J Hepatol*, **2008**; 48:747–55.
8. **Fung J, Lai CL, Seto WK, Yuen MF.** Nucleoside/nucleotide analogues in the treatment of chronic hepatitis B. *J Antimicrob Chemother*, **2011**; 66:2715–2725.
9. **Baldick CJ, Tenney DJ, Mazzucco CE.** Comprehensive evaluation of hepatitis B virus reverse transcriptase substitutions associated with entecavir resistance. *Hepatology*, **2008**; 47:1473–82.
10. **Liaw YF, Gane E, Leung N.** 2-year GLOBE trial results: Telbivudine is superior to lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, **2009**; 136:486–95.
11. **Gane EJ, Wang Y, Liaw YF.** Efficacy and safety of prolonged 3-year telbivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Liver Int*, **2011**; 31:676–84.
12. **Seto WK, Lai CL, Fung J.** Significance of HBV DNA levels at 12 weeks of telbivudine treatment and the 3 years treatment outcome. *J Hepatol*, **2011**; 55:522–8.

13. **Sheldon J, Camino N, Rodes B.** Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. *Antivir Ther*, **2005**; 10:727–34.
14. **Gerlich WH.** Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology Journal*, **2013**; 10:239-245.
15. **Strauss JH, Strauss EG.** Viruses and human disease, 2ed.Ed.,Oxford,UK: *Elsevier Academic Press*, **2008**: 249.
16. **Doo EC, Ghany MG.** Hepatitis B virology for clinicians. *Clin Liver Dis*, **2010**; 14:397–408.
17. **Seeger C, Mason WS.** Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol Biol*, **2000**; 64(1):51.
18. **Glebe D, Bremer CM.** The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis*, **2013**; 33(2):103-12.
19. **Beck J, Nassal M.** Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol*, **2007**; 13(1):48–64.
20. **Echevarría JM, Avellón A.** Hepatitis B virus genetic diversity. *J Med Vir*, **2006**; 78:36-42.
21. **Chevaliez S, Pawlotsky JM.** Virological tools in hepatitis B virus infection. *Eur Infect Dis*, **2007**; 1:58–60.
22. **Kew MC.** Hepatitis B virus X protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, **2011**; 26(1):144–152.
23. **Lucifora J, Arzberger S, Durantel D.** Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol*, **2011**; 55(5):996–1003.
24. **Schulze A, Gripon P, Urban S.** Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology*, **2007**; 46(6):1759–1768.
25. **Ganem D, Prince AM.** Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, **2004**; 350:1118-1129.
26. **Jayalakshmi MK, Kalyanaraman N, Pitchappan R.** Hepatitis B virus genetic diversity: Disease pathogenesis. *Immunology and Microbiology*, **2013**; 3017-5772.
27. **Milich DR, Chen MK, Hughes JL,** The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid:a mechanism for persistence. *J Immunol*, **2013**; 160(4):-21.
28. **Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S.** Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci*, **2006**; 97(10):977-83.

29. **Pazienza V, Niro GA, Fontana R, Vinciguerra M, Andriulli A.** Advance in molecular diagnostic tools for hepatitis B virus detection. *Clin Chem Lab Med*, **2013**; 51(9):1707-17.
30. **Locarnini S, Zoulim F.** Molecular genetics of HBV infection. *Antiviral Therapy*, **2010**; 15:(3)14.
31. **Rabe B, Vlachou A, Pante N, Helenius A, Kann M.** Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2003**; 100:9849-9854.
32. **Belloni L, Pollicino T, De Nicola F.** Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2009**; 106:19975-19979.
33. **Taylor JM.** Virus entry mediated by hepatitis B virus envelope proteins. *World J Gastroenterol*, **2013**; 19(40):6730-4.
34. **Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Kurbanov F, Van Ranst M, Tacke F.** Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: Revised classification hurdles and updated resolutions. *World J Gastroenterol*, **2014**; 20(23):7152-7168.
35. **Kim BK, Revill PA, Ahn SH.** HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. *Antivir Ther*, **2011**; 16(8):1169-86.
36. **Liu CJ, Kao JH.** Global perspective on the natural history of chronic hepatitis B: role of hepatitis B virus genotypes A to J. *Semin Liver Dis*, **2013**; 33(2):97-102.
37. **Rodriguez-Frias F, Buti M, Tabernero D, Homs M.** Quasispecies structure, cornerstone of hepatitis B virus infection: mass sequencing approach. *World J Gastroenterol*, **2013**; 19(41):6995-7023.
38. **Shen T, Yan XM.** Hepatitis B virus genetic mutations and evolution in liver diseases. *World J Gastroenterol*, **2014**; 20(18):5435-41.
39. **Lazarevic I.** Clinical implications of hepatitis B virus mutations: Recent advances. *World J Gastroenterol*, **2014**; 20(24):7653-7664.
40. **Locarnini S.** Molecular virology of hepatitis B virus. *Seminars in Liver Disease*, **2004**; 24(1):3-10.
41. **Jung M, Pape G.** Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis*, **2002**; 2:43–50.
42. **Hunt CM, McGill JM, Allen MI.** Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology*, **2000**; 31:1037–1044.
43. **Tong S, Li J, Wands JR, Wen YM.** Hepatitis B virus genetic variants: biological properties and clinical implications. *Emerging Microbes and Infections*, **2013**; 2:1751-2222.

44. **Liang T, Chen EQ, Tang H.** Hepatitis B virus gene mutations and hepatocarcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev*, **2013**; 14(8):4509-13.
45. **Guerrieri F, Belloni L, Pediconi N, Levrero M.** Molecular mechanisms of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *Semin Liver Dis*, **2013**; 33(2):147-56.
46. **Lok ASF, Hussain M.** Mutations in the hepatitis B virus polymerase gene associated with antiviral treatment for hepatitis B. *J Viral Hepat*, **1999**; 31(6):1318-1326.
47. **Liaw YF, Chu CM.** Hepatitis B virus infection. *Lancet*, **2009**; 373(9663):582-92.
48. **Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF.** Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol*, **2010**; 58(4): 258–266.
49. **Baumert TF, Thimme R, Von Weizsäcker F.** Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, **2007**; 13(1): 82-90.
50. **Busca A, Kumar A.** Innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection. *HCC Virol J*, **2014**; 11:22.
51. **Bertoletti A, Tan AT, Gehring AJ.** HBV-specific adaptive immunity viruses. **2009**; 1(2):91–103.
52. **Barton GM.** Viral recognition by Toll-like receptors. *Semin Immunol*, **2007**; 19(1):33–40.
53. **Wu J, Meng Z, Jiang M, Pei R, Trippler M, Broering R, Bucchi A, Sowa JP, Dittmer U, Yang D, Roggendorf M, Gerken G, Lu M, Schlaak JF.** Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology*, **2009**; 49(4):1132–1140.
54. **Das A, Maini MK.** Innate and adaptive immune responses in hepatitis B virus infection. *Dig Dis*, **2010**; 28(1):126-32.
55. **Orenbuch-Harroch E, Levy L, Ben-Chetrit E.** Acute hepatitis B or exacerbation of chronic hepatitis B-that is the question. *World J Gastroenterol*, **2008**; 14(46):7133-7.
56. **Elgouhari HM, Abu-Rajab Tamimi TI, Carey WD.** Hepatitis B virus infection: understanding its epidemiology, course, and diagnosis. *Cleve Clin J Med*, **2008**; 75(12):881-9.
57. **Shi YH, Shi CH.** Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, **2009**; 15(25): 3099-3105.
58. **Yim HJ, Lok AS.** Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology*, **2006**; 43(2):173-181.

59. **Sharma SK, Saini N, Chwla Y.** Hepatitis B virus: inactive carriers. *J Virol*, **2005**; 2:82.
60. **McMahon BJ.** Chronic hepatitis B virus infection. *Med Clin North Am*, **2014**; 98(1):39-54.
61. **Huang CF, Lin SS, Ho YC, Chen FL, Yang CC.** The immune response induced by hepatitis B virus principal antigens. *Cell Mol Immunol*, **2006**; 3: 97-106.
62. **Lok ASF, McMahon BJ.** Chronic hepatitis B. *Hepatology*, **2007**; 45(2):507-39.
63. **Samal J, Kandpal M, Vivekanandan P.** Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. *Clin. Microbiol*, **2012**; 25(1):142.
64. **Alter M.** Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol*, **2003**; 39: 64-69.
65. **Hou J, Liu Z, Gu F.** Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *Int. J. Med. Sci*, **2005**; 2(1):50-57.
66. **Tujios SR, Lee WM.** Update in the management of chronic hepatitis B. *Curr Opin Gastroenterol*, **2013**; 29(3):250-6.
67. **Wong VW, Chan HL.** Chronic hepatitis B: a treatment update. *Semin Liver Dis*, **2013**; 33(2):122-9.
68. **Chen EQ, Tang H.** Optimization therapy for the treatment of chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol*, **2014**; 20(19):5730-6.
69. **Kao JH.** HBeAg-positive chronic hepatitis B: why do I treat my patients with pegylated interferon? *Liver Int*, **2014**; 34(1):112-9.
70. **Vlachogiannakos J, Papatheodoridis GV.** HBeAg-negative chronic hepatitis B: why do I treat my patients with pegylated interferon-alfa? *Liver Int*, **2014**; 34 (1):127-32.
71. **Barone M, Iannone A, Di Leo A.** HBsAg clearance by peg-interferon addition to a long-term nucleos(t)ide analogue therapy. *World J Gastroenterol*, **2014**; 20(26):8722-5.
72. **Wang XY, Chen HS.** Emerging antivirals for the treatment of hepatitis B. *World J Gastroenterol*, **2014**; 20(24):7707-7717.
73. **Tana MM, Ghany MG.** Hepatitis B virus treatment: management of antiviral drug resistance. *Clinical Liver Disease*, **2013**; 2(1):24-28.

74. **Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, Crowther L, Condreay LD, Woessner M, Rubin M, Brown NA. Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL.** Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med*, **1999**; 341(17):1256-1263.
75. **Osborn MK, Lok AS.** Antiviral options for the treatment of chronic hepatitis B. *J Antimicrob Chemother*, **2006**; 57(6):1030-4.
76. **Palumbo E.** Lamivudine for chronic hepatitis B: a brief review. *J Infect Dis*, **2008**; 12(5):355-7.
77. **Kim KH, Kim ND, Seong BL.** Discovery and development of anti-HBV agents and their resistance. *Molecules*, **2010**; 15(9):5878-908.
78. **Ridruejo E.** Treatment of chronic hepatitis B in clinical practice with entecavir or tenofovir. *World J Gastroenterol*, **2014**; 20(23):7169-7180.
79. **Buti M, Homs M.** Tenofovir disoproxil fumarate in the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, **2012**; 6(4):413-421.
80. **Locarnini S, Bowden S.** Drug resistance in antiviral therapy. *Clin Liver Dis*, **2010**; 14(3):439-459.
81. **Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S.** HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation. *J Hepatol*, **2006**; 44(3):593-606.
82. **Sheldon J, Soriano V.** Hepatitis B virus escape mutant induced by antiviral therapy. *J Antimicrob Chemother*, **2008**; 61:766–8.
83. **Zoulim F.** New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J Hepatol*, **2005**; 42:302–308.
84. **Locarnini S, Mason WS.** Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance. *J Hepatol*, **2006**; 44(2):422-431.
85. **Zoulim F, Locarnini S.** Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology*, **2009**; 137(5):1593-1608.
86. **Devi U, Locarnini S.** Hepatitis B antivirals and resistance. *Curr Opin Virol*, **2013**; 3(5):495-500.
87. **Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, Liaw YF, Mizokami M, Kuiken C. the hepatitis B virus drug resistance working group.** Antiviral drug-resistant HBV: Standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology*, **2007**; 46:254-265.

88. **Locarnini S, Hatzakis A, Heathcote J, Keeffe EB, Liang TJ, Mutimer D, Pawlotsky JM.** Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther*, **2004**; 9:679-693.
89. **Locarnini S.** Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure. *Hepatol Int*, **2008**; 2(2):147-151.
90. **Wang YZ, Xiao JH, Liu LG, Ye CY, Shen HY, Xu TM, Zhu KZ.** Simultaneous detection of hepatitis B virus genotypes and mutations associated with resistance to lamivudine, adefovir, and telbivudine by the polymerase chain reaction-ligase detection reaction. *J Infect Dis*, **2011**; 15(6):560-566.
91. **Song ZL, Cui YJ, Zheng WP, Teng DH, Zheng H.** Diagnostic and therapeutic progress of multi-drug resistance with anti-HBV nucleos(t)ide analogues. *World J Gastroenterol*, **2012**; 18(48):7149-57.
92. **Seifer M, Patty A, Serra I, Li B, Standring DN.** Telbivudine, a nucleoside analog inhibitor of HBV polymerase, has a different in vitro cross-resistance profile than the nucleotide analog inhibitors adefovir and tenofovir. *Antiviral Res*, **2009**; 81(2):147-155.
93. **Sayan M.** Molecular diagnosis of entecavir resistance. *Hepat Mon*, **2010**; 10(1):42-7.
94. **Lin MT, Chou YP, Hu TH, Yu HC, Hsu YC, Tsai MC, Tseng PL, Chang KC, Yen YH, Chiu KW.** Telbivudine and adefovir combination therapy for patients with chronic lamivudine-resistant hepatitis B virus infections. *Arch Virol*, **2014**; 159(1):29-37.
95. **Kim JH, Park YK, Park ES, Kim KH.** Molecular diagnosis and treatment of drug-resistant hepatitis B virus. *World J Gastroenterol*, **2014**; 20(19):5708-5720.
96. **Servoss JC, Friedman LS.** Serologic and molecular diagnosis of hepatitis B virus. *Infect Disease Clin N Am*, **2006**; 20(2):47-61.
97. **Servoss JC, Freidman LS, Dienstag JL.** Diagnostic approach to viral hepatitis. In: Thomas HC, Lemon B, Zucherman AJ, editors. *Viral Hepatitis*, **2005**; 50-64.
98. **Kao JH.** Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers. *Gastroenterol Hepatol*, **2008**; (4):553-62.
99. **Sablon E, Shapiro F.** Advances in molecular diagnosis of HBV infection and drug resistance. *Int J Med Sci*, **2005**; 2(1):8-16.
100. **Hong SP, Kim NK, Hwang SG, Chung HJ, Kim S, Han JH.** Detection of hepatitis B virus YMDD variants using mass spectrometric analysis of oligonucleotide fragments. *J Hepatol*, **2004**; 40(5):837-844.

101. Metzker ML. Sequencing technologies—the next generation. *Nat Rev Genet*, **2010**; 11(1):31–46.
102. Beerenwinkel N, Zagordi O. Ultra-deep sequencing for the analysis of viral populations. *Curr Opin Virol*, **2011**; 1(5):413–418.
103. Radford AD, Chapman D, Dixon L, Chantrey J, Darby AC, Hall N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J Gen Virol*, **2012**; 93(9):1853–1868.
104. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*, **2012**; 30(5):434–439.
105. Reuman EC, Margeridon-Thermet S, Caudill HB, et al. A classification model for G-to-A hypermutation in hepatitis B virus ultradeep pyrosequencing reads. *Bioinformatics*, **2010**; 26(23):2929–2932.
106. Lindström A, Odeberg J, Albert J. Pyrosequencing for detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus. *J Clin Microbiol*, **2004**; 42(10):4788–95.
107. Aspinall EJ, Hawkins G, Fraser A, Hutchinson SJ, Goldberg D. Hepatitis B prevention, diagnosis, treatment and care *Occup Med*, **2011**; 61(8):531–40.
108. Cainelli F. Hepatitis B: Epidemiology and prevention in developing countries. *World J Hepatol*, **2012**; 4(3): 74–80.
109. Qin B, Budeus B, Cao L, Wu C, Wang Y, Zhang X, Rayner S, Hoffmann D, Lu M, Chen X. The amino acid substitutions rtP177G and rtF249A in the reverse transcriptase domain of hepatitis B virus polymerase reduce the susceptibility to tenofovir. *Antiviral Res*, **2013**; 97: 93–100.
110. Kitrinos KM, Corsa A, Liu Y, Flaherty J, Snow-Lampart A, Marcellin P, Borroto-Esoda K, Miller MD. No detectable resistance to tenofovir disoproxil fumarate after 6 years of therapy in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*, **2014**; 59(2):434–442.
111. Pastor R, Habersetzer F, Fafi-Kremer S, Doffoël M, Baumert TF, Gut JP, Stoll-Keller F, Schvoerer E. Hepatitis B virus mutations potentially conferring adefovir/tenofovir resistance in treatment-naïve patients. *World J Gastroenterol*, **2009**; 15(6):753–755.
112. Salpini R, Svicher V, Cento V, Gori C, Bertoli A, Scopelliti F, Micheli V, Cappiello T, Spanò A, Rizzardini G, De Sanctis GM, Sarrecchia C, Angelico M, Perno CF. Characterization of drug-resistance mutations in HBV D-genotype chronically infected patients, naïve to antiviral drugs. *Antiviral Research*, **2011**; 92(2):382–385.
113. Mantovani N, Cicero M, Santana LC, Silveira C, Do Carmo EP, Abrão PR, Diaz RS, Caseiro MM, Komninakis SV. Detection of lamivudine-resistant variants and mutations related to reduced antigenicity of HBsAg in individuals from the cities of Santos and São Paulo, Brazil. *Virol J*. **2013**; 10:320.

114. **Sayan M, Akhan SC, Meric M.** Naturally occurring amino-acid substitutions to nucleos(t)ide analogues in treatment naive Turkish patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat*, **2010**; 17(1):23-7.
115. **Sayan M, Cavdar C, Dogan C.** Naturally occurring polymerase and surface gene variants of hepatitis B virus in Turkish hemodialysis patients with chronic hepatitis B. *Jpn J Infect Dis*, **2012**; 65(6):495-501.
116. **Ergünay K, Aksoy EK, Şimşek H, Alp A, Şener B, Tatar G, Us D, Haşçelik G.** Tedavi naif kronik hepatit B olgularında bazal antiviral direncin araştırılması *Mikrobiyol Bul*, **2013**; 47(4): 628-63.
117. **Margeridon-Thermet S, Svarovskaia ES, Babrzadeh F, Martin R, Liu TF, Pacold M, Reuman EC, Holmes SP, Borroto-Esoda K, Shafera RW.** Low-level persistence of drug resistance mutations in hepatitis B virus-infected subjects with a past history of lamivudine treatment. *Antimicrob Agents Chemother*, **2013**; 57(1):343.
118. **Wong VW, Wong GL, Tse CH, Yuen LK, Chan HY, Locarnini S, Chan HL.** Antiviral drug resistance testing in patients with chronic hepatitis B. *Dig Dis Sci*, **2012**; 57(1):221–231.
119. **Wen J, Zhao W, Jiang S, Fang Z.** Clinical application of pyrosequencing in detection of YMDD mutations *Labmedicine*, **2008**; 39:218-222.
120. **Tuma P, Pineda JA, Labarga P, Vidal F, Rodriguez C, Poveda E, Santos J, Gonzalez-García J, Sobrino P, Tural C, Soriano V.** HBV primary drug resistance in newly diagnosed HIV-HBV-coinfected individuals in Spain. *Antivir Ther*, **2011**; 16(4):585-9.
121. **Ciftci S, Keskin F, Cakiris A, Akyuz F, Pinarbasi B, Abaci N, Dincer E, Badur S, Kaymakoglu S, Ustek D.** Analysis of potential antiviral resistance mutation profiles within the HBV reverse transcriptase in untreated chronic hepatitis B patients using an ultra-deep pyrosequencing method. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2014**; 79(1):25-30.
122. **Sayan M, Hülagüz S, Akhan SÇ, Şentürk Ö, Meriç M, Çekmen M.** Lamivudin tedavisi uygulanmış ve entekavir naif kronik hepatit b'li hastalarda entekavir ilaç direnci. *Mikrobiyol Bul*, **2009**; 43: 425-432.
123. **Sayan M, Akhan SC, Senturk O.** Frequency and mutation patterns of resistance in patients with chronic hepatitis B infection treated with nucleos(t)ide analogs in add-on and switch strategies. *Hepat Mon*, **2011**; 11(10):835-42.
124. **Aydoğan S, Ergünay K, Balaban Y, Alp A, Şimşek H, Tatar G, Haşçelik G, Us D.** Bir yıldan uzun süreli antiviral ilaç kullanan kronik hepatit B hastalarında direnç mutasyonlarının saptanması. *Mikrobiyol Bul*, **2013**; 47(3):472-481.
125. **Alagozlu H, Ozdemir O, Koksall B, Yilmaz A, Coskun M.** Prevalence of common YMDD motif mutations in long term treated chronic HBV infections in a Turkish population. *Asian Pac J Cancer Prev*, **2013**; 14(9):5489-94.

126. Avcı İY Eyigün, CP, Günal E, Kubar A, Gül HC, Coşkun Ö, Erdem H, Görenek L, Beşirbellioğlu BA. Demonstration of mutations conferring resistance to lamivudine in liver tissue of chronic hepatitis B patients under lamivudine therapy. *Turk J Med Sci*, **2013**; 43(2):199-202.
127. Bozdayi AM, Uzunalımoğlu O, Türkyılmaz AR, Aslan N, Sezgin O, Sahin T, Bozdayi G, Cinar K, Pai SB, Pai R, Bozkaya H, Karayalçın S, Yurdaydin C, Schinazi RF. YSDD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J Viral Hepat*, **2003**; 10(4):256-65.
128. Arslan U, Ural O, Findik D. Lamivudin tedavisi alan kronik hepatit B olgularında INNO-LiPA HBV DR yöntemi ile saptanan YMDD motif değişiklikleri *Mikrobiyol Bul*, **2008**; 42(3):445-50.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kayseri’de 1989 yılında doğdu. Liseyi Kocasinan Yabancı Dil Ağırlıklı Süper Lisesi’nde tamamladı. Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2012 yılında mezun olduktan sonra Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında eğitim almaya başladı.