

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK
MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**KARACİĞER TRANSPLANT ALICILARINDA
HBV DNA MUTASYONLARININ
ENFEKSİYONUN NÜKSÜNDEKİ ROLÜ**

DR. EMRAH BAŞKAYA

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK
MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**KARACİĞER TRANSPLANT ALICILARINDA
HBV DNA MUTASYONLARININ
ENFEKSİYONUN NÜKSÜNDEKİ ROLÜ**

DR. EMRAH BAŞKAYA

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI:

PROF.DR. A. ARZU SAYINER

TEŐEKKÖR

Tezimin her aŐamasında yakın ilgisini ve yardımlarını gördüğüm danışmanım Prof.Dr. Arzu SAYINER'e, eğitim hayatıma yön veren Prof.Dr. Hakan ABACIOĐLU'na ve yetişmemde emekleri olan tüm hocalarıma saygılarımı sunarım. Tezimle ilgili katkılarından dolayı Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr. Sedat KARADEMİR'e ve Dr. Aylin BACAĞOĞLUNA'na; destekleri için aileme ve sevgili arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Dr. Emrah BAŞKAYA

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ.....	iii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. Hepatit B virüsünün yapısı ve sınıflandırması.....	6
4.2. HBV genom yapısı.....	6
4.3. HBV'nin kodladığı proteinler.....	7
4.3.1. Yüzey (Zarf) Proteinleri.....	8
4.3.2. Kor proteinleri.....	8
4.3.3. P proteini.....	9
4.3.4. X proteini.....	9
4.4. Subtip ve genotipler.....	9
4.5. HBV replikasyon döngüsü.....	10
4.6. HBV enfeksiyonunun klinik seyri.....	11
4.6.1. Akut ve Kronik Hepatit.....	11
4.6.2. Siroz ve hepatoselüler karsinom (HCC).....	13
4.7. Hepatit B virüs varyantları.....	13
4.7.1. Precore ve core-promoter varyantları.....	13
4.7.2. Anti-viral dirençli HBV mutantları.....	14
4.7.2.1. Lamivudine.....	14
4.7.2.2. Adefovir dipivoxil.....	14
4.7.2.3. Entecavir.....	14
4.7.2.4. Telbivudine.....	15
4.7.2.5. Tenofovir.....	15
4.7.3. Yüzey antijeni varyantları.....	16
4.7.4. Pre S varyantları.....	17
4.8. HBV ve karaciğer transplantasyonu.....	17
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19

5.1.	Gereç.....	19
5.1.1.	Çalışma grubu.....	19
5.1.2.	Plazmaların saklanması.....	19
5.1.3.	Ayraçlar.....	19
5.1.3.1.	Viral nükleik asit ekstraksiyon kiti	19
5.1.3.2.	Polimeraz enzimi.....	19
5.1.3.3.	Kullanılan öncüller.....	20
5.1.3.4.	Agaroz jel elektroforezi için kullanılan ayraçlar	20
5.2.	Yöntem.....	21
5.2.1.	Plazma örneklerinden DNA izolasyonu.....	21
5.2.2.	PreS/S bölgesi PZT	22
5.2.2.1.	PZT protokolü.....	22
5.2.2.2.	Çift basamaklı (“nested”) PZT	22
5.2.3.	Jel elektroforezi	24
5.2.3.1.	Agaroz jel hazırlama	24
5.2.3.2.	Yükleme, yürütme.....	24
5.2.3.3.	Görüntüleme	24
5.2.4.	Dizi analizi	24
6.	BULGULAR.....	25
6.1.	Çalışma grubunun özellikleri.....	25
6.2.	PZT Sonuçları	27
6.3.	Dizi analizi	29
6.3.1.	HBsAg subtipleri	29
6.3.2.	Filogenetik analiz.....	30
6.3.3.	PreS gen bölgesi mutasyonları	31
6.3.4.	HBsAg mutasyonları.....	31
6.3.5.	RT geni mutasyonları.....	32
7.	TARTIŞMA.....	37
8.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
9.	KAYNAKLAR	48

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: HBV'nin kodladığı proteinler '	7
Tablo 2: Polimeraz geninde saptanan anti-viral ilaç direnç mutasyonlarının HBsAg üstündeki yansımaları	17
Tablo 3: PZT için kullanılan öncüller	20
Tablo 4: Dizi analizi için kullanılan öncüller	20
Tablo 5: Çalışma gurubu ile ilgili klinik ve laboratuvar bilgilerin özeti	28
Tablo 6: Çalışma olgularında S geninin dizi analizi sonucu belirlenen HBsAg subtipleri.....	29
Tablo 7: Çalışmamızdaki hastalarda saptanan S geni kaçış mutasyonları, RT geni ilaç direnç mutasyonları	33
Tablo 8: Çalışma hastalarında saptanan pre-S mutasyonları. 1 ve 11 no'lu hastalar dışında tüm hastalara ait sekansı bulunan ilk kodon olan 52. kodondan itibaren tablo hazırlanmıştır.....	34
Tablo 9: Çalışma hastalarında saptanan S geni mutasyonları	35
Tablo 10: Çalışma hastalarında saptanan rt bölgesi mutasyonları.....	36
Tablo 12: Transplantasyon sonrası HBIG + LAM tedavisi uygulanan ve ≥ 100 IU/L anti-HBs düzeyinin hedeflendiği çalışmalardaki rekürrens sayıları.....	39

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Hepatit B virüsü içeren serumun üç farklı formdaki virus partiküllerini gösteren elektron mikroskopisi görüntüsü	6
Şekil 2: HBV genom yapısı.	7
Şekil 3: Şematik görünümde “a determinantı”	8
Şekil 4: P proteinine ait bölgeler.	9
Şekil 5: Basitleştirilmiş HBV replikasyon döngüsü.	11
Şekil 6: Kronik HBV enfeksiyonunun fazları.	12
Şekil 7: RT inhibitörlerine karşı direnç gelişime yol açan mutasyonlar ve RT genindeki lokalizasyonları.	15
Şekil 8: Lamivudine, adefovir, entecavir, telbivudine, tenofovir tedavisinde gelişen kümülatif direnç oranları ve tedavi süresi ile ilişkisi.	16
Şekil 9: Bazı örneklerden elde edilen PZT sonuçları.....	27
Şekil 10: Filogenetik analiz sonuçları.....	30

KISALTMALAR

HBV: Hepatit B virusu

PZT: Polimeraz zincir tepkimesi

HCC: Hepatoselüler karsinom

HBIG: Hepatit B immün globulin

RT: Revers transkriptaz

Amino asit kısaltmaları:

A	Alanin
R	Arjinin
N	Asparajin
D	Aspartik Asit
C	Sistein
E	Glutamik asit
Q	Glutamin
G	Glisin
H	Histidin
I	İzolösin
L	Lösin
K	Lizin
M	Metyonin
F	Fenilalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Treonin
W	Triptofan
Y	Tirozin
V	Valin

1. ÖZET

Karaciğer transplant alıcılarında HBV DNA mutasyonlarının enfeksiyonun nüksündeki rolü

Dr. Emrah BAŞKAYA

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D.

İnciraltı/İzmir

Hepatit B virüsüne (HBV) bağlı son dönem karaciğer hastalığı, ülkemizde önemli bir karaciğer transplantasyonu sebebidir. HBV'ye bağlı nedenlerle karaciğer transplantasyonu uygulanan hastalarda greftin tekrar enfeksiyonu (rekürrens) mortalite ve morbiditeyi arttırması bakımından günümüzde önemini koruyan bir problemdir. Rekürrensin önlenmesi için kullanılan Hepatit B immün globulin (HBIG) ve revers transkriptaz (RT) inhibitörleri, virüs üstünde baskı oluşturmakta, virüs replikasyonunun devam etmesi durumunda bu tedavilere dirençli virüs mutantları seçilebilmektedir.

Çalışmamızda, merkezimizde karaciğer transplantasyonu sonrası rekürrens görülen ve plazma HBV DNA'sı pozitifleşen hastalardaki mutasyon profilinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için, 01/02/1997-06/08/2009 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversite Hastanesi'nde kronik HBV enfeksiyonuna bağlı komplikasyonlar nedeniyle karaciğer transplantasyonu uygulanmış ve transplantasyon sonrası HBV DNA'sı pozitifleşmiş hastalara ait plazmalar çalışmaya dahil edilmiştir. HBV'ye ait PreS/S ve bununla örtüşen RT gen bölgesi polimeraz zincir tepkimesi (PZT) ile çoğaltılarak Sanger yöntemiyle çift yönlü dizi analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları, referans dizilerle karşılaştırılarak mutasyon ve varyasyonlar belirlenmiştir.

Transplantasyon sonrasında HBV DNA pozitifleşmiş 13 hastanın beşinde (%38,5) RT geninde ilaç direnç mutasyonu, üçünde (%23,1) antikordan kaçışla ilişkili S geni mutasyonu, üçünde ise (%23,1) her iki tip mutasyon birlikte görülmüştür. İki hastada (%15,4) dirençle ilgili mutasyon saptanmamıştır. Onüç hastadan transplantasyon sonrası serum HBsAg'si pozitifleşen hastalar değerlendirildiğinde dokuz hastanın üçünde ilaç direnç mutasyonu (%33,3), üçünde kaçışla ilişkili S geni mutasyonu (%33,3), üçünde her iki tip mutasyon birlikte görülmüştür (%33,3). İlaç direnci görülen sekiz hastanın üçünde transplantasyon öncesi sekans verileri elde edilmiş, hastalarda bu dönemde de ilaç direnç mutasyonları bulunduğu saptanmıştır. Transplantasyon öncesi sekans verisi edilen diğer üç hastanın birinde

antikordan kaçıyla ilgili mutasyon görülmüş, bu mutasyonun transplantasyon öncesi de bulunduğu belirlenmiştir.

Saptanan antikordan kaçıyla ilgili mutasyonlar: sY100C, sT118K, sP120T, sT123A, sT131N, sM133L, sD144A'dır. Literatürde en sık bildirilen sG145R mutasyonuna rastlanmamıştır. Bir hastada, "a" *determinantı*'nda literatürde hakkında bilgi olmayan sN146H mutasyonu saptanmıştır.

Transplantasyon sonrası görülen ilaç direnci paternleri rtL80I + L180M + A181V + M204V; rtL180M + S202G + M204V; rtL180M + M204V; rtM204I + L80V; rtM204I + L80I; rtM204I; rtA181V'dir.

PreS2 bölgesinde iki hastada (%15,4) delesyonlar saptanmıştır. Bir hastada PreS1 bölgesinin "S promoter" CCAAT motifinde CCAAG değişimi görülmüştür.

Çalışmamızda, rekürrens görülen hastalarda saptanan antiviral direnç oranları (66.6%), benzer çalışmalarda bildirilen oranlara (47-59%) yakındır. Transplantasyon öncesi saptanan mutasyonlar, transplantasyon sonrasına da yansımaktadır. Bu nedenle, transplantasyon öncesi anti-viral ilaç kullanılmasına karşın HBV DNA pozitifliği devam eden hastalarda direnç profilinin belirlenmesi, transplantasyon sonrası uygulanacak profilaksiyi yönlendirerek rekürrensi önlemede faydalı olabilir.

Anahtar sözcükler: Hepatit B virusu, karaciğer transplantasyonu, rekürrens, mutasyon, ilaç direnci

2. **SUMMARY**

Role of HBV DNA mutations in HBV recurrence in liver transplant recipients

Dr. Emrah BAŞKAYA

Dokuz Eylül Üniversitesi Faculty of Medicine

Microbiology and Clinical Microbiology Department

İnciraltı/İzmir-TURKEY

End-stage liver disease due to HBV is an important indication for liver transplantation in Turkey. Re-infection of the graft tissue with HBV in patients who underwent orthotopic liver transplantation increases mortality and morbidity, and still remains an important problem. Hepatitis B immune globulin (HBIG) and reverse transcriptase (RT) inhibitor agents, which are used as prophylactic measures to prevent graft re-infection, exert selective pressure on the HBV virus, which may lead to selection of viral mutants that are less sensitive to treatment, resulting in HBV recurrence.

In this study, we aimed to reveal the mutation profile of HBV in liver transplant patients with recurrent HBV disease having positive plasma HBV DNA despite prophylaxis. The study population was consisted of patients who underwent orthotopic liver transplantation in Dokuz Eylül University Hospital between 01/02/1997 – 06/08/2009 with positive plasma HBV DNA in post-transplantation period. PreS/S and RT regions of HBV DNA were obtained by PCR, and amplicons were sequenced using Sanger's method. Mutations and variations were determined by comparing with reference sequences.

Sequence analysis of HBV in 13 patients who had plasma HBV DNA positivity post transplant revealed anti-viral resistance mutations in five patients (38.5%), antibody escape mutations in the S gene in three patients (23.1%), and both type of mutations in three patients (23.1%). Two patients did not show any mutations (15.4%). Nine patients had HBsAg positivity along with HBV DNA positivity in the post-transplantation period. The evaluation of patients in this group revealed anti-viral resistance mutations in three patients (33.3%), antibody escape mutations of the S gene in three patients (33.3%), and both types of mutations in three patients (33.3%). All patients had at least one type of mutation that may be attributed to recurrence. It was possible to sequence pre-transplant samples of three patients among eight who showed anti-viral resistance and the sequences showed the presence of anti-viral resistance mutations before the transplantation.

Mutations related to antibody escape found in this study are as follows: sY100C, sT118K, sP120T, sT123A, sT131N, sM133L, sD144A. One of the most frequently reported antibody escape mutations in the literature, sG145R, was not present in any of the patients. In one patient, sN146H was present within the “a” *determinant*. Search of the literature did not reveal any information about this mutation.

Resistance patterns post-transplantation period were rtL80I + L180M + A181V + M204V; rtL180M + S202G + M204V; rtL180M + M204V; rtM204I + L80V; rtM204I + L80I; rtM204I; rtA181V.

Two patients (15,4%) had deletions in the PreS2 region. In one patient, there was a mutation in the S promoter of the preS1 region, located within the CCAAT box (CCAAT → CCAAG).

The antiviral resistance mutation rate found in the study population with HBV recurrence (66.6%) was comparable to similar studies in the literature (47-59%). Pre-transplant mutations mostly continued to be present in the post-transplant samples. Therefore, mutation analysis of patients with positive HBV DNA despite the use of anti-viral drugs, in the pre-transplantation period may help determine the right prophylaxis option after the transplantation in order to prevent the HBV recurrence.

Key words: Hepatitis B virus, liver transplantation, recurrence, mutations, drug resistance

3. GİRİS VE AMAC

Hepatit B virüsünün (HBV) kronik hastalığı sırasında oluşan karaciğer hasarı ve bu hasar zemininde gelişen siroz, karaciğer yetmezliği ve hepatosellüler karsinom (HCC), karaciğer transplantasyonunu önemli bir tedavi seçeneği kılmaktadır. HBV'ye bağlı son dönem karaciğer hastalığına bağlı transplantasyonlar, batılı ülkelerde tüm karaciğer transplantasyonlarının %5-10'unu kapsamakta iken^{1,2}, merkezimizde bu oran %50'nin üstündedir. Yeni karaciğer dokusunun HBV ile tekrar enfeksiyonu ağır hastalık tablosu oluşturmakta, greftin kaybına neden olabilmektedir. Bu nedenle greftin tekrar enfeksiyonunun önlenmesi için çeşitli tedavi/profilaksi protokolleri geliştirilmiştir. Günümüzde yaygın olarak transplantasyon sonrası düşük doz intra-müsküler hepatit immün globulini (IM-HBIG) ve lamivudine profilaksisi uygulanmaktadır.³

Uygun profilaksiye rağmen %10 hastada HBV rekürrensi görülebilmektedir.⁴ HBIG monoprolaksi döneminde tedavi başarısızlığına neden olan faktörlerden biri HBV S geni mutasyonları iken⁵, günümüzde HBIG/lamivudine kombinasyon profilaksisinde revers-transkriptaz inhibitörlerine karşı revers transkriptaz geninde (RT) direnç mutasyonları da problem oluşturmaktadır.⁶

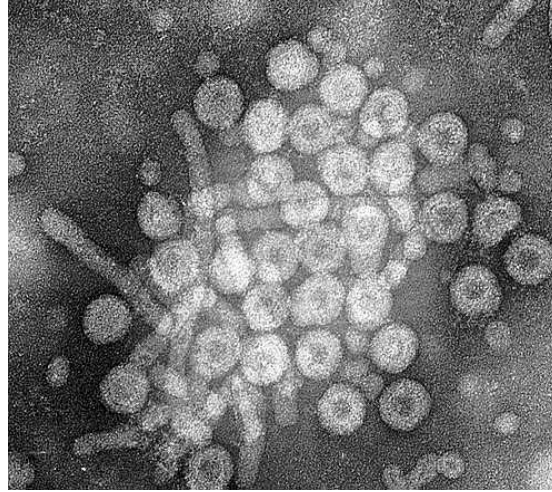
Bu çalışmadaki hedefimiz, HBV rekürrensi görülen hastalarda HBV preS/S ve RT genindeki mutasyon profilini transplantasyon öncesi ve sonrası karşılaştırmaları da yaparak belirlemek, bunları hastalara ait klinik bilgiyle birleştirip merkezimizdeki rekürrens sebeplerini retrospektif olarak ortaya çıkarmaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Hepatit B virüsünün yapısı ve sınıflandırması

Viral hepatit etkenlerinden Hepatit B virüsü (HBV), Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirus cinsinde yer alan bir DNA virüsüdür. Genomu 3020-3220 nükleotid uzunluğunda, kısmi olarak çift sarmallı, çemberseldir.

HBV ile infekte hastaların serumlarında virus, üç farklı formda bulunur. Bunlar: infeksiyöz özellikte, 42nm'lik çift kabuklu, viral DNA içeren, Dane partikülü olarak isimlendirilen yapılar ile, genetik materyal içermediği için infeksiyöz olmayan 22nm çapında küresel ve 200nm'e kadar uzayabilen tübüler yapılardır (Şekil 1).⁷



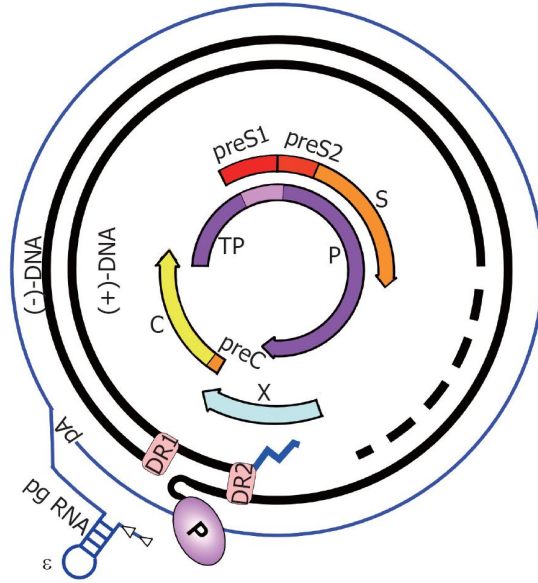
Şekil 1: Hepatit B virüsü içeren serumun üç farklı formdaki virus partiküllerini gösteren elektron mikroskopisi görüntüsü (The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996)

Dane partikülü, yüzey proteinlerinden meydana gelen dış kabuk / zarfa sahiptir. Bu kabuk altında kor ("core") proteininden oluşmuş kübik simetrik kapsid, bu kapsidin çevrelediği viral DNA ve polimeraz protein bulunur.

4.2. HBV genom yapısı

HBV kapsidi içinde yaklaşık 3200 nükleotid uzunluğunda negatif iplik ve uzunluğu 1800 ile 2700 nükleotid arasında değişebilen pozitif iplik bulunur. Kısmi olarak çift iplikli, kovalen olarak kapatılmamış gevşek sirküler DNA yapısı gösterir (RC-DNA). RC-DNA'nın sadece mRNA'lara göre ters polaritedeki negatif DNA ipliği tamdır, pozitif DNA ipliği eksiktir. Negatif DNA ipliğinin 5' ucuna virüse ait P proteini bağlıdır. Pozitif ipliğin 5' ucunda pre-genomik RNA'dan kalan ve pozitif ipliğin sentezi için öncül görevi yapan RNA oligonükleotidi bulunmaktadır. Her iki ipliğin 5' ucunda 10-12 nükleotidlik tekrar eden sabit

diziler vardır. “Direct-repeat 1” (DR1) ve “Direct-repeat 2” (DR2) adını alan bu yapışkan bölgeler, iplikleri bir arada tutar (Şekil 2).⁸



Şekil 2: HBV genom yapısı. Kalın siyah çizgiler kısmi çift iplikli, çembersel RC-DNA’yı temsil etmektedir. P proteini kovalen olarak negatif iplikçiğin 5’ ucuna bağlıdır, zik-zaklı kısım pozitif iplikçiğin ucundaki RNA primerini belirlemektedir. Kesikli kısım farklı uzunluklardaki pozitif ipliği, dıştaki ince çizgi pregenomik RNA’yı temsil etmektedir. Renkli oklar ORF’leri göstermektedir, farklı renkteki kompartmanlar farklı gen bölgelerini simgelemektedir.⁸

4.3. HBV’nin kodladığı proteinler

Bilinen hayvan virüsleri arasında en küçük çift iplikli DNA’ya sahip HBV virüsü, bu küçük genomuna rağmen çok sayıda protein kodlayabilir. Bunu, genom bölgelerinin birden fazla proteini kodlayabilmesine borçludur (Tablo 1).

Tablo 1: HBV’nin kodladığı proteinler ^{9,10}

Protein	Aminoasit sayısı*	Kodlayan Gen bölgesi	Nükleotid yerleşimi**
LHBs	389	Pre-S1 + Pre-S2 + S	2850-833
MHBs	281	Pre-S2 + S	3174-833
SHBs	226	S	157-833
HbeAg	212	Pre-C + C	1816-2452
HbcAg	183	C	1903-2452
DNA pol	832	P	2309-1623
HbxAg	154	X	1376-1838

*Amino asit sayısı genotipler arasında farklılık gösterebilir, genotip D esas alınmıştır.

**Numaralama EcoR1 kesim noktasına göre belirtilmiştir.

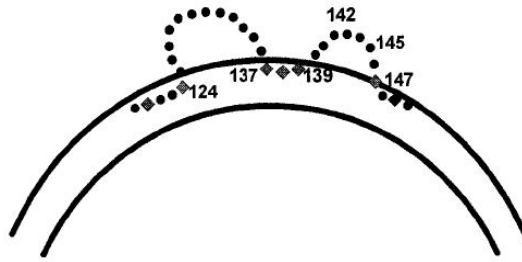
4.3.1. Yüzey (Zarf) Proteinleri

LHBs, MHBs, SHBs: Büyükten küçüğe yüzey proteinleridir. İnfektif virionda ve infektif olmayan viral parçacıklarda farklı oranlarda bulunurlar.

Pre-S1, Pre-S2, S gen bölgelerinin kodladığı LHBs, en büyük yüzey proteindir hepatositlere tutunmada, olgunlaşmış virionların salınımında, virus morfogenezinde önemli rol oynar. Virus subtipine göre 389 (*ay*) veya 400 (*ad*) amino-asitten oluşur. Hepatosit bağlayıcı sahası 21-47. aminoasitler arasındadır.^{11,12}

MHBs, Pre-S2 ve S gen bölgesi tarafından kodlanır. Virion salınımı ve infektivite için gerekli olmadığı gösterilmiştir.^{13,14} Ancak glikozillenmiş formunun mannoz bağlayıcı protein aracılığıyla hepatositlere bağlanmayı kolaylaştırdığı düşünülmektedir.¹⁵

SHBs: S gen bölgesi tarafından kodlanır. En küçük zarf proteindir. Çok miktarda üretilir, zarfta en çok bulunan proteindir. Virion yapımına katılmayan büyük miktarda SHBs, az miktarda diğer zarf proteinleri ile birlikte subviral partiküller halinde hücreden salınır. Serumda bu partiküllerin konsantrasyonu, infektif virionlara göre 10000 kata kadar fazla olabilir.¹¹ Bu proteine karşı oluşmuş antikorlar koruyucu özellik taşımaktadır. Major hidrofilik bölgesi içindeki “a determinanti” adı verilen kısmı, şu anki modellere göre zarf yüzeyinden dışarı iki ilmik halinde çıkar (Şekil 3). Bu bölgeler, antijenik açıdan önemlidir.¹⁶



Şekil 3: Şematik görünümde “a determinanti”¹⁶

4.3.2. Kor proteinleri

HBeAg: Farklı HBV izolatları arasında yapısı relatif olarak korunmuş bir proteindir.¹⁷ Kendi kendine birleşerek homodimerler, daha sonra da bu dimerlerin birleşmesi ile kapsidi oluşturur.^{18 19} N terminali kapsid formasyonundan sorumluyken, 34 amino asitlik C terminali pregenom - revers transkriptaz kompleksinin paketlenmesinden sorumludur.²⁰ Serumda HBeAg'nin aksine, virion dış etkenlerce parçalanmadıkça serbest halde bulunmaz, kapsid yapısı içinde, zarfın altındadır.

HBeAg: HBcAg proteininin sekrete edilen formu olarak kabul edilebilir. N-terminal ucunda fazladan bulunan ve “pre-core” gen bölgesince kodlanan aminoasitler, proteini endoplazmik retikuluma yönlendirir. Burada bir peptidaz tarafından modifiye edilen protein, golgi cisimciği üzerinden sekrete edilir.²¹ Serbest olarak serumda bulunur ve aktif replikasyonun bir göstergesi olarak da kullanılmaktadır.²² Fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir, ama immüno-toleran bir etki göstererek viral persistansa katkıda bulunduğu düşünülmektedir.²³

4.3.3. P proteini

P proteini (Şekil 4), genomun en büyük kısmını kaplayan proteindir. N-terminalinden başlayarak; terminal protein, spacer, polimeraz / revers-transkriptaz, RNase H bölgelerini içerir. Terminal protein, pregenomik RNA'ya kovelan olarak bağlanan kısımdır. “Spacer” bölgesi mutasyonlara tolerandır, buradaki kısmi silinmeler polimeraz aktivitesini etkilememektedir. Polimeraz bölgesi RNA ve DNA bağımlı DNA polimeraz aktivitesi gösterir.²⁴ RNase H bölgesi, kapsid içinde (-) DNA sentezi sırasında pregenomik RNA'yı degrade eder.²⁵



Şekil 4: P proteinine ait bölgeler. Rakamlar amino-asit numaralarıdır.²⁶

4.3.4. X proteini

154 aminoasitlik bir proteindir. Hem viral, hem hücrel genler için genel bir transkripsiyon transaktivatörü olarak görev görür. Az miktarda üretilir. Geniş bir spektrumda viral ve hücrel düzenleyici elemanlar üstünde etki göstererek gen ekspresyonlarını transaktive edebilir. Hücre siklusunu, çoğalmasını, apoptozunu kontrol eden genleri etkilediği gösterilmiştir.²⁷

4.4. Subtip ve genotipler

Bugüne kadar birbirinden genetik açıdan %8'den daha fazla fark gösteren 8 genotip (A – H) tanımlanmıştır.²⁸ Ayrıca iki yeni genotip önerisinde (I ve J) bulunulmuştur.²⁹

HBsAg'deki çeşitli amino asit farklılıkları da subtip tanımlamada kullanılmaktadır. Tüm subtiplerde ortak olan “a” determinantı dışındaki determinant farklılıkları, çeşitli

pozisyonlardaki amino asit değişiklikleri ile ilişkilidir.. Dokuz subtip tanımlanmıştır: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+, adrq-.

Türkiye’de en sık D genotipi ve ayw2 subtipi görülmektedir.³⁰

4.5. HBV replikasyon döngüsü

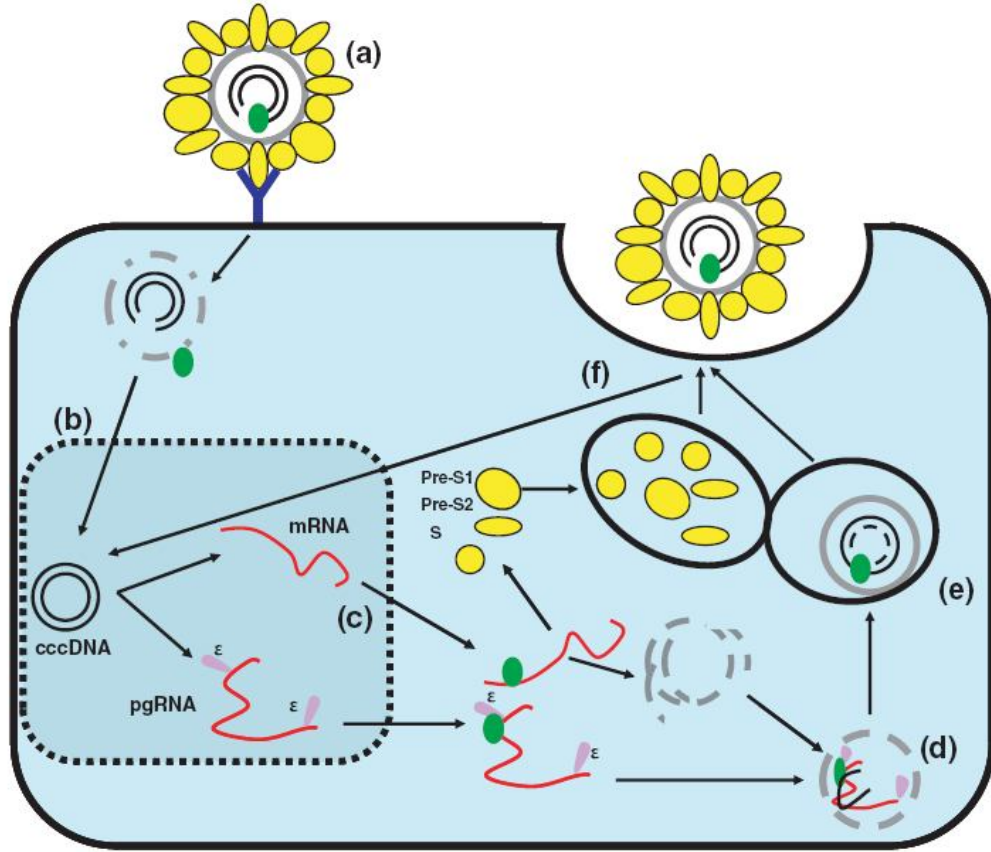
42 nm’lik infeksiif partiküllerin, özellikle LHBs proteini sayesinde hepatositlere bağlandığı ve endositozla hücre içine alındığı düşünülmektedir. Zarf içindeki nükleokapsid, sitoplazmaya iyi tanımlanmamış mekanizmalarla salınır. Nükleokapsid hücre nükleusu içine taşınır, ve kapsid içindeki RC-DNA nükleoplazmaya bırakılır.^{31,32}

RC-DNA’da eksik (+)DNA iplikçığı viral polimeraz tarafından tamamlanır. RC-DNA’nın ccc-DNA’ya (kovalen olarak kapatılmış sirküler DNA) dönüştürülmesi için gerekli diğer basamaklarda hücresel mekanizmaların rol oynadığı düşünülmektedir.³³ ccc-DNA, hücresel RNA polimeraz II aracılığı ile oluşturulan çeşitli subviral ve genomdan büyük RNA parçaları için kalıp vazifesi görür. Bu subviral RNA’lardan yüzey proteinleri ve protein X oluşturulur. En uzun RNA transkripti olan pre-core mRNA’dan HBeAg üretilir. Genomdan daha uzun bir transkript olan pregenomik RNA’dan ise, P proteini ve HBcAg üretilir.

P proteini pgRNA’nın 5’ ucundaki ε (epsilon) adı verilen ilmiğe bağlanır. Bu bağlanma, enkapsidasyonu ve revers-transkripsiyonu başlatır. Revers-transkripsiyonun devamı için uygun kapsid formasyonu şarttır. Kapsid içinde gerçekleşen revers-transkripsiyon ile RC-DNA oluşturulur.³⁴

Bu aşamadan sonra, oluşan nükleokapsidin bir kısmı tekrar nükleusa yönelerek sayısı 10-100 arasında değişebilen ccc-DNA’dan oluşan ccc-DNA havuzunun oluşmasına katkıda bulunabilir.³⁵ Nükleokapsid, zarf proteinleriyle etkileşime girerek hücre dışına infeksiif virus parçacıkları olarak sekrete edilir. Revers-transkripsiyon tamamlanmadan zarf-proteinleriyle etkileşim gerçekleşmez, bu şekilde sadece matür virionların salınması sağlanmaktadır.¹⁴

Replikasyon döngüsü şematik olarak Şekil 5’te görülebilir.



Şekil 5: Basitleştirilmiş HBV replikasyon döngüsü. (a) Virüs hücre içine alınır. (b) Nükleokapsid nükleusa girer, ccc-DNA oluşur. (c) ccc-DNA'dan pregenomik RNA ve diğer mRNA'ların transkripsiyonu gerçekleşir. (d) Pregenomik RNA ve P proteini kompleksi enkapside olur. (e) Pregenomik RNA'dan (-) DNA ipliği oluşturulur ve RNA degrade edilir. (-) DNA ipliğinden pozitif ipliğin sentezi yapılır. (f) Nükleokapsidler zarf proteinleriyle kaplanarak hücre dışına salınır, veya nükleusa dönerek hücre içinde aynı döngüyü tekrar başlatır.

4.6. HBV enfeksiyonunun klinik seyri

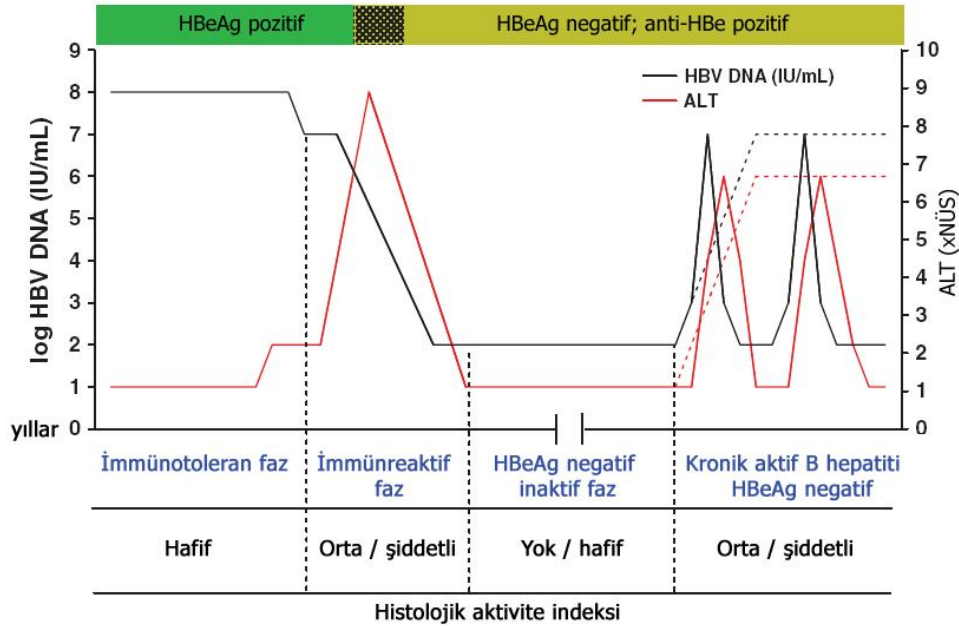
4.6.1. Akut ve Kronik Hepatit

Akut hepatit B enfeksiyonu, asemptomatik enfeksiyondan kendini sınırlayan hepatit veya fulminan hepatite kadar geniş bir spektrumda ortaya çıkabilir. Semptomatik hepatit yenidoğan döneminde %1'den azdır. Yenidoğanların %90'ında hastalık kronikleşir. 1-5 yaşları arasında semptomatik hepatit %10 civarında görülür, kronikleşme riski %20-30'a düşer. Erişkinlikte infekte olanlarda semptomatik hepatit hastaların %30'unda görülürken, hastalığın kronikleşmesi %1-5'e düşer. Erişkin hastaların %95'inden fazlasında HBsAg'nin serumdan silinmesi ve anti-HBs'nin saptanması ile birlikte iyileşme görülür. Enfeksiyonun edinildiği yaş ile kronikleşme arasında ters bir ilişki vardır.³⁶

Kronikleşmenin klinik olarak tespiti, altı aydan uzun süre HBsAg'nin serumda saptanmasıyla mümkündür. Ancak HBsAg'nin silindiği bazı hastalarda, hastalık okült (gizli) olarak sürebilmektedir.³⁷

Kronik enfeksiyonun tipik olarak 4 fazı vardır: İmmüntoleran faz, immünreaktif faz, inaktif faz, HBeAg negatif kronik aktif faz. İnaktif döneme geçen hastaların büyük bölümü ömür boyu bu dönemde kalırken³⁸, bazı hastalarda virüsün reaktivasyonu görülebilir (Şekil 6).

39



Şekil 6: Kronik HBV enfeksiyonunun fazları.⁴⁰

Kronik HBV enfeksiyonunda HBeAg serokonversiyonunu genellikle hayat boyu süren ve sıklıkla klinik açıdan soruna yol açmayan inaktif faz izler, fakat inaktif fazdaki hastalarda da hepatoselüler karsinom gelişebilmektedir³⁸. Spontan HBsAg negatifleşmesi yılda %1-1,8 hastada görülür.⁴¹ Genotip A ve B ile infekte hastalarda HBsAg'nin spontan negatifleşme ihtimali daha yüksektir.⁴²

İnaktif fazdaki olguların bazılarında HBeAg tekrar pozitifleşerek hastalık alevlenebilir, fakat alevlenmenin görüldüğü hastaların çoğunda pre-core veya core promoter mutasyonları nedeniyle HBeAg üretimi görülmemekte veya çok azalmış halde bulunmaktadır.⁴³ Bazı çalışmalar, 15 yılda kümülatif olarak %20-25 inaktif taşıyıcıda hastalığın alevlendiğini göstermiştir.⁴⁴

4.6.2. Siroz ve hepatoselüler karsinom (HCC)

Kronik hepatitli olgularda siroz ve/veya hepatoselüler karsinom gelişebilmektedir. Bulgular, siroza gidişin Hepatit B virüsünün replikasyonu ve gelişen immün yanıtla karaciğer dokusunun hasarlanması sonucu olduğunu göstermektedir. Buna ek risk faktörleri erkek cinsiyet, ilerleyen yaş, sürekli HBeAg/DNA pozitifliği, sürekli ALT yüksekliği, HBeAg'nin tekrar pozitifleşmesi, genotip C ile infeksiyon, virüs reaktivasyonu, hepatit alevlenmelerinin derinliği sayılabilir.³⁶

Hepatoselüler karsinom, genellikle sirotik karaciğerli olgularda geliştiği için benzer risk faktörleri burada da geçerlidir. Buna ek olarak, ailede HCC hikayesi⁴⁵, pre-S, core-promoter mutasyonları, HBV genotipi^{46,47,48}, alkol alımı, aflatoksine maruziyet, sigara kullanımı HCC gelişimi riskinde rol oynayabilir⁴⁹.

HBV ile kronik infekte olgularda kümülatif HCC gelişme riski %10-25 olarak bildirilmiştir. HCC gelişmesi için 30-50 sene süre geçebilir.²²

4.7. Hepatit B virüs varyantları

Hepatit B virüsünün replikasyonu, hata düzeltme özelliği bulunmayan polimeraz enzimiyle gerçekleşmektedir. HBV replikasyonunda hata oranı $1.4-3.2 \times 10^{-5}$ nükleotid değişimi/pozisyon/yıl olarak saptanmıştır. Günde 10^{11} 'e kadar viriyon üretimi olabildiği düşünülürse, her gün, her nükleotid pozisyonunda değişim oluşmaktadır.^{50,51} cccDNA ile bir türümsü arşivi oluştuğu da düşünüldüğünde, HBV kronik infeksiyonunun türümsülerden oluştuğu sonucuna varılabilir. Bu türümsüler içinden baskın varyantı belirleyen endojen faktörler; konağın immün yanıtı, virüs varyantının replikasyon becerisi, replikasyon alanı (virüsün infekte edebileceği uygun hepatosit havuzu), egzogen faktörler; anti-viral kullanımı, aşılama ve hepatit B immün globulin kullanımı olarak sıralanabilir.⁵²

4.7.1. Precore ve core-promoter varyantları

G1896A en sık görülen pre-core mutasyonudur. En sık genotip D kronik infeksiyonlarında saptanmaktadır (%80-90). Bu mutasyon sonucu 28. pozisyonunda stop kodon oluşmakta, bu nedenle de HBeAg üretimi durmaktadır.

Core promoter bölgesinde sıklıkla A1762T ve G1764T çifte mutasyonu saptanmaktadır. Bunun dışında genelde bu çifte mutasyonlarla birlikte olmak üzere, 1653, 1753-1757, 1766 ve 1768 pozisyonlarında mutasyonlar bildirilmiştir. Bu varyantlarda precore mRNA ve HBeAg

üretimi azalmıştır. Hem precore hem de core-promoter varyantları, hastalığın doğal seyrinde görülen varyantlardır.⁵³

4.7.2. Anti-viral dirençli HBV mutantları

HBV enfeksiyonunun antiviral ajanlarla tedavisi sırasında, özellikle viral replikasyonun tam baskılanamadığı durumlarda polimeraz geninde ortaya çıkan ve ilaç direncine yol açan mutasyonlardır. HBV enfeksiyonlarında kullanımı onay almış anti-viral ilaçlar, nükleozid / nükleotid analoglarıdır. Şekil 7’de bu ilaçlara karşı dirence yol açan mutasyonlar, Şekil 8’de ise mutasyonların seneler içinde görülme sıklığı gösterilmiştir. Tablo 2’de bu direnç mutasyonlarının yüzey antijeninde yarattığı değişiklikleri görülebilir.

4.7.2.1. Lamivudine

Lamivudine için tanımlı en önemli direnç mutasyonları rtM204V ve rtM204I mutasyonlarıdır. Bu değişim, virüsün lamivudine’ye duyarlılığını 1000 kat azaltır.⁵⁴ Bu mutasyon, virüsün replikasyon kapasitesini azaltsa da, aynı etken maddeyle devam eden tedavi, rtV173L mutasyonunu seçebilmektedir ki bu, replikasyon kapasitesini geri kazandıran bir mutasyondur.⁵⁵

204. aminoasit değişimine ek olarak görülen rtL180M mutasyonu da lamivudine dirençli virüs varyantlarında sıkça görülmektedir.⁵⁶ rtA181V/T değişimi lamivudine’ye olduğu gibi, adefovire de direnç sağlar.⁵⁷ rtL80I ise in-vitro olarak lamivudine direnciyle ilişkilendirilmiş, üstünde tartışılan bir mutasyondur.⁵⁸

4.7.2.2. Adefovir dipivoxil

Onay alınan 10mg / gün dozun gösterdiği zayıf antiviral etki nedeniyle ilaca primer yanıtızsızlık sık olarak görülür.⁵⁹ Dirence yol açan değişiklikler ise rtA181V/T ve rtN236T mutasyonlarıdır.⁶⁰

4.7.2.3. Entecavir

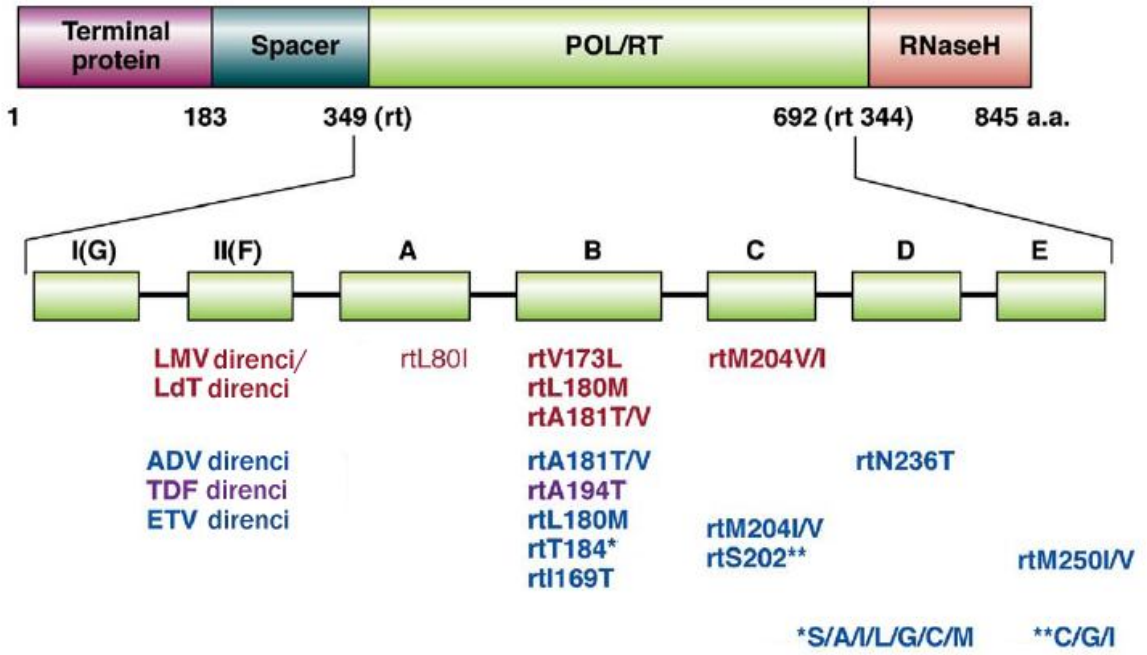
Entecavir’e direnç iki basamakta oluşur. Direnç gelişimi için rtL180M ve rtM204V/I birlikteliğinin üstüne üçüncü bir mutasyonun (rtT184G/S, rtS202I/G veya rtM250V) binmesi gerekmektedir.⁵⁷ Bu nedenle direnç gelişimine yüksek bir bariyer gösterir. Ancak durum lamivudine ile önceden tedavi görmüş hastalar için farklı olmaktadır, çünkü bu hastalarda direnç için gerekli iki mutasyona sıklıkla rastlanır.⁵⁶

4.7.2.4. *Telbivudine*

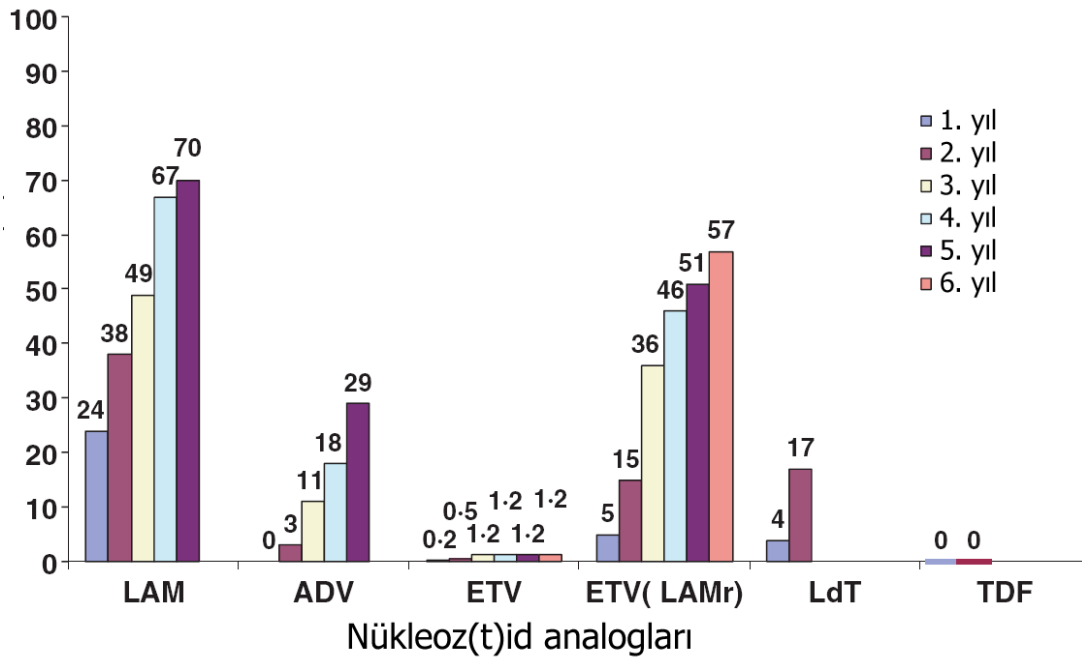
Telbivudine direnci için tanımlanmış tek mutasyon *rtM204I*'dir; telbivudine *rtM204V* mutasyonunu seçmez.⁶¹

4.7.2.5. *Tenofovir*

Şu ana kadar klinik çalışmalarda genotipik bir direnç varlığı doğrulanmamıştır, ancak bazı çalışmalar *rtA194T* mutasyonu ile tenofovir düşük duyarlılık arasında ilişki kurmaktadır.^{62,63}



Şekil 7: RT inhibitörlerine karşı direnç gelişimine yol açan mutasyonlar ve RT genindeki lokalizasyonları. Lamivudine (LAM), adefovir (ADV), entecavir (ETV), telbivudine (LdT), tenofovir (TDF)⁵⁷



Şekil 8: Lamivudine (LAM), adefovir (ADV), entecavir (ETV), telbivudine (LdT), tenofovir (TDF) tedavisinde gelişen kümülatif direnç oranları ve tedavi süresi ile ilişkisi. ETV(LAMr), lamivudine direnci saptanmış hastalardaki entecavir direncini göstermektedir.⁶⁴

4.7.3. Yüzey antijeni varyantları

HBs antijen mutantları klinikte özellikle HBV ile infekte annelerden doğan yenidoğanlarda, HBsAg'nin serumda saptanamadığı okkült infeksiyonlarda ve hepatit B immünglobulin (HBIG) tedavisi alan karaciğer transplantasyon hastalarında görülmektedir.^{37,5}

En sık bildirilen mutasyonlar sG145R ve sD144A mutasyonlarıdır. Bunun dışında öne çıkan mutasyonlar, sK141E ve sT131I'dır. sG145R en iyi bilinen aşıdan kaçış ("vaccine-escape") mutantıdır.⁶⁵ Ülkemizde yapılan çalışmalarda "a" determinantında tanımlanmış bir diğer aşıdan kaçış mutasyonu da sS143L'dir.⁶⁶

HBV'ye bağlı komplikasyonlar nedeniyle karaciğer transplantasyonu yapılmış hastalarda HBIG monoterapisinin kullanıldığı 1990'larda, HBV rekürrensini gördüğü bazı hastalarda, nüks nedeni immün-kaçış mutantları olmuştur.⁶⁷ Tedaviye antivirallerin eklenmesi rekürrens azalmasına büyük katkıda bulunmuş, S geni mutasyonlarının rekürrens sebebi olarak karşımıza çıkma olasılığını azaltmıştır.²⁶

Yüzey proteinleri, polimeraz geniyle örtüşen S gen bölgelerinden kodlandığı için bir gendeki mutasyon, diğer gen ürünüde de mutasyonla sonuçlanabilmektedir. Örneğin, ilaç direncine yol açan rtV173L mutasyonu, S proteininde sE164D değişimine yol açarken,

rtA181T mutasyonu sW182X (stop kodonu) farklılaşmasına yol açabilmektedir. Bu değişimler yüzey proteininin antijenik özelliğini farklılaştırmakta ve/veya sekresyonunu azaltabilmektedir.⁶⁸

Tablo 2: Polimeraz geninde saptanan anti-viral ilaç direnç mutasyonlarının HBsAg üstündeki yansımaları⁵⁷

İlaç grubu	Direnç mutasyonu	HBs Ag'de değişim
L-Nucleosides (LMV & LdT) (* LdT)	rtL180M	Değişim yok
	rtM204V	sI195M
	rtM204I *	sW196*/S/L
Acyclic Phosphonates (ADV & TFV) (* LdT) (* LMV) *#LMV de etkileniyor	rtA181T **	sW172*
	rtA181T **	sW172L
	rtA181V *	sL173F
Cyclopenta(e)ne (ETV)	rtN236T	HBs açık okuma çerçevesi bitiminden sonra
	rtI169T	sF161H/L
	rtT184A	Değişim yok
	rtT184C	sL175F + sL176V
	rtT184I	Değişim yok
	rtT184G	sL176V
	rtT184S	sL175F
	rtT184M	sL176*
	rtT184L	sL175F
	rtS202C	Değişim yok / sS193F
	rtS202I	sV194F/S
	rtS202G	Değişim yok / sS193L
	rtM250I	HBs açık okuma çerçevesi bitiminden sonra
rtM250V	HBs açık okuma çerçevesi bitiminden sonra	

***stop kodonu**

Lamuvudine: LAM, adefovir: ADV, entecavir: ETV, telbivudine: LdT.

4.7.4. Pre S varyantları

Kronik HBV enfeksiyonu seyrinde oluşan Pre-S mutasyonları, sıklıkla delesyonlar şeklindedir. Hem Pre-S1, hem Pre-S2 bölgesindeki delesyonlar hastalığın ağır seyri ve HCC ile ilişkilendirilmiştir. HCC'li hastaların %35-60'ında Pre-S delesyonları saptanmıştır.^{69,70,71}

4.8. HBV ve karaciğer transplantasyonu

Kronik HBV enfeksiyonları, karaciğer transplantasyonlarının önde gelen nedenlerindedir. HBV, hastalığın insidansının görece az olduğu gelişmiş ülkelerde karaciğer transplantasyonu endikasyonu olarak daha az karşımıza çıkar: örneğin İngiltere'de karaciğer transplantasyonlarının ancak %5'i HBV ile ilgilidir¹. Buna karşın Dokuz Eylül Üniversitesinde 2009'un 8. ayına kadar yapılan 345 vakada bu oran %52'dir.

Karaciğer dokusu kronik HBV enfeksiyonu nedeniyle özelliğini tamama yakın kaybettiğinde veya HCC sonucu karaciğerin çıkarılması gerektiğinde, günümüzde tek çözüm karaciğer transplantasyonudur. HBV kaynaklı karaciğer transplantasyonunda greft dokusunun

tekrar HBV ile infeksiyonu önemli bir problemdir. HBV nedeniyle karaciğer transplantasyonunun yapıldığı ilk dönemlerde, 3 yıl içinde greftin tekrar infeksiyonu %80-100 dolaylarında görülmekteydi.^{72,73} Bu sorunun büyüklüğü nedeniyle, 90'ların başında HBV nedeniyle transplantasyon yapılmasına eğilim azalmış, HBV, transplantasyon için kötü bir indikasyon olarak görülmeye başlanmıştır.^{74,75}

Avrupa'da çok merkezli yapılan bir çalışma, HBIG kullanımının HBV rekürrensini anlamlı ölçüde düşürebildiğini göstermiş, ancak HBIG-kaçış ("HBIG-escape") varyantların ortaya çıkması, kimi hastalarda tedavi etkinliğini azaltmıştır.^{76,77} HBIG tedavisinin yanına lamuvidine eklenmesi ile rekürrens %10'un altına çekilebilmiştir.⁴ Lamuvidine'in kullanımıyla beraber ilaç direnci problemi gündeme gelmiştir. Lamuvidine tedavisinde direnç gelişiminin sık olması, özellikle transplantasyon öncesi ilaç direnci gelişmesi, hastanın kombinasyon tedavisinden gördüğü yararı azaltmıştır. 2000'li yıllarda bu tip hastalarda adefovir gibi alternatif ilaçların kullanıma girmesiyle problemin etkisi hafiflemiştir.¹

Yıllar boyunca çeşitli şekillerde rafine edilmiş profilaktik uygulamalarda halen sorulan sorulardan bazıları, sürekli olarak verilmesi öngörülen HBIG tedavisinin süresinin ne olması gerektiği, tedavi dozları, HBIG veriliş şeklinin (intavenöz, intra-müsküler) önemi, ideal anti-HBs serum seviyesinin ne olduğudur. Antivirallerle kombinasyon tedavisinin uygulanmasıyla, HBIG kaçış mutantlarının görülme sıklığı azalmıştır.²⁶

5. GEREK VE YÖNTEM

Çalışma kriterlerine uyan hastalara ait plazma örneklerinde PZT ile saptanan HBV DNA'larda pre-S1/Pre-S2/S gen bölgeleri ve bu kısımlarla örtüşen RT geninin YMDD motifini kapsayan alanını inceleyecek şekilde dizi analizi yapıldı.

5.1. Gereç

5.1.1. Çalışma grubu

01/02/1997-06/08/2009 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversite Hastanesi'nde kronik HBV enfeksiyonuna bağlı komplikasyonlar nedeniyle karaciğer transplantasyonu uygulanmış ve transplantasyon sonrası (en az iki hafta sonra) HBV DNA'sı pozitifleşmiş hastalara ait plazmalar çalışmaya dahil edildi.

Hastaların belirlenmesinde şu yol izlendi:

1. Karaciğer transplantasyonu yapılan 345 hastaya ait laboratuvar verileri transplantasyon sonrası HBV serolojisi ve HBV DNA pozitifliği yönünden incelendi.
2. HBV dışı nedenlerle transplantasyon yapılan hastalar elendi.
3. Değerlendirme sonucu 27 hasta çalışmaya uygun bulundu:
 - a. Transplantasyon öncesi HBV DNA pozitif plazma örneği (bu döneme ait uygun plazma örneğinin laboratuvarda bulunması koşuluyla)
 - b. Transplantasyon sonrası HBV DNA pozitif plazma örneklerinden biri seçilerek çalışmaya alındı.

5.1.2. Plazmaların saklanması

Örnekler steril tüpler içinde -80 °C saklandı.

5.1.3. Ayraçlar

5.1.3.1. Viral nükleik asit ekstraksiyon kiti

EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen, 955134)

5.1.3.2. Polimeraz enzimi

Hotstart Taq DNA Polymerase (Fermentas, EP0611)

5.1.3.3. Kullanılan öncüller

5.1.3.3.1. PZT için kullanılan öncüller:

Tablo 3: PZT için kullanılan öncüller

Öncül adı	Tip	Dizi (5'-3')	Nükleotid pozisyonu	Referans
HBPr1	Sense	GGGTCACCATATTCTTGGG	2814-2832	78
HBPr135	Antisense	CAAAGACAAAAGAAAATTGG	822-803	78
HBPr2	Sense	GAACAAGAGCTACAGCATGGG	2832-2852	78
HBPr94	Antisense	GGTAAAAAGGGACTCAAGATG	795-775	78

5.1.3.3.2. Dizi analizi için kullanılan öncüller

Tablo 4: Dizi analizi için kullanılan öncüller

Öncül adı	Tip	Dizi (5'-3')	Nükleotid pozisyonu	Referans
HBPr7s	Sense	GTGGTGGACTTCTCTCAATTTTC	256-278	79
HBPr7as	Antisense	GAAAATTGAGAGAAGTCCACCAC	278-256	79*
HBPr2	Sense	GAACAAGAGCTACAGCATGGG	2832-2852	78
HBPr94	Antisense	GGTAAAAAGGGACTCAAGATG	795-775	78

*2 no'lu referanstaki P7s'nin ters komplementeri alınarak elde edildi.

5.1.3.4. Agaroz jel elektroforezi için kullanılan ayraçlar

5.1.3.4.1. 1 M Tris-HCl

Trisma base (Amresco, 0826) 46,5 g
Trisma HCl (Sigma, T71149) 18,3 g
Distile su ile 500 mL'ye tamamlandı. (pH=8.0)

5.1.3.4.2. 0.5 M EDTA (Etyhlene diamine tetraacetate)

Na₂EDTA (Sigma, E5134) 18,6 g
Distile su 100 mL
NaOH pelletleri ile pH 8.0'a getirilip otoklavlandı.

5.1.3.4.3. Tris-EDTA (10:0.1) tampon

10 mM Tris-HCl

pH=8.0 0.1 mM EDTA

5.1.3.4.4. Tris-Borik asit-EDTA (TBE-10X) tampon

Tris base (Sigma, T8524) 54 g

Borik asit (Sigma, B6768) 27.5g

0.5 M EDTA 20 mL

Distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

5.1.3.4.5. Agaroz

Universal agarose (peqGOLD, 35-1030)

5.1.3.4.6. Etidyum bromid

5.1.3.4.7. Jel yükleme tamponu

6X Orange DNA Loading Dye (Fermentas, R0631)

5.1.3.4.8. DNA Marker

Gene Ruler 50 bp DNA ladder (Fermentas, SM0371)

5.2. Yöntem

5.2.1. Plazma örneklerinden DNA izolasyonu

İzolasyon amacıyla EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen, 955134) üreticinin önerileri doğrultusunda kullanıldı. Otomatik olarak yapılan işlemin basamakları:

- 1) Lizis: Yüksek sıcaklıkta proteinaz ve tampon eşliğinde nükleazlar inaktive olur, proteinler yıkılır, viral nükleik asit açığa çıkar.
- 2) Bağlama: Nükleik asit silika kaplı manyetik parçalara bağlanır. Bu basamakta kullanılan tamponun tuz oranı ve pH'ı PZT'ni inhibe edebilecek protein ve diğer kontaminantların bağlanmasını engeller.
- 3) Yıkama: Manyetik parçalara bağlı nükleik asit dışında kalan kısım, tamponlar ve son basamakta etanol ile olmak üzere 3 basamakta yıkanır.
- 4) Elüsyon: Saf nükleik asit, tampon içine aktarılır.

Her örnek için 400 µL serumdan 60 µL nükleik asit izolatı elde edildi.

5.2.2. PreS/S bölgesi PZT

5.2.2.1. PZT protokolü

5.2.2.1.1. Ana karışım içeriği:

Bileşen	Hacim	Hedef konsantrasyon (50µL'de)
10X Hot Start PCR tamponu:	5 µL	1X
10 mM dNTP karışımı:	1 µL	0,2mM
10 pmol/µL primer HBPr2	1 µL	0,2µM
10 pmol/µL primer HBPr94	1 µL	0,2µM
25 mM MgCl ₂	4 µL	2,0mM
Hot Start Taq DNA polymerase	0,3 µL	1,5u/50µL
Nükleazdan arındırılmış distile su	32,7 µL	
Toplam 45 µL		

5.2.2.1.2. PZT Karışımı

Her bir örnek için 45 µL ana karışıma 5 µL DNA izolatu eklenerek 50 µL'lik PZT karışımı elde edildi. Viral yükü düşük hastalar için PZT'ye giren DNA hacmi 20 µL'ye çıkarıldı, su miktarı azaltılarak toplam hacim sabit tutuldu.

5.2.2.1.3. Isı döngüsü

- 1) 95 °C'de 4 dakika ön denatürasyon
- 2) 95 °C'de 0,5 dakika
- 3) 56 °C'de 0,5 dakika
- 4) 72 °C'de 1,5 dakika
- 5) 2-4 basamakları 33 kere tekrarlandı.
- 6) 72 °C'de 10 dakika son uzama

5.2.2.2. Çift basamaklı ("nested") PZT

5.2.2.1 protokolü ile jel elektroforezinde negatif sonuç veren örnekler, çift basamaklı PZT'ye alındı.

5.2.2.2.1. Birinci basamak ana karışım içeriği:

Bileşen	Hacim	Hedef konsantrasyon (50µL'de)
10X Hot Start PCR tamponu:	5 µL	1X
10 mM dNTP karışımı:	1 µL	0,2mM
10 pmol/µL primer HBPr1	1 µL	0,2µM
10 pmol/µL primer HBPr135	1 µL	0,2µM

25 mM MgCl ₂	4 µL	2,0mM
Hot Start Taq DNA polymerase	0,3 µL	1,5u/50µL
Nükleazdan arındırılmış distile su	17,7 µL	
Toplam 30 µL		

5.2.2.2.2. *Birinci basamak PZT Karışımı*

Her bir örnek için 30 µL ana karışıma 20 µL DNA izolatı eklenerek 50 µL'lik PZT karışımı elde edildi.

5.2.2.2.3. *Birinci basamak ısı döngüsü*

- 1) 95 °C'de 4 dakika ön denatürasyon
- 2) 95 °C'de 0,5 dakika
- 3) 57 °C'de 0,5 dakika
- 4) 72 °C'de 1,5 dakika
- 5) 2-4 basamakları 33 kere tekrarlandı.
- 6) 72 °C'de 10 dakika son uzama

5.2.2.2.4. *İkinci basamak ana karışım içeriği:*

Bileşen	Hacim	Hedef konsantrasyon (50µL'de)
10X Hot Start PCR tamponu:	5 µL	1X
10 mM dNTP karışımı:	1 µL	0,2mM
10 pmol/µL primer HBPr1	1 µL	0,2µM
10 pmol/µL primer HBPr135	1 µL	0,2µM
25 mM MgCl ₂	4 µL	2,0mM
Hot Start Taq DNA polymerase	0,3 µL	1,5u/50µL
Nükleazdan arındırılmış distile su	36,7 µL	
Toplam 49 µL		

5.2.2.2.5. *İkinci basamak PZT Karışımı*

Her bir örnek için 49 µL ana karışıma birinci basamaktan elde edilen üründen 1 µL eklenerek 50 µL'lik PZT karışımı elde edildi.

5.2.2.2.6. *İkinci basamak ısı döngüsü*

- 1) 95 °C'de 4 dakika ön denatürasyon
- 2) 95 °C'de 0,5 dakika
- 3) 56 °C'de 0,5 dakika
- 4) 72 °C'de 1,5 dakika

- 5) 2-4 basamakları 30 kere tekrarlandı.
- 6) 72 °C'de 10 dakika son uzama

5.2.3. Jel elektroforezi

5.2.3.1. Agaroz jel hazırlama

1x TBE içinde %2'lik agaroz jel kullanılan tanklara uygun miktarda mikrodalga fırında eritilerek hazırlandı. Her 50 mL eriyik içine 3,5 µL etidyum bromid eklendi. Taraklar jel kalıbına yerleştirilip agar donmaya bırakıldı.

5.2.3.2. Yükleme, yürütme

Her ürün, jel yükleme boyası ile 1/6 oranında karıştırıldı (2 µL jel yükleme boyası, 10 µL PZT ürünü). 50 baz çiftlik DNA marker – jel yükleme boyası karışımı ve ürünler jele aktarıldı. Jel 1x TBE içinde 120 volt elektrik akımı uygulanarak 45-50 dakika yürütüldü.

5.2.3.3. Görüntüleme

Elektroforez tamamlandıktan sonra ultraviyole transilüminatörde 280-340 nm dalga boyunda ortalama 300 ms pozlama süresiyle incelendi. Elde edilen bantlar marker yardımı ile değerlendirildi ve beklenen ürüne uygun olup olmadıkları belirlendi.

5.2.4. Dizi analizi

Olumlu sonuç alınan PZT ürünlerinin nükleotid dizileri, dizi analizi primerleri kullanılarak belirlendi (Macrogen, Hong Kong). Elde edilen DNA dizileri BioEdit v7.0.5.3 programı ile hizalandı, referans dizi ile karşılaştırıldı ve HBV pre-S/S ve polimeraz genine uygun olarak amino asit karşılıkları yönünden incelendi. Referans dizi olarak preS/S geni için Norder ver ark. D konsensus dizisi⁸¹, RT geni için Stanford sekans bankasındaki HBV genotip D konsensus dizisi* kullanıldı.

Filogenetik analiz ve genotip tayini için TREECON 1.3b programı kullanıldı. A'dan H'ye HBV genotiplerini temsilen GenBank'tan alınan 33 dizi ve Wooley Monkey Hepatit virüsüne ait dizi kullanılarak çalışma örneklerine ait dizilerin filogenetik ağacı çizdirildi.

*url: <http://hivdb.stanford.edu/HBV/DB/cgi-bin/MutPrevByGenotypeRxHBV.cgi> (11/11/2010)

6. **BULGULAR**

6.1. **Çalışma grubunun özellikleri**

Laboratuvar kayıtlarının incelenmesi ile transplantasyondan en az iki hafta sonra HBV DNA pozitifliği saptanmış 27 hasta saptandı. Bu hastalardan 13 tanesi çalışmaya alınırken diğerleri aşağıda tanımlanan sorunlar nedeniyle çalışmaya dahil edilmedi:

- İki hastanın transplantasyon sonrası örneğine ulaşılamadı.
- Onbir hastanın transplantasyon sonrası serum örneğinde PZT ile ürün elde edilemedi.

Bu örneklerin tümünde viral yük 1000 kopya/ml'nin altında idi.

- Bir hastanın serumundan elde edilen PZT ürünüde, tekrar denemelere rağmen sekansta başarı elde edilemedi.

Çalışmaya dahil edilen 13 hastanın tamamı erkekti, transplantasyon tarihindeki yaşları 39-62 arasındaydı (ortanca: 50). Transplantasyona yol açan tanılar değerlendirildiğinde:

- Üç hastada (%23,1) salt HBV enfeksiyonuna bağlı siroz,
- İki hastada (%15,4) hepatit B ve hepatit D birlikteliğinde siroz,
- İki hastada (%15,4) HBV ve alkolik siroz,
- Altı hastada (%46,2) HBV ve hepatoselüler karsinom vardı.

Onüç hastanın 12'sine ait operasyon öncesi HBV DNA bilgisine ulaşıldı. Operasyona girmeden son bir ay içinde HBV DNA'sı kontrol edilmiş hastalardan (7/13, %53,8) altısının HBV DNA'sı pozitif idi ve bu altı kişinin dördünde viral yük 100 000 kopya/mL'nin üstündeydi. HBV DNA bilgisi olan diğer beş hastanın HBV DNA değerleri operasyondan 2 - 11 ay öncesine dayanıyordu. Bu beş hastanın tümü HBV DNA pozitif, ikisinin viral yükü 100 000 kopya/mL'nin üstündeydi.

Onüç hastanın 10'una ait HBeAg bilgisine ulaşabildi Operasyon öncesi son iki ayda HBeAg pozitifliği gösterilmiş sadece bir hasta vardı. Operasyon öncesi bir gün ile 14 ay öncesinde HBeAg'si değerlendirilmiş sekiz hastada antijen negatifti. Bir hastanın yaklaşık iki yıl (28 ay) önce HBeAg pozitif olduğu belirlendi ancak transplantasyona girişteki durumuna ilişkin bilgi edinilemedi. Üç hastanın HBeAg bilgisine ulaşılamadı.

Operasyon öncesi antiviral tedavi, HBV enfeksiyonu nüksünü etkileyebilecek önemli bir parametre olduğu için bu konudaki veriler toplandı. Buna göre, beş hasta LAM kullanıyordu, bir hasta LAM ve ADV kombine tedavisi alıyordu, üç hasta tedavi almamıştı. Kalan üç hastanın ise operasyon öncesi tedavi bilgilerine ulaşılamadı.

Transplantasyon sırasında HBIG kullanımını incelendiğinde, 13 hastanın 11'ine ait bilgiye ulaşıldı:

- Altı hastada standart doz IV HBIG uygulaması (anhepatik fazda 2 000 - 4 000 ünite HBIG, sonraki 15 gün toplam 15 000 - 25 000 ünite),
- Bir hastada düşük doz HBIG uygulaması (operasyon gününden 1 gün sonra 2 000 ünite, sonraki 7 gün toplam 5 000 ünite),
- Bir hastada yüksek doz HBIG uygulaması (operasyon günü 5 000 ünite, sonraki 15 gün toplam 35 000 ünite),
- Bir hastada ise sadece anhepatik fazda 2000 ünite HBIG uygulaması yapılmıştı.
- Özel bir çalışmaya seçilmeleri nedeniyle transplantasyon sonrasında bir yıl HBIG monoterapisi yapılan iki hastada, anhepatik fazda 10 000 ünite, takip eden 10 günde her gün 10 000 ünite HBIG uygulanmıştı.
- İki hastanın transplantasyon esnasında HBIG kullanımını ile ilgili bilgilerine ulaşamadı.

HBIG açısından, transplantasyon sonrası dönemde uygulanan standart protokol (monoterapi uygulanan iki hastanın ilk sene tedavisi dışında) serum anti-HBs konantrasyonunu 100 IU/L üstünde tutmak üzere ayda bir 2 000 ünite IM HBIG uygulamasıydı. Monoterapi yapılan iki hastada ise anti-HBs serum konsantrasyonu >500 IU/L üstünde tutulmak üzere IV 10 000 ünite HBIG uygulaması bir sene devam ettirilmişti. Sekiz hasta IM HBIG tedavisini düzenli uygularken, üç hasta tedaviye uyum göstermemişti. IM HBIG tedavisiyle ilgili iki hastanın bilgilerine ulaşamadı. Tedavi sonrası izlemde anti-HBs düzeyi sürekli 100 IU/L üstünde kalan üç hasta vardı.

Transplantasyon sonrası (bir yıl HBIG monoterapisi alan iki olgu dışındaki) tüm hastalara HBIG'a ek olarak antiviral tedavi ajanı olarak LAM verilmişti. Nüks sonrası altı hastada LAM kullanımını sürdürülürken, beş hastada LAM + ADV kombinasyon tedavisine başlanmış, iki hastada ise tenofovire geçilmişti. Bir hastanın tedaviye uyumsuzluğu belgelenmişti (16 no'lu hasta kontrollerine gelmeyi bırakmış, ilaçlarını düzensiz aldığı saptanmıştır.)

HBV nüksünün belirlenmesi, transplantasyon sonrası dönemde HBsAg ve HBV DNA izlemleri ile mümkün olmaktadır. Çalışmaya dahil edilen olguların verileri bu açıdan değerlendirildiğinde:

▪ Dört hastada transplantasyon sonrası HBsAg sürekli negatif saptanmıştı. Ancak HBV DNA testlerinde değişken sonuçlar alınmıştı:

- 23 no'lu hastada HBV DNA aralıklı olarak negatif saptanırken, üç kere düşük düzeyde (<1000 kopya/mL) DNA pozitifliği saptanmıştı.
- 16 no'lu hastada 18. ayda DNA pozitifliği saptanmıştı, 51. aydaki kontrolünde ise HBV DNA negatifti.
- 19 no'lu hastada HBV DNA'da bir kez (21. ayda) düşük pozitiflik (<1000 kopya / mL) görülmüştü.
- 14 no'lu hastada viral yük hiç negatifleşmeden sürekli düşük pozitif saptanmıştı (<10 000 kopya/mL).

▪ Beş hastada HBsAg test sonuçları, HBV DNA'nın pozitifleşmesinden sonraki bir dönemde pozitifleşmişti (1, 4, 6, 11, 25 no'lu hastalar). 11 no'lu hastanın izlemi ilk 13 ay sadece HBsAg ile yapılmıştı ve bu 13 ay boyunca boyunca HBV DNA testi uygulanmamıştı. 14. ayda yapılan ilk HBV DNA testi pozitif bulunmuştu, HBsAg aynı gün yapılan testte negatifti.

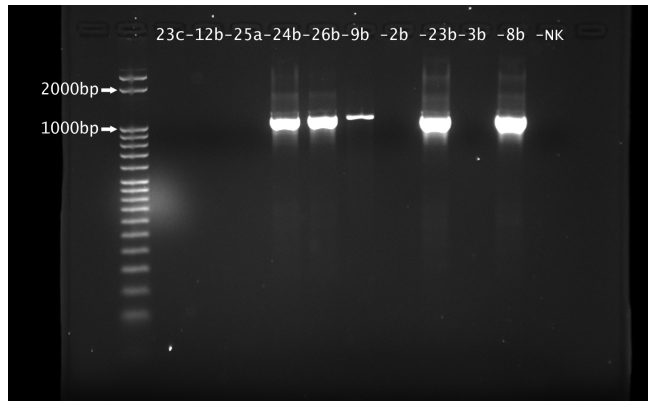
▪ Üç hastada (5, 7, 8 no'lu hastalar) HBV DNA ve HBsAg birlikte pozitifleşmişti. 7 no'lu hastada sürekli HBV DNA pozitifliğiyle uyumlu olarak sürekli HBsAg pozitifliği gözlemlendi

▪ Bir hastada (9 no'lu hasta) HBsAg, HBV DNA'dan önce pozitifleşmişti.

Hastalarla ilgili veriler Tablo 5'te özetlenmiştir.

6.2. PZT Sonuçları

PZT ile hedeflenen 1145 baz çiftlik ürün elde edildi. Jel elektroforezinde uygun ürün elde edildiği belirlenen örneklerden dizi analizi yapıldı (Şekil 9).



Şekil 9: Bazı örneklerden elde edilen PZT sonuçları. PZT pozitif örneklerde, beklenen 1145 bp boyutunda ürün olduğu belirlendi.

Tablo 5: Çalışma gurubu ile ilgili klinik ve laboratuvar bilgilerinin özeti

Endikasyon	Transplantasyon öncesi son veriler				Anhepatik dönem	Transplantasyon sonrası						
	HBeAg	HBV DNA (kopya/mL)	Tedavi	Kritik mutasyon*	HBIG	Tedavi (nüks öncesi, nüks sonrası)	HBIG kullanımı	Anti-HBs** (IU / L)	HBsAg***	HBV DNA***	Kritik Mutasyon*	
1	HBV + HCC	Pozitif (28 ay önce)	687 000 (8 ay önce)	LAM	RT: 180, 181, 204 S geni: 110, 120,	Bilgi yok	LAM, LAM+ADV	Düzenli	4. ayda <100	4. ayda negatif 5. ayda pozitif	1. ay negatif 2. ay pozitif	RT geni: 80, 180, 181,204 S geni: 101, 144
7	HBV	Negatif (11 gün önce)	1 054 900 (11 gün önce)	LAM	RT geni: 180, 202, 204 S geni: Yok	Bilgi yok	LAM, TDV	Bilgi yok	1. ayda <100	1. ayda pozitif	1. ay pozitif	RT geni: 180, 202,204 S geni: Yok
8	HBV + HCC	Negatif (14 gün önce)	158 130 (14 gün önce)	Bilgi yok	RT geni: Yok S geni: 133	Standart	LAM, LAM	Düzenli	3. ayda <100	3. ayda +/- 5. ayda pozitif	3. ay negatif 5. ay pozitif	RT geni: Yok S geni: 133
16	HBV + HDV	Negatif (7 gün önce)	Pozitif < 1750 (6 gün önce)	Almamış	RT geni: Yok S geni: Yok	Monoterapi	LAM, Düzensiz (uyumsuz hasta)	Kısmen düzensiz (uyumsuz hasta)	18. ayda >100 51. ayda <100	Sürekli negatif	1. ay negatif 18. ay pozitif	RT geni: Yok S geni: Yok
19	HBV + HDV	Negatif (1 gün önce)	1 795 (1 gün önce)	Almamış	RT geni: Yok S geni: 140	Monoterapi	LAM	Düzenli	Sürekli > 100	Sürekli negatif	17. ay negatif 21. ay pozitif	RT geni: Yok S geni: 140
23	HBV	Negatif (1 ay önce)	200 000 (5 gün önce)	LAM	RT geni: 181 S geni: Yok	Yüksek doz	LAM, LAM+ADV	Düzenli	Sürekli > 100	Sürekli negatif	1. ay pozitif	RT geni: 181 S geni: Yok
4	HBV + ETOH	Negatif (8 ay önce)	9 390 (8 ay önce)	Almamış	Sekans bilgisi yok	Düşük doz	LAM, LAM+ADV	Düzensiz (uyumsuz)	4. ayda <100	5. ayda negatif 12. ayda pozitif	1. ayda negatif 7. ayda pozitif	RT geni: 204 S geni: Yok
5	HBV + HCC	Bilgi yok	Bilgi yok	Bilgi yok	Sekans bilgisi yok	Sadece Anhepatik fazda	LAM, LAM	Bilgi yok	3. ayda >100 8. ayda <100	3. ayda negatif 8. ayda pozitif	1. ayda negatif 8. ayda pozitif	RT geni: Yok S geni: Yok
6	HBV	Negatif (6 gün önce)	Pozitif < 1000 (2 ay önce)	LAM	Sekans bilgisi Yok	Standart	LAM, LAM+ADV	Düzenli	3. ayda <100	7. ayda negatif 9. ayda pozitif	2. ayda negatif 7. ayda pozitif	RT geni: 80, 204 S geni: 120, 123
9	HBV + HCC	Bilgi yok	Negatif (1 gün önce)	Almamış	Sekans bilgisi Yok	Standart	LAM, LAM	Düzensiz	İlk 50 ay verisi yok	79-93 ayları arası değişken 94. aydan sonra pozitif	107. ay negatif 116. ay pozitif	RT geni: Yok S geni: 100, 146
11	HBV + ETOH	Pozitif (2 ay önce)	3 396 000 (11 ay önce)	LAM+ADV	Sekans bilgisi Yok	Standart	LAM+ADV	Düzenli	5. ayda <100	14. ayda negatif 16. ayda pozitif	14. ayda pozitif	RT geni: 80, 204 S geni: 101
14	HBV + HCC	Bilgi yok	>200 000 (16 gün önce)	Bilgi yok	Sekans bilgisi Yok	Standart	LAM, LAM	Düzenli	Sürekli >100	Sürekli negatif	5. ayda pozitif	RT geni: 180, 204 S geni: 110
25	HBV + HCC	Negatif (14 ay önce)	Pozitif < 1000 (2 ay önce)	LAM	Sekans bilgisi Yok	Standart	LAM, TDV	Düzenli	7. ayda <100	7. ayda pozitif	1. ay negatif 4. ay pozitif	RT geni: 204 S geni: 120

HCC: Hepatoselüler karsinom, ETOH: Alkole bağlı hepatit.

*RT geni için antiviral dirençle ilişkili mutasyonların, S geni için major hidrofilik bölgedeki mutasyonlarının kodonları listelenmiştir (a determinanı mutasyonları kalın olarak yazılmıştır)

Anti-HBs değeri 100 IU/L'nin altında düştüğü ilk ay belirtilmiştir. 100 IU/L'nin altında sonuç alınan örnek ile bir önceki >100 IU/L örnek arasında test yapılmadığı için bir aydan uzun bir süre var ise ilgili anti-HBs değerlerinin yanında bakıldığı ay yazılmıştır. *HBsAg ve HBV DNA için test sonucu negatif saptanan son ay ile pozitiflik saptanan ilk ay belirtilmiştir.

6.3. Dizi analizi

PZT ile hedeflenen ürün saptanan ve dizi analizi yapılan 13 olgu vardı. Altı hastanın transplantasyon öncesi ve sonrası, yedi hastanın sadece transplantasyon sonrası dizi analizi değerlendirilmiş oldu.

6.3.1. HBsAg subtipleri

S geninde yer alan 122, 140, 127, 159, 140. pozisyonundaki aminoasitler değerlendirilerek olguların HBsAg subtipleri belirlendi⁸⁰. Onüç hastanın 10'unda *ayw2*, bir hastada *ayw3*, bir hastada da *ayw4* subtipi saptandı. Bir hastada ise 122. kodonda *d* ve *y* subtip reaktivitesi sağlayan amino asitler birlikte görüldüğü için yorum yapılamadı. (Tablo 6).

Tablo 6: Çalışma olgularında S geninin dizi analizi sonucu belirlenen HBsAg subtipleri

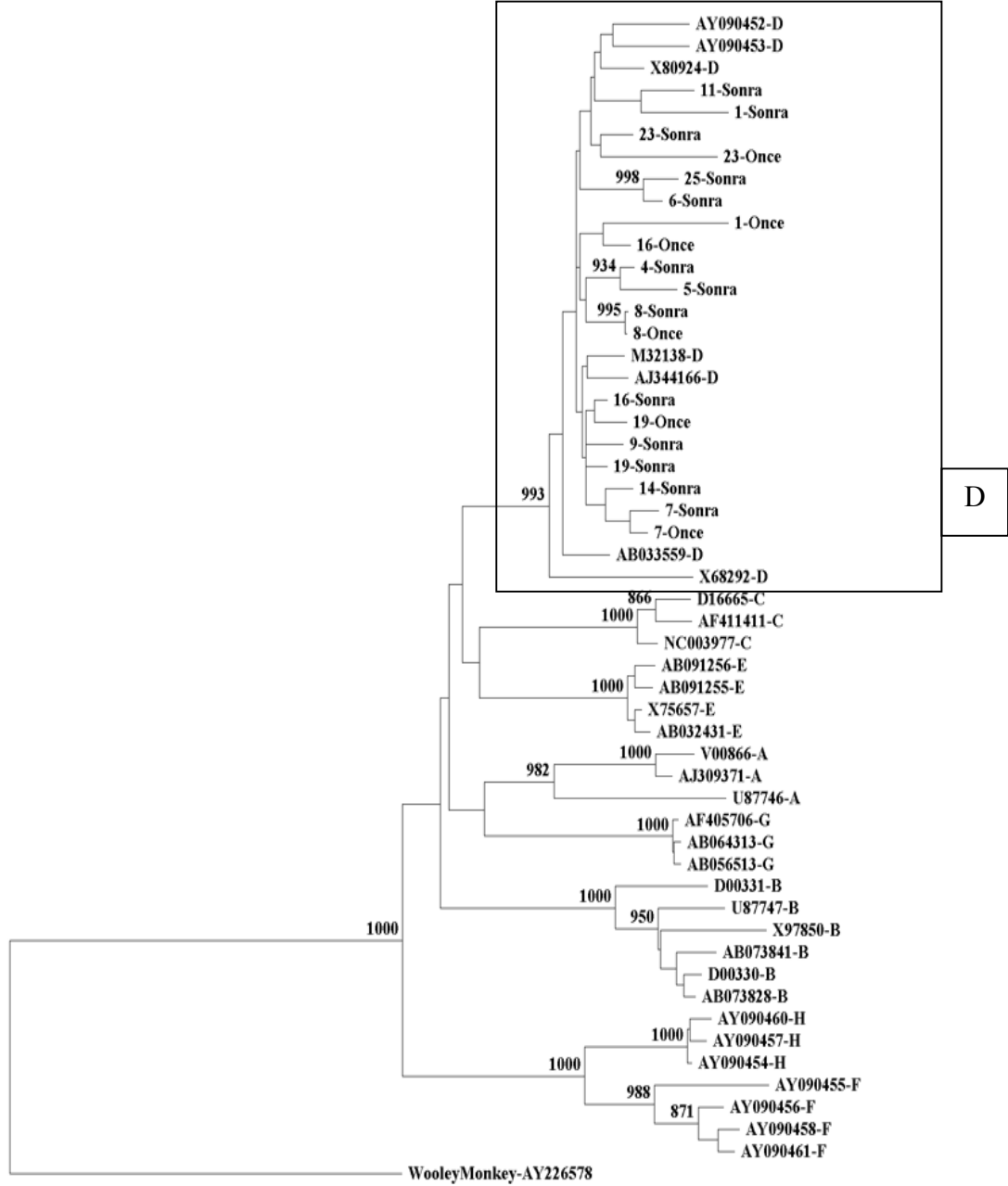
Hasta no	Örnek zamanı (tx. göre)	Pozisyon / Amino Asit*					HBsAg Subtipi
		122	160	127	159	140	
1	Önce	R K	K	P	G	T	**
1	Sonra	R K	K	T	G	T	**
7	Önce	R	K	L	G	T	<i>ayw4</i>
7	Sonra	R	K	L	G	T	<i>ayw4</i>
8	Önce	R	K	P	G	T	<i>ayw2</i>
8	Sonra	R	K	P	G	T	<i>ayw2</i>
16	Önce	R	K	P	G	T	<i>ayw2</i>
16	Sonra	R	K	P	G	T	<i>ayw2</i>
19	Önce	R	K	P	G	I	<i>ayw2</i>
19	Sonra	R	K	P	G	I	<i>ayw2</i>
23	Önce	R	K	P	G	T	<i>ayw2</i>
23	Sonra	R	K	P	G	T	<i>ayw2</i>
4	Sonra	R	K	P	G	T	<i>ayw2</i>
5	Sonra	R	K	P	G	T	<i>ayw2</i>
6	Sonra	R	K	P	G	T	<i>ayw2</i>
9	Sonra	R	K	P	G	T	<i>ayw2</i>
11	Sonra	R	K	T	G	T	<i>ayw3</i>
14	Sonra	R	K	P	G	T	<i>ayw2</i>
25	Sonra	R	K	P	G	T	<i>ayw2</i>

**Bu hastada sekans üstünden subtip tayini 122. kodondaki iki amino asitin birlikte görülmesi nedeniyle yapılamadı.

* Bkz: Kısaltmalar – Amino asit kısaltmaları

6.3.2. Filogenetik analiz

Treecon programı kullanılarak, GenBank'tan alınan A-H genotiplerine ait 33 dizi ve Wooley Monkey Hepatit virüsüne ait dizi kullanılarak çalışma örneklerine ait dizilerin filogenetik ağacı çizdirildi. Yapılan filogenetik analizde tüm hastalara ait sekansların D genotipindeki sekanslarla gruplandığı görüldü (Şekil 10).



Şekil 10: Filogenetik analiz sonuçları. Treecon programı ile çizilen filogenetik ağaçta bootstrap değerleri 1000 tekrarlarla hesaplandı. Hasta numarası ve “önce” / “sonra” olarak belirtilen sekanslar çalışma hastalarına aittir. GenBank’tan elde edilen ve ID numarası belirtilmiş olan sekansların HBV genotipi, büyük harf ile belirtilmiştir. Çalışma grubuna ait sekanslar, D genotipindeki sekanslarla gruplanmıştır.

6.3.3. PreS gen bölgesi mutasyonları

Çalışma hastalarından elde edilen pre-S/S gen bölgesine ait diziler, referans dizi ile karşılaştırılarak aminoasit mutasyonları değerlendirildi. Referans dizi olarak, Norder ve ark. çalışmasındaki D genotipi konsensus dizisi kullanıldı⁸¹ (**Tablo 8**).

İki hastada çerçeve kayması yaratmayan delesyonlar tespit edildi:

- 23 no'lu hastada transplantasyon öncesi pre-S2 bölgesinde pre-S başlangıç kodonuna göre 123-130. aminoasitlerde delesyon saptanırken, transplantasyon sonrası aynı hastada popülasyona hakim olan sekansta 128-130. aminoasitleri kapsayan daha küçük bir delesyon saptandı. Yine bu hastada pre-S2 başlangıç kodonunda mutasyon transplantasyon öncesi bulunurken, bu mutasyon transplantasyon sonrası görülmedi.
- 14 no'lu hastada 128-130. aminoasitlerde delesyon saptandı. Bu hastada pre-S2'nin başlangıç kodonunda da delesyon vardı (109. kodon). Bu hastanın sadece transplantasyon sonrası örneği bulunuyordu.

6.3.4. HBsAg mutasyonları

Diziler D genotipi referans diziyle karşılaştırıldı. (**Tablo 9**) Hastalarda 173, 195, 196. kodonlarda, S geni ile binişik polimeraz geninde yer alan anti-viral direnç mutasyonlarına bağlı değişimler gözlemlendi. S geninde saptanan mutasyonlar "a" determinantı içinde ve dışında olmak üzere değerlendirildi.

- "a" determinantında saptanan mutasyonlar:
 - MHR'nin 3. antijenik bölgesindekiler (birinci ilmik):
 - sM133L (8 no'lu hasta), sT140I (19 no'lu hasta) mutasyonları, hastaların transplantasyon öncesi ve sonrası örneklerinde
 - sT131N mutasyonu 5 no'lu hastanın transplantasyon sonrası örneğinde saptandı.
 - MHR'nin 4. antijenik bölgesindekiler (ikinci ilmik):
 - sD144A mutasyonu 1 no'lu hastanın transplantasyon sonrası örneğinde
 - sN146H mutasyonu 9 no'lu hastanın transplantasyon sonrası örneğinde görüldü.
- "a" determinantı dışında ancak majör hidrofilik bölgede yer alan mutasyonlar (Belirtilmediği takdirde transplantasyon sonradı görülen mutasyonlardır)
 - MHR'nin 1. antijenik bölgesindekiler

- sY100C (9 no'lu hasta), sQ101R (1 no'lu hasta), sI110L (1 ve 14 no'lu hastalar), sS113T/sT118K (1 no'lu hasta'da transplantasyon öncesinde)
- MHR'nin 2. antijenik bölgesindekiler
 - sP120T (6 ve 25 no'lu hastalar), sT123A (6 no'lu hasta)
- Hastaların hiçbirinde MHR'nin 5. antijenik bölgesinde mutasyon görülmedi.

6.3.5. RT geni mutasyonları

Çalışma hastalarından elde edilen rt gen bölgesine ait kısmi diziler (1-206 aa arası), referans dizi ile karşılaştırılarak aminoasit mutasyonları değerlendirildi. Stanford sekans bankasındaki HBV genotip D konsensus dizisi* referans olarak alındı (**Tablo 10**). Toplam 8/13 (%61.5) hastada ilaç direnci mutasyonu saptandı. Transplantasyon öncesi ve sonrası örnekleri değerlendirilen altı hastanın, ikisinde ilaç direnci mutasyonları vardı. Bu hastalardan birinde tx öncesi ve sonrası mutasyonlar arasında fark saptanmazken, diğerinde transplantasyon sonrası örnekte ek olarak rtL80I mutasyonu belirlendi.

İlaç direnci ile ilgili RT mutasyonlarının ve saptandığı hastaların dökümü (mutasyonun hangi ilaç için dirence yol açtığı parantez içinde belirtilmiştir):

- rtL80I: Hasta no 1 (transplantasyon sonrası) ve 11 (LAM)
- rtL80V: Hasta no 6 (LAM)
- rtL180M: Hasta no 1, 7 ve 11 (LAM)
- rtA181V: Hasta no 1 ve 23 (LAM, ADV)
- rtS202G: Hasta no 7 (ETV)
- rtY204V: Hasta no 1, 7 ve 14 (LAM)
- rtY204I: Hasta no 4, 6 ve 25 (LAM)

1 no'lu hastada transplantasyon öncesi üç, sonrası dört mutasyon saptandı. 7 no'lu hastada üç direnç mutasyonu görüldü. Bu hastada entecavir kullanılmamasına rağmen rtS202G mutasyonu da seçilmişti. İki direnç mutasyonu görülen hastalar 6, 11, 14 no'lu hastalardı. Tek direnç mutasyonu içeren hastalar 23, 4, 5, 25 no'lu hastalardı. İlaç direnci görülen tüm hastalarda lamivudine direnci görülürken, 1 ve 23 no'lu hastalarda adefovire çapraz dirence yol açan rtA181V mutasyonu vardı. Bir hastada (hasta no: 7) ise lamivudine direncine yol açan mutasyonlara ek olarak entecavir direncine yol açan rtY202G mutasyonu saptandı.

* url: <http://hivdb.stanford.edu/HBV/DB/cgi-bin/MutPrevByGenotypeRxHBV.cgi>

Beş hastada (5, 8, 9, 16, 19 no'lu hastalar) antiviral dirençle ilgili mutasyon saptanmadı.

Çalışmamızda saptanan önemli mutasyonlar bir arada **Tablo 7**'te görülebilir. Tüm varyasyon ve mutasyonlar pre-S, S, ve RT genlerinde sırasıyla **Tablo 8**, **Tablo 9**, **Tablo 10**'da görülebilir.

Tablo 7: Çalışmamızdaki hastalarda saptanan S geni kaçış mutasyonları, RT geni ilaç direnç mutasyonları

Hasta no	Kaçış mutasyonu (S geni)		İlaç direnci mutasyonu (RT geni)		HBsAg
	Tx öncesi	Tx sonrası	Tx öncesi	Tx sonrası	Tx sonrası
1	Mutasyon yok	T118K+ P127T+sD144A	M204V+M204I+ L180M+A181V	M204V+L180M+ A181V+L80I	Pozitif
4		Mutasyon yok		M204I	Pozitif
5		T131N		Mutasyon yok	Pozitif
6		P120T+T123A		M204I+L80V	Pozitif
7	Mutasyon yok	Mutasyon yok	M204V+L180M+ S202G	M204V+L180M+ S202G	Pozitif
8	M133L	M133L	Mutasyon yok	Mutasyon yok	Pozitif
9		Y100C		Mutasyon yok	Pozitif
11		Mutasyon yok		M204I+L80I	Pozitif
25		P120T		M204I	Pozitif
14		Mutasyon yok		M204V+L180M	Sürekli negatif
16	Mutasyon yok	Mutasyon yok	Mutasyon yok	Mutasyon yok	Sürekli negatif
19	Mutasyon yok	Mutasyon yok	Mutasyon yok	Mutasyon yok	Sürekli negatif
23	Mutasyon yok	Mutasyon yok	A181V	A181V	Sürekli negatif

Tx: transplantasyon. Çizgili kutular ilgili sekansres verisinin olmadığını gösterir.

Tablo 8: Çalışma hastalarında saptanan pre-S mutasyonları. 1 ve 11 no'lu hastalar dışında tüm hastalara ait sekansı bulunan ilk kodon olan 52. kodondan itibaren tablo hazırlanmıştır.

	Konsensus-D	1-önce	1-sonra	7-önce	7-sonra	8-önce	8-sonra	16-önce	16-sonra	19-önce	19-sonra	23-önce	23-sonra	4-sonra	6-sonra	5-sonra	9-sonra	11-sonra	14-sonra	25-sonra	
AA pozisyon																					
52	F	~
54	L	~	.	.	.	P	P	T	P	P
56	F	~	L	.	L	.	.	L	.	L	L	L
73	I	~	K
74	L	~	M
75	Q	~	.	.	.	H	H	H	H
76	T	~
77	L	~	.	.	.	S	S	V	.	M	.	.	.	V
79	A	~	T	T	T	T
85	S	~	A
87	N	~	K
98	S	~	.	.	.	T	T
103	N	~	D	.	.	.	D	.	D	.	D	.	D	.	E	D
104	T	~	S
109	M	~	V
113	S	~	P
115	T	~	N	.
117	H	~	Q
120	L	~	R	P
122	D	~	E
123	P	~	A	A	~
124	R	~	~
125	V	~	~
126	R	.	K	.	K	K	.	~	.	.	.	S	.	K	.	.	.
127	G	S	.	.	.	~	A	.	H	V	H
128	L	~	~	~	.
129	Y	~	~	~	.
130	F	S	.	L	S	S	S	L	L	.	.	~	~	S	.	S	L	.	~	.	
138	G	E
144	P	L
147	V	.	A
148	S
149	P	H	.	H	H	H	H	.	H	H	R	H	H	.	H	R	
150	I	T	T	T	T
154	F	S	.	S
157	I	T	.	.	.
160	P	.	.	.	L	R	L	.	L
161	A	.	V
162	L	.	R	.	R	.	.	R	R	L P	.	P
163	N

■ Sekans bilgisi olmayan bölgeler

■ Pre-S2

■ S-Promoter

■ Delesyon

Tablo 9: Çalışma hastalarında saptanan S geni mutasyonları

	Konsensus -D	1 önce	1sonra	7 önce	7 sonra	8 önce	8 sonra	16 önce	16 sonra	19 önce	19 sonra	23 önce	23 sonra	4 sonra	5 sonra	6 sonra	9 sonra	11 sonra	14 sonra	25 sonra
AA Pozisyon																				
8	F	.	.	.	L	L	.	L	L	.	.	L	.	L	.	L
40	N	N S	N S	S
41	F	F S	F S	S
49	L	.	R	R	.	R	.	P
51	Q	R
54	Q	Q R	Q R
68	T	I
75	M	M I
79	R	R H
96	V	A	.
99	D	D A
100	Y	C	.	.	.
101	Q	.	R	R	.	.
110	I	I L	L	.
113	S	S T
118	T	.	T K
120	P	I	.	.	.	I
122	R	R K	R K
123	T	A
127	P	.	T	L	L	T	.	.
131	T	N
133	M	L	L
140	T	I	I
144	D	.	D A
146	N	H	.	.	.
156	W
173	L	F	F	F	F
177	V
179	F	L
189	T	I	.	.	I	.	.
193	S	L	L	L	L
194	V	A	A
195	I	M	M	M	M	M	.
196	W	S	S	.	S	.	L	.	S



Majör hidrofilik bölge

A determinanı

Antiviral dirençle ilişkili mutasyonlar

Altı çizili amino asitler literatürde bildirilmiş kaçış mutasyonlarıdır.

Tablo 10: Çalışma hastalarında saptanan rt bölgesi mutasyonları

	Genotipe D Konsensus	1 önce	1sonra	7 önce	7 sonra	8 önce	8 sonra	16 önce	16 sonra	19 önce	19 sonra	23 önce	23 sonra	4 sonra	5 sonra	6 sonra	9 sonra	11 sonra	14 sonra	25 sonra	
AA pozisyon																					
7	A	.	E
13	H	Y	Y	Y	.	.	.
16	I	.	.	.	T	T	.	T	T	.	.	T	.	T	.	.	T
53	N	D
54	Y	.	H	H	H	H	.	.	.	H	.	.	.
80	L	.	I	V	.	I	.	.	.
84	V	V/M
91	L	L/I	.	I	I	I	I	I	.
106	S	.	T	T	.	.
112	V	A
113	A
114	R
115	L	.	V	V	V	V	.	.	.
116	S
117	S	P
118	N	N/T	T	.
121	I	I/N
122	F	V
123	N	D
124	H	.	.	Y	Y	D	D	Y	Y	Y	Y	D	Y	.	Y	.	
126	H	.	H/Q
127	G	R
128	T	N	N
131	N	D	.	D	N/D	S
135	S	.	Y	Y	.	.	.
137	S	T
139	N	.	.	H	H	N/K
141	Y	F	F
145	L	M	M
154	K	T
163	I	.	V	V	.	.	.
164	L	M	.	.	M
165	G
180	L	M	M	M	M	M	.
181	A	V	V	V	V
185	S
188	C	G
201	F
202	S	.	.	G	G
203	Y
204	M	V/I	V	V	V	I	.	I	.	I	V	I	.
205	D
206	D



Antiviral dirençle ilişkili mutasyonlar

7. TARTIŞMA

HBV'ye bağlı nedenlerle karaciğer transplantasyonu uygulanan hastalarda transplantasyon sonrası HBV rekürrensini temel olarak iki mekanizmayla olduğu düşünölmektedir:

- Alıcının dolaşımındaki HBV virionları nedeniyle greftin hızla tekrar infekte olması
- Karaciğer dışı bölgelerdeki HBV replikasyonu sonucu greft infeksiyonu oluşması.⁸²

HBV rekürrensi hastaların sağkalımını olumsuz etkilemektedir.⁸³ Rekürrensi önlemek için profilaktik yaklaşımlar geliştirilmiştir. Profilaktik uygulamalar, kronolojik olarak sıralamak gerekirse, HBIG monoterapisi, HBIG monoterapisini izleyen lamivudine monoterapisi, lamivudine monoterapisi, HBIG ve lamivudine kombine tedavisidir.. Bu alandaki son gelişmeler, kombine tedavi sırasında lamivudine direnci gelişen hastalarda alternatif antiviral ilaçların kullanılması ve uygun hasta gruplarında (kombine tedavi alan) HBIG dozunun azaltılması veya bir süre sonra tamamen kesilmesidir.⁸⁴

Hastaların transplantasyon öncesi durumunun rekürrensi etkilediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Rekürrens ile güçlü olarak ilişkilendirilmiş parametreler, viral replikasyonu gösteren parametrelerdir. Bunlar: HBeAg varlığı ve transplantasyon döneminde 100 000 kopya/mL üstünde HBV DNA bulunmasıdır.^{85,86,87} Bazı çalışmalar riski arttıran HBV DNA sınırını 1000 kopya/ml olarak belirlemiştir.^{88,89} Çalışmamızda transplantasyon öncesi son bir ay içinde HBV DNA'sı kontrol edilmiş altı hastanın dördü, HBV DNA 100 000 kopya/mL'nin üstünde olması nedeniyle riskli grupta yer almakta idi.

Transplantasyon öncesi viral yükü antiviral tedavi ile azaltmak, riski azaltan bir yaklaşım olarak görölmektedir, ancak transplantasyonun acil olarak gerçekleştirilmesi gereken durumlarda bu mümkün olmayabilmektedir. Viral yükü düşürmek amacıyla en sık kullanılan ilaç olan lamivudine için direnç gelişmesi sonucu virolojik kırılma problemi önemli bir sorundur. Uzamış lamivudine tedavisi ve YMDD mutantlarının transplantasyon öncesi görülmesi greftin tekrar-infeksiyon riskini arttırmaktadır.^{6,90,91} Bu sebeple lamivudine tedavisine başlanması ile transplantasyon tarihi arasında en fazla altı ay olması önerilmiştir, ancak bunu pratikte uygulamak zordur.⁹² Transplantasyon sırasında HBV DNA pozitif olan 122 hastanın 11'inde bir yıl içinde rekürrens bildiren retrospektif bir çalışmada, transplantasyon öncesi lamivudine kullanımının rekürrens riskini 10,9 kat arttırdığı sonucuna varılmış, pre-operatif lamivudine tedavisi kararının transplantasyon endikasyonu kesinleşen

hastalarda tekrar düşünülmesi gerektiği vurgulanmıştır.⁹³ Bu çalışmada hastaların HBV DNA düzeyleri ile ilgili bilgi verilmemiştir. Başka bir çalışmada ise operasyon öncesi dört haftadan fazla lamivudine tedavisi almış hastalar ile dört haftadan az tedavi almış hastaların iki yıllık rekürrens riskinin aynı olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada en düşük rekürrens transplantasyondan önce bir haftadan daha az lamivudine alan hastalarda olduğu görülmüştür.⁹⁴ Lamivudine'in pre-transplant dönemde kullanımıyla ilgili sorunlara dikkat çeken bu çalışmalara rağmen, lamivudine'in karaciğerdeki değişiklikleri azalttığı, fibrotik ve sirotik değişiklikleri geriye çevirebildiği gösterilmiştir.⁹⁵ Lamivudine'in iyi tolere edilmesi ve ucuz bir ilaç olması halen bir tedavi seçeneği olarak kullanılmasının önemli sebeplerindendir.⁹⁶ Buna rağmen, viral yük ile rekürrens arasında bir ilişkinin saptanmadığı Xie ve ark. 2010'da yayınlanan çalışmasında, transplantasyon sonrası dönemde uygun profilaksinin uygulanmasının rekürrens önlemek için yeterli olacağı, bu hastalarda transplantasyon öncesi nükleozid analogu kullanımının gerekli olmayabileceği savunulmuştur.⁹⁷

Nüksün önlenmesi amacıyla, operasyon öncesi viral yükü düşürülmek istenen hastalara lamivudine yerine direnç bariyeri yüksek ilaçların kullanılması daha uygun olabilir. Antiviral tedavinin önemini gösteren bir çalışmada, Kuzey Amerika'da transplantasyon bekleme listeleri incelendiğinde, genel olarak antiviral tedavilerin (adefovir, tenofovir vb.) uygulanmasının hepatic dekompensasyon insidansının azalmasına katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır.⁹⁸

Çalışmamıza dahil edilen, transplantasyon sonrası HBV DNA pozitifliği saptanan 13 hastanın sekizinde (%61,5) lamivudine direncine yol açan mutasyon/mutasyonlar saptanmıştır. Yedi hastada YMDD motif mutasyonları bulunmuştur. Hastalardan beşinin transplantasyon öncesi lamivudine monoterapisi aldığı belirlenmiş ve bunlardan üçünün transplant öncesi örneklerinde lamivudine direncine yol açan mutasyonlar saptanmıştır, yani bu hastalar transplantasyona ilaç direnci mutasyonlarıyla girmişlerdir. Aynı mutasyonların transplantasyon sonrası HBV nüksü sırasında da bulunduğu görülmüştür. Literatürde, transplantasyon sonrası HBIG ve lamivudine kombinasyon terapisinin uygulandığı ve anti-HBs düzeyinin 100 IU/L'nin üstünde olmasının hedeflendiği, (bu açıdan hastanemizde uygulanan protokole benzer özellik gösteren) bazı çalışmalarda, rekürrens görülen hastaların neredeyse tamamı transplantasyon öncesi lamivudine direnci olan hastalardır.^{6,99,100,101} Bu çalışmalar derlendiğinde 108 hastanın 13'ünde rekürrens görüldüğü, bu hastaların 12'sinde (%92) transplantasyon öncesi genotipik olarak lamivudine direnci olduğu anlaşılmaktadır (Tablo 11). Hastanemizde yapılan 35 hastalık bir çalışmada iki olguda (%5,7) rekürrens görülmüş, her iki hastada da tedavi öncesi lamivudine direnci olduğu belirlenmiştir.¹⁰²

Tablo 11: Transplantasyon sonrası HBIG + LAM tedavisi uygulanan ve ≥ 100 IU/L anti-HBs düzeyinin hedeflendiği çalışmalardaki rekürrens sayıları

Referans	Hasta sayısı	Takip süresi (ay)	HBIG protokolü	Rekürrens sayısı	Tx öncesi LAM direnci saptanan hasta sayısı
Rosenau ve ark. ⁶	21	21	İlk hafta 40.000 IU, sonraki hafta >500 IU/L hedef, daha sonra >100 IU/L	2 (%9.5)	2
Rosenau ve ark. ⁹⁹	19	Bilgi yok	>1000 IU'nun üstüne çıkana kadar günde 10.000 IU, sonra hedef >100 IU/L	4 (%20)	4
Seehofer ve ark. ¹⁰⁰	17	25	İlk ay 80.000 IU, sonra hedef >100 IU/L	3 (%18)	3
Steinmuller ve ark. ¹⁰¹	51	35	HBsAg silininceye kadar günde 10.000 IU, sonra hedef >100 IU/L	4 (%8)	3

Tx: Transplantasyon, LAM: lamivudine

Çalışma grubunda saptanan YMDD mutasyonları incelendiğinde dört hastada YIDD, iki hastada YVDD, bir hastada ise transplantasyon öncesi YIDD+YVDD, sonrası ise tek başına YVDD bulunduğu saptanmıştır. Çeşitli çalışmalarda A, B, C genotiplerinde YVDD motifi her zaman rtL180M ile birlikte görülürken, D genotipinde yapılmış çalışmalarda YVDD rtL180M mutasyonunun birlikte görülme sıklığı %89,6'dır.¹⁰³ Çalışmamızda YVDD görülen üç hastanın üçünde de rtL180M saptanmıştır. YIDD ile rtL180M birlikteliği ise her genotipte farklı oranlarda görülmekte olup, D genotipinde yaklaşık %30 civarında bildirilmiştir.¹⁰³ Çalışmamızda tek başına YIDD saptanan örneklerin hiçbirinde 180. kodonda mutasyon belirlenmemiştir. YIDD/YVDD birlikteliğinin saptandığı bir örnekte ise rtL180M mutasyonu da bulunmuştur. Klonlama yapılmadığından rtL180M'nin hangi motifle birlikte olduğu konusunda yorum yapılamamıştır. Tek başına YIDD motifi belirlenen olguların yarısında (2/4) ek mutasyon saptanmazken, diğer yarısında YIDD motifi ile rtL80V/I mutasyonlarının birlikte olduğu belirlenmiştir.

Lamivudine genotipik direnci saptanan sekiz hastanın ikisinde (1 ve 23 no'lu hastalar) hem lamivudine, hem adefovir direncine yol açan rtA181V belirlenmiştir. 1 no'lu hastada bu mutasyon, lamivudine direncine yol açan diğer mutasyonlarla birlikteyken, 23 no'lu hastada tek başına bulunmuştur. İlginç olarak, bu hasta transplantasyon öncesi sadece lamivudine kullanmıştır. Benzer olgular literatürde de bulunmaktadır; lamivudine tedavisi sırasında direnç gelişen bazı olgularda YMDD motifinin sağlam kaldığı ve mutasyon olarak

rtA181T'nin^{104,105} veya çalışmamızda olduğu gibi rtA181V'nin¹⁰⁶ belirlendiği olgular sık olmamakla birlikte bildirilmiştir.

Bir diğer ilginç bulgu, 7 no'lu hastada 180 ve 204. kodonlardaki lamivudine ile ilişkili mutasyonların yanısıra, entecavir direncine yol açan sS202G mutasyonunun hem transplantasyondan önce hem de sonra saptanmış olmasıdır. Lamivudine direnci gelişmiş hastalarda entecavir kullanımı öncesinde bu direncin görülme sıklığı Tenney ve ark. tarafından %1,2 olarak bildirilmiştir.¹⁰⁷ Aynı grup tarafından lamivudine direnci gelişmiş hastalarda entecavir direncine yol açan 184, 202, ve / veya 250. kodon mutasyonları toplam %6 olarak saptanmış, lamivudine direnciyle ilgili olmasa da bu mutasyonların lamivudine tarafından seçilebildiği bildirilmiştir.¹⁰⁸ 7 no'lu hastada saptanan üçlü mutasyonun (180, 202 ve 204. kodon mutasyonları) entecavir direnç paterni oluşturduğu belirlenmiştir.

Antiviral direnç saptanan sekiz hastanın beşinde lamivudine, bir tanesinde lamivudine ve adefovir kullanım öyküsü varken, bir tanesinin transplantasyon öncesi antiviral ilaç kullanım bilgisine ulaşılamamıştır. Direnç mutasyonu saptanan sekiz hastanın bir tanesinde (4 no'lu hasta) ise transplantasyon öncesi lamivudine kullanım öyküsü yoktur. Bu hastanın transplantasyondan sekiz ay önce yapılan HBV DNA testi 9390 kopya/mL'dir. Operasyon günü HBIG kullanım notu yoktur ve sonrasında çalışmamızda yer alan diğer hastalara göre daha düşük doz HBIG kullandığı belirlenmiştir (Bkz. Bulgular - Çalışma grubunun özellikleri). Buna ek olarak, taburcu edildikten sonra IM HBIG uygulamasına olan uyumsuzluğu not edilmiştir. Serum anti-HBs ise dördüncü ayda negatifleşmiş, sonraki üç ay içinde 100 IU/L altında kalmış, yedinci ayda HBV DNA'nın pozitifleşmesi sonrasında da sürekli negatif saptanmıştır. Bu hastanın sadece transplantasyon sonrası örneğinden dizi analizi yapılabilmiş ve rtM204I mutasyonu saptanmıştır. Bu hasta için HBIG kullanımının optimum seviyede olmamasının (dolayısıyla transplantasyon sonrası profilaksinin ağırlıklı olarak tek başına lamivudine bağlı olmasının) nüks oluşmasına katkıda bulunduğu düşünülebilir.

Transplantasyon öncesi lamivudine ve adefovir kullanan 11 no'lu hastanın transplantasyon sonrası örneğinde rtL80I ve rtM204I mutasyonları saptanmış, adefovir direncine yol açan iki mutasyon noktasından biri olan 181. kodonda mutasyon olmadığı belirlenmiştir. Ancak elde edilen sekansta 236. kodonun görülememesi, hastanın adefovirle ilgili mutasyonu olup olmadığı konusunda yorum yapılmasını önlemektedir. Bu hastanın operasyondan 11 ay önceki HBV DNA miktarı yüksektir (3 396 000 kopya/mL), ayrıca transplantasyondan iki ay önce HBeAg pozitifdir. Hastanın transplantasyona girerken sahip olduğu viral yükün bilinmemesi ve bu döneme ait serum örneğine ulaşılamaması, HBV nüksünün olası nedenleri konusunda yorum yapılmasını engellemektedir.

Literatürde profilaksi amacıyla HBIG ve antiviral ajan olarak çoğunlukla lamivudine kullanılan çalışmalarda rekürrens görülen (HBsAg pozitifleşen) hastalarda YMDD motifindeki mutasyonlar %47-59 oranlarında bildirilmiştir.^{91,97} Çalışmamızda transplantasyon sonrası HBsAg pozitifliği görülen dokuz hastanın altısında (%66,6) YMDD motifinde mutasyonlar görülmüştür.

Yüzey geni açısından bakıldığında, transplantasyon sonrasında 9/13 hastada (%69,2) MHR mutasyonları saptanmıştır. Bu hastalardan altısında (%46,2) antijenite açısından önemli “a” determinantı mutasyonları görülmüştür. Transplantasyon öncesi ve sonrası sekansları bulunan altı hastanın üçünde “a” determinantında mutasyonlar görülürken, transplantasyon önce ve sonrası “a” dışı MHR bölgesinde farklılık gösteren tek olgu 1 no’lu olgu olmuştur. Bu hastada “a” determinantındaki HBsAg w3 subtip reaktivitesini sağlayan sP127T varyasyonu ve sD144A mutasyonu, sadece transplantasyon sonrası görülmüştür.

MHR, “a” determinantı ve yüzey antijenin kalan bölgelerindeki mutasyonların, transplantasyon öncesi dönemdeki hastalarda ve diğer kronik HBV hastalarında zaman içinde biriktiği gösterilmiştir; hastalığın süresi uzadıkça bu mutasyonlar artmaktadır. Akut HBV infeksiyonlarında ise bu mutasyonların görülme olasılığı daha azdır.¹⁰⁹ Özellikle HBIG monoterapisinin uygulandığı dönemlerde profilaksinın bazı hastalardaki başarısızlığı bu mutasyonlara bağlanmıştır; insanlardan elde edilen HBIG’in kronik hastalardaki yüzey antijeni çeşitliliğini karşılayacak antikor yapısını barındırma olasılığı düşüktür.¹⁰⁹ MHR bölgesindeki mutasyonlara lamivudine tedavisinin de etkisi olduğu gösterilmiştir. Lamivudine tedavisi alan hastalarda MHR bölgesindeki mutasyonlara daha sık rastlandığı gösterilmiştir. Transplantasyon öncesi sekans verisine sahip olduğumuz altı hastanın üçünde, MHR bölgesi mutasyonlarının bulunması, kronik enfeksiyonun doğal bir sonucu olarak değerlendirilebileceği gibi, 1 no’lu hastada transplantasyon öncesi lamivudine kullanımı da buna katkıda bulunmuş olabilir.

Çalışma olgularımızın MHR bölgesi mutasyonları Geno2Pheno programı* ile incelendiğinde, anti-HBs antikorundan kaçış mutasyonu olarak tanımlanmış sY100C, sT118K, sP120T (iki hastada), sT123A, sM133L, sD144A mutasyonlarının varlığı belirlenmiştir. Bir hastada saptadığımız sT131N mutasyonu ise Singapur’da yüksek anti-HBs düzeylerine sahip, HBsAg testi negatif bulunan HBV ile enfekte hastalarda tek başına veya diğer mutasyonlarla birlikte gösterilmiştir.¹¹⁰ Literatürde bildirilmiş yüzey geni kaçış mutasyonları 13 hastamızın altısında (%46,2) saptanmıştır. Transplantasyon öncesi sekans

* url: <http://hbv.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>

bilgisi bulunan altı hastanın birinde (8 no'lu hasta) kaçış mutasyonu saptanmış ve aynı mutasyonun operasyon sonrası da varlığını sürdürdüğü, dolayısıyla bu hastanın profilaksi amacıyla verilen HBIG'den maksimum yararı sağlayamadığı düşünülmüştür. 1 no'lu hastada ise kaçış mutasyonları (sT118K, sD144A), sadece transplantasyon sonrasında görülmüştür. Bu özellik nedeniyle mutasyonların HBIG profilaksisi sonucu seçildiği düşünülmüştür..

Çalışmamızda MHR bölgesinde görülen fakat antikordan kaçış mutasyonu olduğuna dair bilgi bulunmayan mutasyonlar da saptanmıştır. İki hastada saptanan sQ101R mutasyonunun direk olarak antijen antikor ilişkisini etkilemediği bir çalışmada gösterilmiştir.¹¹¹ Yine iki hastada gördüğümüz sI110L mutasyonu HBsAg negatifliğiyle ilişkilendirilmiş, diğer mutasyonlarla beraber olarak okült HBV infeksiyonlarında bildirilmiştir.¹¹² sQ101R ve sI110L mutasyonları, ülkemizde yapılan bir çalışmada HBIG kullanmamış kronik HBV hastalarında da gösterilmiştir. Özellikle 101. kodondaki mutasyonlar, bu çalışmada 118. kodon mutasyonlarından sonra en sık rastlanan mutasyon olarak bildirilmiştir.¹¹³ sS113T sadece 1 no'lu hastanın transplantasyon öncesi örneğinde görülmüştür, bu mutasyon semptomatik ve asemptomatik taşıyıcılarda bildirilmiştir.¹¹⁴ HBIG sonrası bu mutasyonun seçilmemiş olması da bunun bir kaçış mutasyonu olmadığını destekler niteliktedir. 19 no'lu hastada gördüğümüz sT140I mutasyonu ise okült HBV infeksiyonu olan bir hastada diğer MHR mutasyonları ile birlikte gösterilmiştir.¹¹⁵ Çalışmamızda literatürde hakkında bilgi olmayan sN146H mutasyonu, 9 no'lu hastada sY100C kaçış mutasyonu ile birlikte görülmüştür. Aynı kodondaki sN146S mutasyonu Carman ve ark. tarafından HBIG monoterapisi döneminde HBIG'tan kaçış ile ilişkilendirilmiş bir mutasyondur.¹¹⁶

Çalışma grubumuzda antikordan kaçış mutasyonu olarak literatürde en sık bildirilen sG145R mutasyonuna rastlanmamıştır. İki hastada sP120T görülürken (6 ve 25 no'lu hastalar), diğer tüm kaçışla ilişkili mutasyonlar birer kez saptanmıştır. Sırbistan'da yapılan bir çalışmada çoğunluğu lamivudine tedavisi gören (%86,7) ve %60'ı ilaç direnci mutasyonu gösteren kronik HBV hastalarında sP120T en sık rastlanan MHR mutasyonu olarak görülmüş (%9.14), sG145A/R mutasyonu ise %1,83 oranında bildirilmiştir.¹¹⁷ sP120T mutasyonu ayrıca HBsAg pozitif anneden doğan HBIG terapisi uygulanmış bir bebekte tanımlanmış, buna ek olarak aşı ve diagnostik kaçış mutasyonu olarak da bildirilmiştir.^{118, 119, 120}

Çalışmamızda iki hastada Pre-S2 delesyonu saptanmıştır. Pre-S mutasyonları, özellikle delesyonlar, çeşitli çalışmalarda HCC ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir.^{69,70,71} Transplantasyon rekürrensi ile pre-S mutasyonları arasında ilişki kuran çalışma sayısı azdır, genellikle ilaç direnci ve S geni mutasyonları, özellikle de "a" determinantındaki mutasyonlar literatürde daha geniş bir yer almaktadır. Ancak pre-S bölgesi B ve T hücre

epitopları içermektedir. Kronik HBV hastalarında bu bölgedeki mutasyonların immün sistem baskısından kaçışta rol oynadığı düşünülmektedir.¹²¹ Tayland'da yapılan bir çalışma, kendi coğrafi bölgelerinde, "a" determinantı mutasyonları ile aşından kaçış arasında bir ilişki gösterememiş, pre-S delesyonları ile aşından kaçış arasında bağlantı kurmuştur.¹²² 2010'da yayınlanan Çin'de yapılan bir çalışmada, serumunda anti-HBs ve HBsAg birlikteliğinin görüldüğü hastalarda bu durum sG145R mutasyonu ile ilişkilendirilemeyip, bunun dışındaki "a" determinantı ve pre-S mutasyonları bu durumla bağlantılı bulunmuştur.¹²³ Çin'de yapılan başka bir çalışmada kronik HBV hastalarında HBsAg amino asit değişimlerinin serumlarında anti-HBs bulunan ve bulunmayan hastalar arasında anlamlı farklılık göstermediği belirlenmiştir.¹²⁴ Literatürdeki diğer çalışmalardan farklılık gösteren bu yayınlarda bazı coğrafi ve genotip farklılıklarının rol oynadığı düşünülmüştür.

Transplantasyon rekürrensi ve pre-S bölgesi mutasyonları ile ilgili olarak literatürde sınırlı bilgi bulunmamaktadır. İtalya'da yapılan ve 14 hastanın 9'unda HBV rekürrensi görülen bir çalışmada, S bölgesindeki ve özellikle Pre-S2 bölgesindeki transplantasyon öncesi görülen ve ammo-asit değişikliğine yol açan ("missense") mutasyonların rekürrens riskini arttırdığı bildirilmiştir.¹²⁵ Bu çalışmada özel bir mutasyona dikkat çekilmemiş, rekürrens, pre-S bölgesindeki heterojenite ile ilişkilendirilmiştir. Trautwein ve ark. nın çalışmasında pre-S bölgesinde transplantasyon öncesi ve sonrası anlamlı farklılıklar bulunamamış, HBIG'in bu bölge üstünde selektif bir baskı oluşturmadığı kanısına varılmıştır.¹²⁶ Daha eski tarihli bir çalışmada ise, HBIG'in S antijeni üstünde baskı oluşturduğu gösterilmiştir.¹²⁷

Kronik HBV hastalarında Pre-S bölgesinde en sık bildirilen mutasyonlar delesyonlar olup, delesyonlar en sık pre-S2 bölgesinde gösterilmiştir (%8,5-%10,7).^{128,129} Pre-S2 delesyonlarını Pre-S2 başlangıç-kodon mutasyonları (%4,9-%9,7) izlemektedir. Pre-S1 delesyonları ise daha nadir görülmüştür (%1,0-%2,8). Çalışmamızda iki hastada (%15,4) pre-S2 delesyonu saptanmıştır. Bu hastalarda transplantasyon sonrası HBsAg negatif kalmıştır. 23 no'lu hastada transplantasyon öncesi pre-S2 delesyonuna ek olarak saptanan pre-S2 başlangıç kodon mutasyonu, transplantasyon sonrası görülmezken, daha kısa delesyona sahip bir virüsün dominant olduğu belirlenmiştir. 14 no'lu hastada ise, pre-S2 delesyonuna ek olarak pre-S2 başlangıç kodon delesyonu da bulunmuştur. Başlangıç kodonunda mutasyon, M proteininin üretilmemesine sebep olmaktadır.

Çalışmamızda elde edilen Pre-S1 sekans bilgileri bazı hastalarda kısmen eksiktir. Eldeki dizilerin kapsadığı bölgeler itibariyle, hiçbir hastada pre-S1 bölgesinde delesyon saptanmamıştır. Trautwein ve ark. çalışmasında bir hastada, sadece transplantasyon sonrasında görülen CCAAT motifi mutasyonu, bu bölgeye ait sekansı olan 11 hastamızın

birinde (9 no'lu HCC tanılı hasta) görülmüştür. Bu hastada CCAAT → CCAAG değişimi gözlenmiş ve bu değişim sonucu pre-S 87. kodonda N → K değişikliği oluşmuştur. CCAAT kutusundaki mutasyonlar ayrıca kronik hastalarda da bildirilmiş, HCC ve hastalığın kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir.^{130,131}

Tartışmalı olmakla birlikte, literatürde, karaciğer dışı rezervuarların, özellikle de periferik kandaki mononükleer hücrelerin enfeksiyondaki rolüyle ilgili önemli bilgiler mevcuttur. Bu görüş periferik kan mononükleer hücrelerde HBV'ye ait DNA ve replikasyon döngüsüyle ilgili ara formların bulunması (viral RNA transkriptleri) ile gündeme gelmiştir.^{132,133,134} Ancak Köck ve arkadaşlarının 1996'da yayınladığı çalışmada, bu hücrelerde cccDNA gösterilememiş, önceki çalışmalardaki verilerin virüsün hücreye adsorbe olmasıyla gerçekleşebileceği fikri savunulmuştur. Viral mRNA'ların bulunmasının ise defektif viral partiküllerin ters transkripsiyonunun tam gerçekleşmemesinden kaynaklanabileceği düşünülmüş, hepatosit dışı hücelere ait transkripsiyonel ve diğer hücrel faktörlerin HBV replikasyon döngüsü için uygun olmayacağı düşünülmüştür.¹³⁵ Stoll-Becker ve arkadaşlarının 1997'de yayınladığı çalışmada ise yüksek viremik hastalarda periferik kan mononükleer hücrelerinde cccDNA saptanmış, sonuçta hepatosit dışında HBV replikasyonunun inefektif olduğu, yüksek viremik hastalarda inefektif de olsa hepatosit dışında replikasyonun gerçekleşme olasılığının daha yüksek olduğu söylenmiştir. Nitekim 2008 tarihli bir çalışmada periferik kan mononükleer hücrelerde cccDNA ve pregenomik RNA gösterilmiş ve bunun viral yüküyle korele olduğu saptanmıştır.¹³⁶

Periferik kan mononükleer hücrelerinin enfeksiyonu taşıyabileceği, HBV ile infekte annelerden intrauterin dönemde bebeğe HBV geçişinde rol oynadıklarını gösteren çalışmalarda da vurgulanmıştır.^{137,138} Ayrıca bu hücrelerdeki HBV DNA'nın farklı mutasyon profilleri içerebildiği de görülmüştür. İtalya'da yapılan bir çalışmada, bir hastada transplantasyon öncesi hastanın periferik kan mononükleer hücrelerinde dominant olarak s120 ve s144. kodonlarda mutasyon görülmüş, fakat bu popülasyonun karaciğer dokusunda ve serumda dominant popülasyon olarak bulunmadığı gösterilmiştir. Transplantasyon sonrası nüks görülen bu hastada, rekürrent HBV enfeksiyonunun s120 ve s144 kodonlarında mutasyon içeren viral popülasyon ile gerçekleştiği ve bu suşun karaciğerde, serumda ve periferik kan mononükleer hücrelerdeki tüm klonlarda bulunduğu gösterilmiştir. Bu veri, periferik kan mononükleer hücrelerinin dirençli popülasyon için bir rezervuar olabileceğinin göstergesi olarak sunulmuştur.¹³⁹ Daha yakın tarihli bir çalışmada bu bulguları destekler sonuçlar sunulmuştur. Söz konusu çalışmada serum ve periferik kan mononükleer hücrelerinde farklı genetik profilde HBV DNA saptanmış, periferik kan hücrelerinde potansiyel immün kaçış

mutasyonlarının birikmesi ve virusun bu şekilde kompartmanlaşmasının, hastalığın kronikleşmesi, ve epidemiyolojisi gibi konularda önemli etkileri olacağı savunulmuştur.¹⁴⁰ Transplantasyon öncesi ve sonrası sekanslarını değerlendirebildiğimiz olgulardan ikisinde (1 ve 23 no'lu hastalar) örnek çiftlerinde farklı mutasyonların saptanmasında bu kompartmanlaşma rol oynamış olabilir. Ancak bu farklılaşmanın klonlama ile ileri incelemesi gerekmektedir.

Çalışmamızda, transplantasyon sonrası saptanan mutasyonlar (antikordan kaçış ve ilaç direnç mutasyonları) değerlendirildiğinde, 13 hastanın beşinde (%38,5) ilaç direnç mutasyonu, üçünde (%23,1) kaçışla ilişkili S geni mutasyonu, üçünde (%23,1) ise her iki tip mutasyon birlikte görülmüştür. İki hastada (%15,4; 16, 19 no'lu hastalar) ise mutasyon saptanmamıştır. Bu iki hastada transplantasyondan sonra HBsAg pozitifleşmemiş, sadece HBV DNA'da pozitiflik saptanmıştır. HBsAg pozitifleşen dokuz hastanın tamamında en azından bir S geni kaçış mutasyonu veya antiviral direnç mutasyonu bulunduğu görülmüştür. HBsAg pozitifleşmemiş dört hastanın hiç birinde kaçış mutasyonu saptanmazken, iki hastada antiviral direnç mutasyonu saptanmıştır.

Transplantasyon hastalarında HBV rekürrens tanımı, HBsAg'nin transplantasyon sonrası pozitifleşmesi olarak kabul görmüştür¹⁴¹, ancak özellikle tek başına inatçı HBV-DNA pozitifliklerinin önemli olabileceğini ve tanımın gözden geçirilmesini gerektiğini savunan yayınlar olmuştur.¹⁴² HBV-DNA pozitifliği viral persistans olarak tanımlanmış, bazı serilerde HBsAg pozitifliği olmadan düşük HBV pozitifliği %45-%67,5'e varan oranlarda tespit edilmiştir.^{143,144} Transplantasyon hastaları için klinik anlamı tam olarak kesinleşmeyen bu duruma, özellikle daha duyarlı testlerin kullanıma girmesiyle daha sık rastlanmaktadır. Viral persistans, transplant hastalarında greftin ve hastanın sağlığı açısından ömür boyu profilaksinin gerekliliğini göstermektedir. Çalışmamızda dört hastada (14, 16, 19, 23 no'lu hastalar) HBsAg pozitifleşmeden düşük seviyede HBV DNA pozitifleşmesi görülmüştür. Bunlardan hiçbiri S geni kaçış mutasyonu göstermezken, birden fazla HBV DNA pozitifliği saptanan 14 ve 23 no'lu hastalarda ilaç direnci mutasyonları görülmüştür. HBsAg negatifliğine rağmen HBV DNA'nın ısrarlı pozitifliği greftin tekrar infeksiyonuna işaret edebileceği için, izlemde HBV DNA'nın dikkate alınması gerektiği açıktır. HBsAg pozitifleşen dokuz hastamızın sadece bir tanesinde (%11,11) HBsAg, HBV DNA'dan önce pozitifleşmişken, beşinde (%55,6) HBV DNA'nın HBsAg'den önce pozitifleştiği belirlenmiştir.

Hastalar, literatürde kabul gören rekürrens tanımına göre (HBsAg pozitifleşmesi) değerlendirildiğinde, 9/13 (%69,2) olguda transplantasyon sonrası serum HBsAg'si

pozitifleşmiştir. Bunların tümünde rekürrens oluşmasında rol oynayabilecek en az bir mutasyon saptanmıştır. Hastaların üçünde (%33,3) anti-viral ilaç direnç mutasyonları, üçünde (%33,3) S geninde antikordan kaçış mutasyonları, üç hastada ise (%33,3) antikordan kaçış ve anti-viral direnç mutasyonları birlikte görülmüştür.

8. SONUC VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, yapılan çalışma HBV'ye bağlı karaciğer transplantasyonu alıcılarında HBV enfeksiyonu nüksü saptandığında, olguların çoğunda ilaç direnci ve/veya anti-HBs'den kaçış mutasyonlarının varlığını göstermiştir. Bu mutasyonların uygulanan profilaksiye rağmen ortaya çıkabilmesi, virusun baskı altında replikasyonunu sürdürebilmesi ile mümkündür. Bazı hastalarda transplantasyon öncesi dönemde de mutasyonların var olduğu gösterilmiştir. Özellikle lamivudine tedavisi almakta olan ve transplantasyona antiviral direnç mutasyonları ile giren üç hastanın nüks geliştiğinde de bu mutasyonları taşıdıklarının gösterilmesi dikkat çekicidir. Bu hastaların transplantasyon öncesi tesbit edilmesi, uygulanacak profilakside bazı değişiklikler yapılmasını sağlayabilir. Çalışmanın retrospektif karakterde olması, bazı hastaların transplantasyon öncesi örneklerine ve nüksü etkileyebilecek klinik/laboratuvar verilerine ulaşılamamasına yol açmıştır. Öte yandan, çalışma, günlük hayatta karşılaşılan sıkıntıları ve aksamaları göstermesi açısından yararlı da olabilir. Transplantasyon öncesi viral yükün daha sıkı izlenmesi bazı kararlara yön verebilir ve mutasyon analizi ile birlikte transplantasyon sonrası kullanılacak profilaksinin içeriğini belirleyebilir. Benzer şekilde transplantasyon sonrası izlemde HBsAg ve anti-HBs testlerinin yanı sıra HBV-DNA testinden daha çok yararlanılması, sorunların erken fark edilmesini sağlayabilir. Benzer bir çalışmanın prospektif olarak tasarlanarak yürütülmesi, klonlama çalışmalarını içermesi ve mutasyonların fenotipik yansımalarının değerlendirilebilmesi, bu çalışmada açıklığa kavuşturulamayan bazı noktaların incelenmesi açısından yararlı olacaktır.

9. KAYNAKLAR

- ¹ Mutimer D. Hepatitis B and liver transplantation. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23: 1031–41.
- ² Seaberg EC, Belle SH, Beringer KC, Schivins JL et al. Liver transplantation in the United States from 1987-1998: updated results from the Pitt-UNOS Liver Transplant Registry. *Clin Transpl* 1998: 17–37.
- ³ Jiang L, Jiang LS, Cheng NS, Yan LN. Current prophylactic strategies against hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2009;15: 2489–99.
- ⁴ Angus PW, McCaughan GW, Gane EJ, Crawford DH et al. Combination low-dose hepatitis B immune globulin and lamivudine therapy provides effective prophylaxis against posttransplantation hepatitis B. *Liver Transpl* 2000;6: 429–33.
- ⁵ Pawlotsky JM. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J Clin Virol* 2005;34 Suppl 1: S125–9.
- ⁶ Rosenau J, Bahr MJ, Tillmann HL, Trautwein C et al. Lamivudine and low-dose hepatitis B immune globulin for prophylaxis of hepatitis B reinfection after liver transplantation. Possible role of mutations in the YMDD motif prior to transplantation as a risk factor for reinfection. *J Hepatol* 2001;34: 895–902.
- ⁷ Kaito M, Ishida S, Tanaka H, Horiike S et al. Morphology of hepatitis C and hepatitis B virus particles as detected by immunogold electron microscopy. *Med Mol Morphol* 2006;39: 63–71.
- ⁸ Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2007;13: 48–64
- ⁹ Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD et al. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33: 751–7.
- ¹⁰ Spandau DF, Lee CH. Trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J Virol* 1988;62: 427–34.
- ¹¹ Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* 2007 Jan 7;13: 65–73.
- ¹² Patient R, Hourieux C, Roingeard P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell Microbiol* 2009;11: 1561–70.
- ¹³ Ni Y, Sonnabend J, Seitz S, Urban S. The pre-s2 domain of the hepatitis B virus is dispensable for infectivity but serves a spacer function for L-protein-connected virus assembly. *J Virol* 2010;84: 3879–88.
- ¹⁴ Bruss V, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88: 1059–63.

-
- ¹⁵ Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, McIntosh D et al. Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet* 1996;348: 1417-9.
- ¹⁶ Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999;12: 351–66.
- ¹⁷ Chain BM, Myers R. Variability and conservation in hepatitis B virus core protein. *BMC Microbiol* 2005;5: 33.
- ¹⁸ Zhou S, Standring DN. Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10046–50
- ¹⁹ Crowther RA, Kiselev NA, Bottcher B, Berriman JA et al. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 1994;77: 943–50
- ²⁰ Gallina A, Bonelli F, Zentilin L, Rindi G et al. A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J Virol* 1989;63: 4645–52
- ²¹ Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337: 1733–45.
- ²² Özacar T. Hepatit B virusu. Eds: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri.* 2008: 1882–904.
- ²³ Milich, D. et al. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc. Natl Acad Sci USA* 1990;87: 6599–603.
- ²⁴ Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33: 751–7.
- ²⁵ Radziwill G, Tucker W, Schaller H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol* 1990;64: 613–20
- ²⁶ Chotiyaputta W, Lok AS. Hepatitis B virus variants. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6: 453–62.
- ²⁷ Gurtsevitch VE. Human oncogenic viruses: hepatitis B and hepatitis C viruses and their role in hepatocarcinogenesis. *Biochemistry (Mosc).* 2008;73: 504–13.
- ²⁸ Mahtab MA, Rahman S, Khan M, Karim F. Hepatitis B virus genotypes: an overview. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008;7: 457–64.
- ²⁹ Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol* 2009;83: 10538–47.

-
- ³⁰ Bozdayı AM, Aslan N, Bozdayı G et al. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Arch Virol* 2004;149: 2115–29.
- ³¹ Glebe D, Urban S, Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 2007;13: 22–38.
- ³² Kann M, Schmitz A, Rabe B. Intracellular transport of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2007;13: 39–47.
- ³³ Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, Chisari FV. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 1995; 69: 6158–69
- ³⁴ Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res.* 2008;134: 235–49.
- ³⁵ Zhang, Y.Y., Zhang, B.H., Theele, D., Litwin, S. et al. Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy numbers in a hepadnavirus-infected liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100: 12372–7.
- ³⁶ Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2009;373: 582–92.
- ³⁷ El Chaar M, Candotti D, Crowther RA, Allain JP. Impact of hepatitis B virus surface protein mutations on the diagnosis of occult hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2010;52: 1600–10.
- ³⁸ Hsu YS, Chien RN, Yeh CT, et al. Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002;35: 1522–7.
- ³⁹ Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2009;373: 582–92.
- ⁴⁰ Takkenberg RB, Weegink CJ, Zaaijer HL, Reesink HW. New developments in antiviral therapy for chronic hepatitis B. *Vox Sang* 2010;98: 481–94.
- ⁴¹ Chu CM, Liaw YF. HBsAg seroclearance in asymptomatic carriers of high endemic areas: appreciably high rates during a long-term follow-up. *Hepatology* 2007;45: 1187–92.
- ⁴² Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, et al. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002;123: 1848–56.
- ⁴³ Bonino F, Brunetto MR. Chronic hepatitis B e antigen (HBeAg) negative, anti-HBe positive hepatitis B: an overview. *J Hepatol* 2003;39: 160–3.
- ⁴⁴ Chu CM, Liaw YF. Spontaneous relapse of hepatitis in inactive HBsAg carriers. *Hepatol Int* 2007;1: 311–5.
- ⁴⁵ Yu MW, Chang HC, Liaw YF, et al. Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives. *J Natl Cancer Inst* 2000;92: 1159–64.

-
- ⁴⁶ Chen CH, Hung CH, Lee CM, et al. Pre-S deletion and complex mutations of hepatitis B virus related to advanced liver disease in HBeAg-negative patients. *Gastroenterology* 2007;133: 1466–74.
- ⁴⁷ Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst* 2005;97: 265–72.
- ⁴⁸ Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroent* 2003;124: 327–34.
- ⁴⁹ Liaw YF, Sollano JD. Factors influencing liver disease progression in chronic hepatitis B. *Liver Int* 2006;26: 23–9.
- ⁵⁰ Nowak MA et al. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93, 4398–402
- ⁵¹ Girones R, Miller RH. Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology* 1989;170, 595–597
- ⁵² Locarnini S. Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. *Semin Liver Dis.* 2005;25: 9–19
- ⁵³ Chotiyaputta W, Lok AS. Hepatitis B virus variants. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*2009;6: 453–62.
- ⁵⁴ Allen MI et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical investigation Group. *Hepatology* 1998; 27, 1670–1677.
- ⁵⁵ Delaney WE 4th, Yang H, Westland CE, Das K et al. The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro. *J Virol* 2003;77: 11833–41.
- ⁵⁶ Li MW, Hou W, Wo JE, Liu KZ. Character of HBV (hepatitis B virus) polymerase gene rtM204V/I and rtL180M mutation in patients with lamivudine resistance. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2005;6: 664–7.
- ⁵⁷ Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology.* 2009;137:1593–608.
- ⁵⁸ Warner N, Locarnini S, Kuiper M, Bartholomeusz A, et al. The L80I substitution in the reverse transcriptase domain of the hepatitis B virus polymerase is associated with lamivudine resistance and enhanced viral replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51: 2285–92.

-
- ⁵⁹Carrouée-Durantel S, Durantel D, Werle-Lapostolle B, Pichoud C et al. Suboptimal response to adefovir dipivoxil therapy for chronic hepatitis B in nucleoside-naive patients is not due to pre-existing drug-resistant mutants. *Antivir Ther* 2008;13: 381–8.
- ⁶⁰ Zoulim F. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Res* 2004;64: 1–15.
- ⁶¹ Liaw YF, Gane E, Leung N, Zeuzem S et al. 2-Year GLOBE trial results: telbivudine is superior to lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2009;136: 486–95.
- ⁶² Sheldon J, Camino N, Rodés B, Bartholomeusz A et al. Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. *Antivir Ther* 2005;10: 727–34.
- ⁶³ Amini-Bavil-Olyaei S, Herbers U, Sheldon J, Luedde T et al. The rtA194T polymerase mutation impacts viral replication and susceptibility to tenofovir in hepatitis B e antigen-positive and hepatitis B e antigen-negative hepatitis B virus strains. *Hepatology* 2009;49: 1158–65.
- ⁶⁴ Takkenberg RB, Weegink CJ, Zaaijer HL, Reesink HW. New developments in antiviral therapy for chronic hepatitis B. *Vox Sang* 2010;98: 481–94.
- ⁶⁵ Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol* 2005;32: 102–12.
- ⁶⁶ Sayiner AA, Agca H, Sengonul A, Celik A et al. A new hepatitis B virus vaccine escape mutation in a renal transplant recipient. *J Clin Virol* 2007;38: 157–60.
- ⁶⁷ Carman WF, Trautwein C, van Deursen FJ, Colman K et al. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1996;24: 489–93.
- ⁶⁸ Torresi J, Earnest-Silveira L, Deliyannis G, Edgton K, et al. Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology* 2002;293: 305–13.
- ⁶⁹ Wang HC, Huang W, Lai MD, Su IJ. Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci* 2006;97: 683–8.
- ⁷⁰ Huy TT, Ushijima H, Win KM, Luengrojanakul P et al. High prevalence of hepatitis B virus pre-s mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. *J Clin Microbiol* 2003;41: 5449–55.

-
- ⁷¹ Cao Z, Bai X, Guo X, Jin Y et al. High prevalence of hepatitis B virus pre-S mutation and its association with hepatocellular carcinoma in Qidong, China. *Arch Virol* 2008;153: 1807–12.
- ⁷² Lucey MR, Graham DM, Martin P et al. Recurrence of hepatitis B and delta hepatitis after orthotopic liver transplantation. *Gut* 1992;33: 1390.
- ⁷³ O’Grady J, Smith HM, Davies SE et al. Hepatitis B virus reinfection after orthotopic liver transplantation. Serological and clinical implications. *J Hepatol* 1992;14: 104.
- ⁷⁴ Rosen HR. Disease recurrence following liver transplantation. *Clin Liver Dis* 2000;4: 675–89.
- ⁷⁵ Perrillo RP, Mason AL. Hepatitis B and liver transplantation. Problems and promises. *N Engl J Med* 1993;329: 1885.
- ⁷⁶ Samuel D, Mueller R, Alexander G. Liver transplantation in European patients with the hepatitis B surface antigen. *N Eng J Med* 1993;3: 1842–7.
- ⁷⁷ Ghany MG, Ayola B, Villamil FG et al. Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1998;27: 213–222.
- ⁷⁸ Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000;81: 67–74.
- ⁷⁹ Hannoun C, Horal P, Lindh M. Long-term mutation rates in the hepatitis B virus genome. *J Gen Virol* 2000;81: 75–83.
- ⁸⁰ Purdy MA, Talekar G, Swenson P, Araujo A, Fields H. A new algorithm for deduction of hepatitis B surface antigen subtype determinants from the amino acid sequence. *Intervirology* 2007;50: 45–51.
- ⁸¹ Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004;47:289–309.
- ⁸² Feray C, Zignego AL, Samuel D, Bismuth A et al. Persistent hepatitis B virus infection of mononuclear blood cells without concomitant liver infection. The liver transplantation model. *Transplantation* 1990;49: 1155–8
- ⁸³ O’Grady JG, Smith M, Davies SE, et al. Hepatitis B virus reinfection after orthotopic liver transplantation, serological and clinical implications. *J Hepatol* 1992;14: 104–11.
- ⁸⁴ Trautwein C. Mechanisms of hepatitis B virus graft reinfection and graft damage after liver transplantation. *J Hepatol* 2004;41: 362–9.

-
- ⁸⁵ Degertekin B, Han SH, Keeffe EB, Schiff ER et al. Impact of virologic breakthrough and HBIG regimen on hepatitis B recurrence after liver transplantation. *Am J Transplant* 2010 Aug;10: 1823–33.
- ⁸⁶ Marzano A, Gaia S, Ghisetti V, Carezzi S et al. Viral load at the time of liver transplantation and risk of hepatitis B virus recurrence. *Liver Transpl* 2005;11: 402–9.
- ⁸⁷ Jiang L, Yan L, Li B, Wen T et al. Prophylaxis against hepatitis B recurrence posttransplantation using lamivudine and individualized low-dose hepatitis B immunoglobulin. *Am J Transplant* 2010;10: 1861–9.
- ⁸⁸ Gish RG, McCashland T. Hepatitis B in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2006;12: S54–64.
- ⁸⁹ Roche B, Samuel D. Evolving strategies to prevent HBV recurrence. *Liver Transpl* 2004;10: S74–85.
- ⁹⁰ Seehofer D, Rayes N, Naumann U, Neuhaus R et al. Preoperative antiviral treatment and postoperative prophylaxis in HBV-DNA positive patients undergoing liver transplantation. *Transplantation* 2001;72: 1381–5.
- ⁹¹ Chun J, Kim W, Kim BG, Lee KL et al. High viremia, prolonged Lamivudine therapy and recurrent hepatocellular carcinoma predict posttransplant hepatitis B recurrence. *Am J Transplant* 2010;10: 1649–59
- ⁹² Papatheodoridis GV, Sevastianos V, Burroughs AK. Trends in the Management of Hepatitis B Virus Infection after Liver Transplantation. *Ann Gastroenterol* 2003;16: 113–23
- ⁹³ Lu AW, Zheng SS, Wu MP, Shen Y et al. Reevaluation of the effect of lamivudine therapy preoperative to prevent HBV recurrence after liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008;7: 357–61
- ⁹⁴ Lee HW, Suh KS, Yi NJ, Yang SH, Cho EH, Cho JY, et al. Preoperative lamivudine therapy in HBV DNA positive recipients: is it always necessary? *Hepatogastroenterology* 2007;54: 1783–1787.
- ⁹⁵ Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, Hann HW et al. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* 2003;124: 105–17.
- ⁹⁶ Cooke GS, Main J, Thursz MR. Treatment for hepatitis B. *BMJ* 2010;340: 5429
- ⁹⁷ Xie SB, Zhu JY, Ying Z, Zeng LJ et al. Prevention and risk factors of the HBV recurrence after orthotopic liver transplantation: 160 cases follow-up study. *Transplantation* 2010;90: 786–90.

-
- ⁹⁸ Kim WR, Terrault NA, Pedersen RA, Therneau TM et al. Trends in waiting list registration for liver transplantation for viral hepatitis in the United States. *Gastroenterology* 2009;137: 1680–6.
- ⁹⁹ Rosenau J, Tillmann HL, Bahr MJ, et al. Successful hepatitis B reinfection prophylaxis with lamivudine and hepatitis B immune globulin in patients with positive HBV-DNA at time of liver transplantation. *Transplant Proc* 2001;33: 3637–8.
- ¹⁰⁰ Seehofer D, Rayes N, Naumann U, et al. Preoperative antiviral treatment and postoperative prophylaxis in HBV-DNA positive patients undergoing liver transplantation. *Transplantation* 2001;72: 1381–5.
- ¹⁰¹ Steinmuller T, Seehofer D, Rayes N, et al. Increasing applicability of liver transplantation for patients with hepatitis B-related liver disease. *Hepatology* 2002;35: 1528–35
- ¹⁰² Karademir S, Astarcioglu H, Akarsu M, Ozkardesler S et al. Prophylactic use of low-dose, on-demand, intramuscular hepatitis B immunoglobulin and lamivudine after liver transplantation. *Transplant Proc* 2006;38: 579–83.
- ¹⁰³ Damerow H, Yuen L, Wiegand J, Walker C et al. Mutation pattern of lamivudine resistance in relation to hepatitis B genotypes: hepatitis B genotypes differ in their lamivudine resistance associated mutation pattern. *J Med Virol* 2010;82: 1850–8.
- ¹⁰⁴ Yatsuji H, Noguchi C, Hiraga N, Mori N et al. Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus variant with a substitution outside the YMDD motif. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50: 3867–74.
- ¹⁰⁵ Yeh CT, Chien RN, Chu CM, Liaw YF. Clearance of the original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* 2000;31: 1318–26.
- ¹⁰⁶ Gerolami R, Bourliere M, Colson P, Halfon P et al. Unusual selection of rtA181V HBV mutants cross-resistant to adefovir following prolonged lamivudine monotherapy: report of two cases. *Antivir Ther* 2006;11: 1103–1106.
- ¹⁰⁷ Tenney DJ, Levine SM, Rose RE, Walsh AW et al. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48: 3498–507.
- ¹⁰⁸ Colonna RJ, Rose R, Baldick CJ, Levine S et al. Entecavir resistance is rare in nucleoside naive patients with hepatitis B. *Hepatology* 2006;44: 1656–65.

-
- ¹⁰⁹ Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Vargas V et al. Genetic alterations in the S gene of hepatitis B virus in patients with acute hepatitis B, chronic hepatitis B and hepatitis B liver cirrhosis before and after liver transplantation. *Liver* 1999;19: 177–82.
- ¹¹⁰ Chen WN, Oon CJ. Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) mutants in Singapore adults and vaccinated children with high anti-hepatitis B virus antibody levels but negative for HBsAg. *J Clin Microbiol* 2000;38: 2793–4
- ¹¹¹ Jolivet-Reynaud C, Lésenéchal M, O'Donnell B, Becquart L et al. Localization of hepatitis B surface antigen epitopes present on variants and specifically recognised by anti-hepatitis B surface antigen monoclonal antibodies. *J Med Virol* 2001;65: 241–9.
- ¹¹² Katsoulidou A, Paraskevis D, Magiorkinis E, Moschidis Z et al. Molecular characterization of occult hepatitis B cases in Greek blood donors. *J Med Virol* 2009;81: 815–25.
- ¹¹³ Sayiner AA, Ozcan A, Sengonul A. Naturally occurring MHR variants in Turkish patients infected with hepatitis B virus. *J Med Virol* 2008;80: 405–10.
- ¹¹⁴ Ruiz-Tachiquín ME, Valdez-Salazar HA, Juárez-Barreto V, Dehesa-Violante M et al. Molecular analysis of hepatitis B virus "a" determinant in asymptomatic and symptomatic Mexican carriers. *Virol J* 2007;4: 6..
- ¹¹⁵ Zaaier HL, Torres P, Ontañón A, Ponte LG et al. Multiple surface antigen mutations in five blood donors with occult hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 2008;80: 1344–9.
- ¹¹⁶ Carman WF. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 1997;4: 11–20.
- ¹¹⁷ Lazarevic I, Cupic M, Delic D, Svirtlih NS et al. Prevalence of hepatitis B virus MHR mutations and their correlation with genotypes and antiviral therapy in chronically infected patients in Serbia. *J Med Virol* 2010;82: 1160–7.
- ¹¹⁸ Roznovsky L, Harrison TJ, Fang ZL, Ling R et al. Unusual hepatitis B surface antigen variation in a child immunised against hepatitis B. *J Med Virol* 2000;61: 11–4.
- ¹¹⁹ Chong-Jin O, Wei Ning C, Shiuan K, Gek Keow L. Identification of hepatitis B surface antigen variants with alterations outside the "a" determinant in immunized Singapore infants. *J Infect Dis* 1999;179: 259–63.
- ¹²⁰ Ireland JH, O'Donnell B, Basuni AA, Kean JD et al. Reactivity of 13 in vitro expressed hepatitis B surface antigen variants in 7 commercial diagnostic assays. *Hepatology* 2000;31: 1176–82.

-
- ¹²¹ Mimms L. Hepatitis B virus escape mutants: “pushing the envelope” of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1995;21: 884–7.
- ¹²² Suwannakarn K, Tangkijvanich P, Thawornsuk N, Theamboonlers A et al. Molecular epidemiological study of hepatitis B virus in Thailand based on the analysis of pre-S and S genes. *Hepatology* 2008;38: 244–51.
- ¹²³ Huang X, Qin Y, Zhang P, Tang G et al. PreS deletion mutations of hepatitis B virus in chronically infected patients with simultaneous seropositivity for hepatitis-B surface antigen and anti-HBs antibodies. *J Med Virol* 2010;82: 23–31.
- ¹²⁴ Zhang JM, Xu Y, Wang XY, Yin YK. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and heterologous subtype-specific antibodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin Infect Dis* 2007;44: 1161–9.
- ¹²⁵ Grottola A, Buttafoco P, Del Buono MG, Cremonini C et al. Pretransplantation pre-S2 and S protein heterogeneity predisposes to hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2002;8: 443–8.
- ¹²⁶ Trautwein C, Schrem H, Tillmann HL, Kubicka S et al. Hepatitis B virus mutations in the pre-S genome before and after liver transplantation. *Hepatology* 1996;24: 482–8.
- ¹²⁷ Carman WF, Trautwein C, van Deursen FJ, Colman K et al. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1996;24: 489–93.
- ¹²⁸ Choi MS, Kim DY, Lee DH, Lee JH et al. Clinical significance of pre-S mutations in patients with genotype C hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2007;14: 161–8.
- ¹²⁹ Huy TT, Ushijima H, Win KM et al. High prevalence of hepatitis B virus pre-S mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. *J Clin Microbiol* 2003;41: 5449–55.
- ¹³⁰ Ha-Lee YM, Lee J, Pyun H, Kim Y et al. Sequence variations of hepatitis B virus promoter regions in persistently infected patients. *Arch Virol* 2001;146: 279–92.
- ¹³¹ Bläckberg J, Kidd-Ljunggren K. Mutations within the hepatitis B virus genome among chronic hepatitis B patients with hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 2003;71:18–23.
- ¹³² Pontisso P, Poon MC, Tiollais P, Brechot C. Detection of hepatitis B virus DNA in mononuclear blood cells. *Br Med J* 1984;288: 1563–6.
- ¹³³ Bouffard P, Lamelin JP, Zoulim F, Lepot D, Trepo C. Phytohemagglutinin and concanavalin A activate hepatitis B virus in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 1992; 37(4):255–62.

-
- ¹³⁴ Repp R, Mance A, Keller C, Rhiel S et al. Detection of transcriptionally active hepatitis B virus DNA in peripheral mononuclear blood cells after infection during immunosuppressive chemotherapy using the polymerase chain reaction. *Arch Virol* 1992;4: 50–53.
- ¹³⁵ Köck J, Theilmann L, Galle P, Schlicht HJ. Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus. *Hepatology* 1996; 23: 405–413.
- ¹³⁶ Lu L, Zhang HY, Yueng YH, Cheung KF et al. Intracellular levels of hepatitis B virus DNA and pregenomic RNA in peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients. *J Viral Hepat* 2009;16: 104–12.
- ¹³⁷ Bai GQ, Li SH, Yue YF, Shi L. The study on role of peripheral blood mononuclear cell in HBV intrauterine infection. *Arch Gynecol Obstet*. 2010 [Epub ahead of print].
- ¹³⁸ Li SH, Yue YF, Zhang SL, Shi ZY et al. The role of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of HBV-infected mothers in the intrauterine infection of their fetuses. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2006;14: 264–7.
- ¹³⁹ Brind A, Jiang J, Samuel D, Gigou M et al. Evidence for selection of hepatitis B mutants after liver transplantation through peripheral blood mononuclear cell infection. *J Hepatol* 1997;26: 228–35.
- ¹⁴⁰ Datta S, Panigrahi R, Biswas A, Chandra PK et al. Genetic characterization of hepatitis B virus in peripheral blood leukocytes: evidence for selection and compartmentalization of viral variants with the immune escape G145R mutation. *J Virol* 2009;83: 9983–92.
- ¹⁴¹ Liu H, Liu YF. Liver transplantation for patients with viral hepatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2: 28–32
- ¹⁴² Tan J, Lok AS. Antiviral therapy for pre- and post-liver transplantation patients with hepatitis B. *Liver Transpl* 2007;13: 323–6.
- ¹⁴³ Roche B, Feray C, Gigou M, Roque-Afonso AM et al. HBV DNA persistence 10 years after liver transplantation despite successful anti-HBS passive immunoprophylaxis. *Hepatology* 2003;38: 86–95.
- ¹⁴⁴ Freshwater DA, Dudley T, Cane P, Mutimer DJ. Viral persistence after liver transplantation for hepatitis B virus: a cross-sectional study. *Transplantation* 2008;85:1105–11.