

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATİT B VİRUS DNA POLİMERAZ GENİ MUTASYONLARININ SAPTANMASI

AYLİN ŞENGÖNÜL

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2008

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATİT B VİRUS DNA POLİMERAZ GENİ MUTASYONLARININ SAPTANMASI

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

AYLİN ŞENGÖNÜL

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. A. Arzu Sayiner

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 03.KB.SAĞ.008 sayı ile desteklenmiştir.

TEŐEKKÜR

Bu tezin hazırlanması sırasında değerli görüő ve tecrübeleri ile çalıőmalarımı yönlendirerek yardımlarını esirgemeyen ve her konudaki desteklerini ve güvenlerini yanımda bulduğum tez danıőmanım Doç.Dr. A. Arzu Sayıner'e, eğitimim sürecinde değerli bilgi ve görüőlerinden yararlandığım Prof.Dr.Hakan Abacıoğlu'na, yetiőmemde emeği geçen diğer tüm oğretim üyelerine, çalışma hastalarının klinikleri hakkında bilgi veren Gastroenteroloji bilim dalı doktorlarına, laboratuvardaki yardımları ve dostlukları için tüm çalışma arkadaşlarıma, destekleri ile bana her zaman g veren aileme ve sevgili kızım Lal'e, gösterdikleri özveri ve anlayıő için teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	i
ŞEKİL LİSTESİ.....	ii
KISALTMALAR.....	iii
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	5
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	9
4. GENEL BİLGİLER.....	12
4.1. Tarihçe.....	12
4.2. Sınıflandırma.....	13
4.3. Genel özellikler.....	15
4.4. Genom yapısı.....	16
4.5. Replikasyon.....	18
4.6. Replikasyonu kontrol eden düzenleyici elemanlar.....	20
4.7. Virus proteinleri.....	21
4.7.1. Yüzey (kılıf) proteinleri.....	21
4.7.2. Kor proteinleri.....	24
4.7.3. P proteini.....	26
4.7.4. X proteini.....	26
4.8. Genotip ve subtipler.....	27
4.9. HBV mutasyonları.....	30
4.9.1. Yüzey (S) mutasyonları.....	31
4.9.2. Prekor ve kor mutasyonları.....	32
4.9.3. Polimeraz mutasyonları.....	34
4.9.4. X mutasyonları.....	38
4.10. Epidemiyoloji.....	38
4.10.1. Bulaş yolları.....	39
4.10.2. Risk grupları.....	41
4.11. Patogenez.....	41
4.12. Klinik.....	43
4.13. Tanı ve antiviral ajanlara direncin saptanması.....	46

4.13.1. Tanı.....	46
4.13.2. Antiviral ajanlara direncin saptanması.....	47
4.14. Kronik B Hepatitinde tedavi.....	50
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	53
5.1. GEREÇ.....	53
5.1.1. Çalışma grubu ve örnekler.....	53
5.1.2. Ayraçlar.....	54
5.1.2.1. Agaroz jel elektroforezi için kullanılan ayraçlar..	54
5.1.2.2. Viral nükleik asit ekstraksiyon kiti.....	55
5.1.2.3. dNTP karışımı	55
5.1.2.4. Taq DNA Polimeraz...55	
5.1.2.5. Kullanılan öncüller, dizileri ve hedef bölgeleri....	55
5.1.2.6. PZT ürünü saflaştırma kiti ...	56
5.1.2.7. HBV DNA kantitasyon kiti ...	56
5.1.2.8. “LiPA” kiti....	56
5.1.2.9. Restriksiyon Enzimleri.....	56
5.1.2.10. Yüksek rezolüsyonlu agaroz....	56
5.1.2.11. Klonlama ile ilgili reaktifler.....	56
5.1.2.12. Plazmit DNA izolasyon kiti.....	56
5.1.2.13. Klonlanmış HBV DNA polimeraz gen bölgesi fragmanları.....	56
5.2. YÖNTEM.....	57
5.2.1. Serum örneklerinden HBV-DNA'nın elde edilmesi.....	57
5.2.2. Agaroz jel elektroforezi	58
5.2.3. Artus HBV RG PCR kiti ile HBV DNA viral yük miktarının belirlenmesi.....	59
5.2.3.1. Serum örneklerinden HBV-DNA elde edilmesi...59	
5.2.3.2. HBV DNA'nın Real Art HBV RG PCR kiti kullanılarak kantitasyonu.....	59
5.2.4. DNA Dizi Analizi.....	61

5.2.4.1.	DNA dizi analizi dış PZT yönteminin basamakları.	61
5.2.4.2.	DNA dizi analizi iç PZT yönteminin basamakları	62
5.2.4.3.	PZT ürünlerinin saflaştırılması...	63
5.2.5.	Strip hibridizasyon (LiPA).....	63
5.2.5.1.	LiPA dış PZT yönteminin basamakları...	64
5.2.5.2.	LiPA iç PZT yönteminin basamakları..	64
5.2.5.3.	Strip Hibridizasyon (LiPA) yönteminin basamakları	65
5.2.6.	Restriksiyon enzim analizi (REA).....	67
5.2.6.1.	REA dış PZT yönteminin basamakları...	68
5.2.6.2.	REA iç PZT yönteminin basamakları..	69
5.2.6.3.	REA-1 yöntemi ile rt L180M mutasyonunu değerlendirme...	69
5.2.6.4.	REA-2 yöntemi ile YMDD motif mutasyonlarını değerlendirme...	71
5.2.7.	PZT ürününün klonlanması.....	72
5.2.7.1.	Ligasyon....	73
5.2.7.2.	Transformasyon...	74
5.2.7.3.	Plazmit DNA eldesi..	76
5.2.7.4.	Plazmit DNA'dan PZT...	77
5.2.7.5.	DNA dizi analizi...	77
6.	BULGULAR.....	79
6.1.	DNA dizi analizi, LiPA ve REA için yapılan PZT yöntemlerinin duyarlılığı.....	79
6.2.	Klonlanmış HBV DNA polimeraz gen bölgesi fragmanları ile REA-1 ve REA-2 yöntemlerinin deneme sonuçları.....	80
6.3.	Lamivudin direnç mutasyonlarının gelişme zamanı ve sıklığı	82
6.4.	Lamivudin tedavisinden önce YMDD mutanti saptanan olgunun klonlama sonuçları.....	85
6.5.	Serum HBV-DNA / ALT düzeyleri ile YMDD mutasyonları arasındaki ilişki.....	88

6.6.YMDD mutantlarının saptanmasında DA, LiPA ve REA yöntemlerinin sonuçlarının karşılaştırılması.....90

6.7. Lamivudin ile seçilen HBV pol/rt geni mutasyonları ile HBV S arasındaki ilişki.....94

6.8. Lamivudine dirençle ilişkili mutasyon saptanan olgularda dizi analizi yöntemi ile HBV DNA pol/rt genindeki diğer değişikliklerin belirlenmesi94

6.9. Olguların viral genotiplerinin belirlenmesi95

7. TARTIŞMA..96

8. KAYNAKLAR..105

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Ortohepadnaviridae ve avihepadnaviridae'nin genel özellikleri14

Tablo 2: HBV'nin antijenik subtipleri ile S bölgesindeki aminoasit pozisyonları arasındaki ilişki27

Tablo 3: HBV genotip ve subtiplerinin coğrafi dağılımı ve nükleotid farklılıkları28

Tablo 4: Lamivudin direncine neden olan mutasyonların gruplandırılması35

Tablo 5: HBV pol/rt geni lamivudin direnç mutasyonları ve S genindeki karşılıkları36

Tablo 6: Mutasyon analizi için kullanılan yöntemlerin karşılaştırması 50

Tablo 7: HBV RG PCR Kiti kantitasyon standartları.60

Tablo 8: Grup A'ya ait 15 olguda dizi analizi yöntemiyle saptanan lamivudin direnç mutasyonları83

Tablo 9: Grup B'de yer alan, lamivudin tedavisinin 12, 24 ve/veya 36. ay serum örneği bulunan 7 olgunun dizi analizi yöntemiyle saptanan direnç mutasyonları84

Tablo 10: Çalışma grubunun (Grup A ve B) tümünde, lamivudin tedavisinin 1. ve 3. yılında örneği bulunan olgular arasında direnç oranları85

Tablo 11: Grup A, 8 no'lu olgu: Lamivudin tedavisinden önce YMDD mutanı saptanan olgunun izleminde DA, LiPA ve REA yöntemleri ile belirlenen YMDD mutantları, viral yük ve ALT değerleri 86

Tablo 12: Lamivudin tedavisi sırasında YMDD mutasyonu gelişen 15 olgunun (grup A) tedavi öncesi viral yükleri ve tedavi sırasında YMDD mutasyonunun, virolojik ve biyokimyasal tedavi başarısızlığının ortaya çıkış zamanlarına ilişkin özellikleri89

Tablo 13: YMDD mutasyonlarının değerlendirilmesinde DA, LiPA ve REA yöntemlerinin birbirleriyle karşılaştırılması 91

Tablo 14: Lamivudin tedavisi almamış HBV ile infekte populasyonlarda YMDD varyantlarının saptanmasına ilişkin çalışmaların özeti 99

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: HBV partikülleri16

Şekil 2: HBV'nun genomik yapısı18

Şekil 3: HBV'nun replikasyon şeması20

Şekil 4: Akut HBV enfeksiyonunun haftalara göre seyri45

Şekil 5: INNO-LiPA testinin çalışma prensibinin şekilsel anlatım64

Şekil 6: INNO-LiPA testindeki problemlerin dizilimi ve strip örnekleri67

Şekil 7: REA-1 yöntemi ile rtL180M mutasyonunun belirlenmesi70

Şekil 8: REA-2 yöntemi ile YMDD motif mutasyonlarının belirlenmesi(rt M204V/I)72

Şekil 9: TA klonlama metodu ve pCR 2.1 vektör73

Şekil 10: DNA dizi analizi PZT yönteminde, HBV DNA pozitif kontrolün dilüsyonları ile yapılan çalışmadan elde edilen bant görüntüleri.79

Şekil 11: REA PZT yönteminde, kontrol serumunun dilüsyonlarına ait bant görüntüleri.80

Şekil 12: REA-1 yönteminde rtL180M mutasyonu içeren örneklerde Hsp92 II enzimi ile kesim sonrası elde edilen bant görüntüleri.81

Şekil 13: REA-2 yönteminde Nde I ve Hsp92 II enzimi ile kesim sonrası elde edilen bant görüntüleri.82

Şekil 14: Grup A, 8 no'lu hastanın lamivudin tedavisinden önceki serum örneğinde YMDD+YIDD saptandığını gösteren LiPA testine ait hibridizasyon şeridi.86

Şekil 15: Grup A, 8 no'lu hastanın tedavi öncesi (KlonTO1-6) ve tedavi sonrası (KlonTS1-7) serum örneklerinden elde edilen HBV-DNA klonlarının rt bölgesine ait aminoasit dizilerinin karşılaştırılması.87

KISALTMALAR

HBV: Hepatit B virusu

KHB: Kronik hepatit B

PZT: Polimerize zincir tepkimesi

Enh: Enhancer

LHBs: L protein

MHBs: M protein

SHBs: S protein

aa: Aminoasit

nt: nükleotid

KCFT: Karaciğer fonksiyon testleri

Bç: Baz çifti

HCC: Hepatosellüler karsinom

DR: "Direct repeats", tekrarlayan bölgeler

ORF: "Open reading frame", protein kodlayan bölge

HBsAg: Hepatit B yüzey antijeni

Anti-HBs: Hepatit B yüzey antijenine karşı antikor

ALT : Alanin aminotransferaz

AST : Aspartat aminotransferaz

LAM : Lamivudin

ADV: Adefovir

IFN: İnterferon alfa

cccDNA: "covalently closed circular DNA" kovalent kapalı sirküler DNA

DA: Dizi analizi yöntemi

LiPA: "Line probe assay", strip hibridizasyon yöntemi

REA: "Restriction fragment length polymorphisms; RFLP", Restriksiyon enzim analizi yöntemi

YMDD: Tirozin-metionin-aspartat-aspartat

YIDD: Tirozin-izolösin-aspartat-aspartat

YVDD: Tirozin-valin-aspartat-aspartat

1. ÖZET

HEPATİT B VİRUS DNA POLİMERAZ GENİ MUTASYONLARININ SAPTANMASI

Aylin ŞENGÖNÜL

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı,
Viroloji Referans Araştırma Laboratuvarı,
Sıhhiye-ANKARA

Anahtar sözcükler: HBV, lamivudin direnci, YMDD mutantları, LiPA, dizi analizi, restriksiyon enzim analizi

HBV, dünya nüfusunun üçte birinin karşılaştığı ve 350 milyondan fazla taşıyıcısı olan önemli bir sağlık sorunu etkenidir. Kronik B hepatiti, siroz ve hepatosellüler karsinomaya ilerleme potansiyeli nedeniyle tedavi edilmesi gereken ciddi bir hastalıktır. Tedavide interferon ve nükleozit analogları kullanılmaktadır. Nükleozit analogları arasında, etkinliği yüksek, iyi tolere edilen, ciddi yan etkisi olmayan ve diğer ilaçlara göre daha ucuz olan lamivudin (LAM), sık tercih edilen bir ilaçtır. LAM tedavisi sırasında ortaya çıkan ve dirence yol açan mutasyonlar, genellikle tedavinin 6-8. ayından sonra görülmeye başlanmakta ve ilacın kullanıldığı süreyle orantılı olarak yıllar içerisinde artış göstermektedir. Tedavi başarısını izlemek ve başarısızlık halinde alternatif ilaçlarla tedaviye devam edebilmek için lamivudine karşı direnç gelişiminin saptanması önemlidir.

Tedavi sırasında HBV pol geninde saptanan değişikliklerin izlenmesi ve bildirilmesi, yeni ilaç direnç paternlerinin ve klinik sonuçlarının tanımlanmasını sağlayacaktır. Bu bilgilerden yola çıkarak planladığımız çalışmamızda,

- 1) LAM direnç mutasyonlarının gelişme sıklığının ve zamanının belirlenmesi,
- 2) HBV polimeraz geninde oluşan YMDD motif mutasyonlarının saptanması için dizi analizi (DA), restriksiyon enzim analizi (REA) ve strip hibridizasyon (LiPA) yöntemlerinin karşılaştırılması,

- 3) LAM direnç mutasyonu saptanan olgularda, mutasyonun saptanma zamanı ile viral yük / ALT değerlerindeki artış arasındaki ilişkinin belirlenmesi,
- 4) LAM direnç mutasyonları ile çakışan bölgedeki S mutasyonlarının incelenmesi,
- 5) HBV-DNA polimeraz geninde oluşan diğer sekans değişikliklerinin belirlenmesi
- 6) Olguların viral genotip ve subtiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma grubumuz, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'nın izlediği kronik B hepatiti nedeniyle lamivudin tedavisi başlanan olgulardan oluşturulmuş ve iki alt grupta değerlendirilmiştir.

Grup A: En az bir yıl izlenen, tedavi öncesi ve tedavinin 3, 6, 9, 12. ayına ait seri serum örneği bulunan 30 olgu ve

Grup B: Seri örnekleri olmayan ancak tedavinin farklı zamanlarına ait serumları bulunan 16 olgu. Bu gruptaki 11 olgunun 12. ay, 14 olgunun 24. ay ve 9 olgunun 36. ay serum örneği vardı.

Grup A'da yıllar içinde dizi analizi yöntemi ile YMDD mutanti gelişme oranları değerlendirildi. YMDD mutanti saptanan olgu sayısı, tedavinin birinci yılında 6/30 (%20), ikinci yılında 8/20 (%40), üçüncü yılında 4/10 (%40) idi. Grup A ve Grup B olgularının tümü için dizi analizi ve LiPA yöntemleri ile saptanmış olan YMDD mutantlı olguların oranı lamivudin tedavisinin birinci yılı sonunda %23.1 (9/39 olgu), 2. yılı sonunda %36.4 (12/33 olgu), 3. yılı sonunda %35.0 (7/20 olgu) idi.

Lamivudin tedavisi alan olguların izlemi ile elde edilen ve tedavinin farklı basamaklarına ait (tedavi öncesinde, sırasında ve sonrasında) toplam 123 serum örneğinin dizi analizi sonuçları, LiPA ve REA yöntemlerinin sonuçları ile karşılaştırıldı. Varyantları saptamada LiPA testinin, DA ve REA'dan daha başarılı olduğu gözlemlendi. LiPA testi kodon 204 için minör viral populasyonları saptamada, DA'ne göre 4/123 örnekte (%3,25) daha duyarlıydı. LiPA testi, REA'ya göre, kodon 180 için 64/123 örnekte (%52), kodon 204 için 63/123 örnekte (%51,2) daha duyarlı bulundu. DA ve LiPA sonuçları, kodon 180 için %99,9 (122/123 örnek), kodon 204 için %94,3 (116/123 örnek) oranında birbirleriyle uyumlu saptandı. LiPA testi, genellikle minor populasyonları yakalamada daha başarılı olmakla birlikte, kodon 180 için bir, kodon 204 için bir olmak üzere toplam iki örnekte, karışık viral populasyonlardan birini

saptayamadı. Bir hastanın iki örneğinde ise DA ile rtM204I mutasyonu belirlenirken, LiPA ile 204. kodona ait yabancı ve mutant diziyeye özgü problemlerden hiçbirinde hibridizasyon bandı oluşmamıştı.

REA yönteminin 10^3 kopya/ml'nin altındaki HBV DNA düzeylerinde sonuç veremediği saptandı ve 62 örneğin (%50.4) sonucu elde edilemedi. DA yönteminin karışık viral popülasyona sahip örnekleri saptamada, REA ile karşılaştırıldığında, kodon 180 için %52.0 (64/123 örnek), kodon 204 için %52.8 (65/123 örnek) oranında daha duyarlı olduğu saptandı. Bu örneklerde REA yöntemi ile ya viral yüke bağlı olarak hiç sonuç alınamamış veya karışık viral popülasyonlu örneklerdeki minör tipler saptanamamıştı. Çalışmamızda REA yönteminin, DA'ne göre kodon 204 için sadece bir örnekte, LiPA'ya göre kodon 180 için 1, kodon 204 için 1 örnekte karışık viral popülasyonları tanımlamada daha başarılı olduğu saptandı.

Çalışmamızda, hasta grubunun %50'sinde YMDD mutanti saptanırken, YMDD mutantına sahip olguların %80'inde (12/15 olgu) viral direnç geliştiği gözlemlendi. YMDD mutanti gelişen olgularda, mutasyonlar ortalama 18,8. ayda belirlendi. Mutasyonlar en erken (bir olguda) tedavinin 3. ayında saptandı. YMDD mutantlarının saptanmasından ortalama 5 ay sonra viral yükte anlamlı artış olduğu görüldü. ALT yükselmesi, genellikle (11 olgu) viral yük artışından sonra gelişti ve tedavinin ortalama 26. ayından sonra saptandı.

Lamivudin tedavisinden önce Grup A' ya ait 30 olgudan sadece 1'inde (%3.3) dizi analizi (DA) ve LiPA yöntemleri ile YMDD mutanti saptandı. Örnekte, rtM204I mutasyonu, minör popülasyonu oluşturmaktaydı ve baskın yabancı tip ile birlikteydi. Tedaviden önce saptanan YIDD mutantının, tedavinin başlamasıyla kaybolduğu, tedavinin 30. ayında DA ve LiPA yöntemleri ile tekrar saptandığı görüldü. Tedavi öncesi örnekte, DA ve LiPA yöntemleri ile saptanmış olan YMDD ve YIDD dizili viral popülasyonların varlığı, klonal analiz ile doğrulandı. Tedavinin 9. ayındaki serum örneğinden yapılan klonal analizde ise elde edilen yedi klonun tümünün YMDD dizisi taşıdığı saptandı.

Çalışmamızda, A grubu olgularda lamivudin tedavisi sırasında ilk gözlenen YMDD mutasyonları sıklık sırasıyla, YIDD (6 olgu), YMDD+YIDD (4 olgu), YMDD+YIDD+YVDD (3 olgu), YIDD+YVDD (1 olgu), YVDD (1 olgu) olarak belirlendi. Mutasyon saptanan beş olgunun izleminde, mutasyonlardaki ardışık değişiklikler

benzer bir patern gösteriyordu. Bu olgularda yabancı tip viruslar yerini öncelikle YIDD mutantlarına bırakıyor, bir süre sonra YIDD mutantlarından YVDD mutantlarına geçiş gözleniyordu. Olgularımızda, kompensatuar rt L180M mutasyonu, YVDD/YIDD mutasyonu ile aynı zamanda veya daha sonra saptandı. On iki olguya ait 16 örnekte saptanan rtL80I/V mutasyonlarının 13'ünde YIDD, üçünde YIDD + YVDD bulunuyordu.

Lamivudin tedavisine direnç geliştiren olgularımızda rtM204I, rtM204V, rtV173L polimeraz mutasyonlarının, S bölgesinde sırasıyla W196L/S, I195M, E164D mutasyonlarına yol açtığı saptandı.

Lamivudin direnç mutasyonu saptanan olgularda; HBV DNA pol/rt geninde dizi analizi yöntemi ile N76D (3 olgu), R110G (2 olgu), L115Y, S117Y, N123D, G127R, T128N (2 olgu), T128I, N139K, L144C, L145M, T184I, V214E, S219A, F221Y, T225N L229W, L231V, P237H, N238H, Y245H, K270R değişiklikleri gözlemlendi.

30 olgunun serum örneğinde, dizi analizi yöntemi kullanılarak HBV genotipleri değerlendirildi. Filogenetik analiz sonucu; tüm olgulara ait dizilerin, **Genotip D** dizileriyle birlikte kümelendiği görüldü. Olgulardan 7'sinin (%23,3) **ayw3**, 23'ünün (%76,7) **ayw2** subtipi ile infekte olduğu belirlendi.

2. SUMMARY

DETECTION OF HEPATITIS B VIRUS DNA POLYMERASE GENE MUTATIONS

Aylin ŞENGÖNÜL

Refik Saydam Hygiene Center,
Department of virology,
Sihhiye-ANKARA, TURKEY

Key words: HBV, lamivudine resistance, YMDD mutants, line probe assay, sequencing, restriction fragment length polymorphisms

HBV is an important health problem affecting one third of the world population and more than 350 million people being carriers. Chronic B hepatitis is a serious disease which must be treated because of its potential to progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Interferon and nucleoside analogs are used for treatment. Among the nucleoside analogs, lamivudine (LAM) is frequently the drug of choice because of its high efficacy, good tolerability, low rate of adverse effects and low cost compared with other drugs. Mutations that arise during LAM treatment and cause resistance are usually seen at the 6th-8th months of treatment and the frequency increases with the duration of treatment. LAM resistance should be determined in order to monitor treatment success and to continue treatment with alternative drugs.

Monitoring and reporting of changes in HBV pol gene during treatment will help to define the new drug resistance patterns and clinical consequences. Based on these data, this study aimed to

1. Determine the incidence and timing of development of LAM resistance mutations,
2. Compare sequence analysis, restriction enzyme analysis (REA) and strip hybridization (LiPA) in determining YMDD motif mutations in HBV pol gene,
3. Determine the relationship between the timing of mutation appearance and rise in viral load / ALT level in cases with LAM resistance mutation,
4. Examine S mutations in regions that overlap with LAM resistance mutations,

5. Determine other sequence changes that develop in HBV DNA pol gene,
6. Determine the viral genotype/subtypes of the cases.

The study group has been composed of chronic B hepatitis cases who were followed by the Dokuz Eylül University Medical Faculty, Division of Gastroenterology and in whom lamivudine treatment was started. The study population was divided into two subgroups:

Group A (n=30): Cases who were followed-up for at least one year and of whom serial serum samples from the pretreatment period and of 3rd, 6th, 9th and 12th months of treatment were available.

Group B (n=16): Cases who did not have serial serum samples but who could provide samples from time periods of the treatment. In this group, eleven of the cases had a sample from the 12th month, 14 cases had a sample from the 24th month and 9 cases had a sample from the 36th month of treatment.

Emergence ratio of YMDD mutants in Group A was evaluated according to the years by sequencing. Number of cases who have YMDD mutants was 6/30 (20%) in first year, was 8/20 (40%) in second year and was 4/10 (40%) in third year. For all cases of Group A and Group B, ratio of cases with YMDD mutant determined by sequencing and LiPA method was 23.1% (9/39 cases) end of the 1st year of lamivudine therapy, was 36.4% (12/33 cases) at the end of the 2nd year and was 35.0% (7/20 cases) at the end of the 3rd year.

The results of sequencing analysis of 123 serum samples obtained from followed-up cases who treated with lamivudine at different stage of therapy (before, during and after therapy) were compared with the results of LiPA and REA methods. LiPA test was more successful than sequencing and REA for the determination of variants. LiPA test was more sensitive to determine of minor viral populations for codon 204 than sequencing analysis by 3.25% for 4/123 samples. It was observed the LiPA test was more sensitive than REA for 64/123 samples at codon 180 by 52% and for 63/123 samples at codon 204 by 51.2%. Results of sequencing and LiPA were in consistence by 99.9% for codon 180 (122/123 samples) and by 94.3% for codon 204 (116/123 samples). Although LiPA test is usually more successful to detect the minor

populations , it could not detect one of the mixed viral populations in two samples (one for codon 180, one for codon 204). While for two samples of a patient, rt M204I mutation was detected by sequencing, hybridization bands for YMDD and mutant sequence specific probes were not observed by LiPA.

REA method could not give any results below 10^3 copy/mL HBV-DNA level and any results were obtained for 62 samples (50.4%). Sequencing method was more sensitive to detect samples containing mixed viral populations than REA for codon 180 by 52.0% (64/123 samples), for codon 204 by 52.8 (65/123 örnek). In these samples either any results were obtained with REA method because of viral load or could not be detected minor types in mixed viral populations. REA method was more successful than sequencing to identify mixed viral populations for only one sample at codon 204 and than LiPA for one sample at codon 180 and one sample at codon 204.

In this study while YMDD mutant was detected in 50% of the patient group, the viral resistance was observed for 80% of cases (12/15 cases) have YMDD mutant. In cases with YMDD mutants, mutations were detected at the 18.8th month. Mutations were detected at least 3rd month of therapy (one case). Significant increase was observed for viral load at average 5 months later than detected YMDD mutations. Generally ALT elevations were occurred after an increase of viral load and were detected after at average 26th months of therapy.

YMDD mutant was detected for only one case in Group A (n=30) with sequencing and LiPA methods before LAM treatment. rtM204I mutation was constituted the minor population and together with dominant YMDD type. YIDD mutant observed before therapy disappeared with starting therapy and again was detected with sequencing and LiPA methods at the 30th months of therapy. Existence of viral populations with YMDD and YIDD sequences detected by sequencing and LiPA was confirmed by clonal analysis for pretreatment sample. It was observed that all seven clones obtained from clonal analysis of the serum sample at 9th months of therapy had YMDD sequences.

The first observation YMDD mutations were YIDD (6 cases), YMDD+YIDD (4 cases), YMDD+YIDD+YVDD (3 cases), YIDD+YVDD (1 case) in study group A cases during LAM therapy. In 5 cases who developed a mutation, we were capable of

determining a pattern of consecutive mutations. In these cases first exchange YMDD viruses with YIDD mutants and after a while a shift from YIDD mutants to YVDD mutants are observed. In cases compensatory rtL180M mutation was observed at the same time with YVDD/YIDD mutation or later. 13 of rtL80I/V mutations detected at 16 samples in 12 cases has YIDD mutation and 3 of mentioned samples has YIDD+YVDD mutation.

In cases who developed LAM resistance, W196S/L, I195M, E164D mutations in the S gene produced as a consequence of the rt M204I, rtM204V, rtV173L mutations in the polymerase gene.

N76D (3 cases), R110G (2 olgu), L115Y, S117Y, N123D, G127R, T128N (2 cases), T128I, N139K, L144C, L145M, T184I, V214E, S219A, F221Y, T225N L229W, L231V, P237H, N238H, Y245H, K270R sequence changes detected by sequencing were observed in the pol gene of cases with LAM resistance mutations.

In serum samples of 30 cases, HBV genotypes were evaluated using by sequencing. As a result of phylogenetic analysis, sequences of all cases was observed that clustered with genotype D sequences. It was determined, 7 of cases infected with *ayw3* subtype (23.3%) and 23 of cases infected with *ayw2* subtype (76.7%).

3. GİRİŞ VE AMAÇ

HBV, dünya nüfusunun üçte birinin karşılaştığı ve 350 milyondan fazla taşıyıcısı olan önemli bir sağlık sorunu etkenidir. Türkiye’de, bölgelere göre farklılık olmakla birlikte, ortalama % 6 oranında HBsAg pozitifliği bildirilmiştir (1).

Kronik B hepatiti, siroz ve hepatosellüler karsinomaya ilerleme potansiyeli nedeniyle tedavi edilmesi gereken ciddi bir hastalıktır. Tedavide interferon ve nükleozit analogları kullanılmaktadır. Nükleozit analogları arasında, etkinliği yüksek, iyi tolere edilen, ciddi yan etkisi olmayan ve diğer ilaçlara göre daha ucuz olan lamivudin (LAM), sık tercih edilen bir ilaçtır. LAM tedavisi sırasında ortaya çıkan ve dirence yol açan çıkan mutasyonlar, genellikle tedavinin 6-8. ayından sonra görülmeye başlanmakta ve ilacın kullanıldığı süreyle orantılı olarak yıllar içerisinde artış göstermektedir. Birinci yıl %15 olan direnç oranı, dördüncü yılda %67’ye yükselmektedir (2, 98). Yapılan son çalışmalarda, antiviral tedavi alan KHB hastalarında tedavinin çok erken dönemlerinde (2. ve 4. haftasında) bile YMDD mutasyonlarına rastlanabildiği bildirilmektedir (107). LAM direnci ile ilişkili HBV varyantlarının, daha önce LAM tedavisi almamış kronik veya asemptomatik HBV hastalarında gözlenebildiğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır ve sayıları giderek artmaktadır (108, 109, 111, 143). Bu nedenle antiviral tedavi planlanan hastalarda, tedaviye başlamadan önce bu varyantların bulunup bulunmadığının araştırılmasının gereği, yeni çalışmaların sonuçlarına göre belirlenecektir.

Tedavi başarısını izlemek ve başarısızlık halinde alternatif ilaçlarla tedaviye devam edebilmek için lamivudine karşı direnç gelişiminin saptanması önemlidir. Lamivudine direnç gelişimini izlemede, viral popülasyon içindeki düşük viral titrelerdeki varyant HBV’leri bile saptayabilecek, duyarlı, kantitatif testlere gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla dizi analizi (DA), LIPA yöntemi, restriksiyon enzim analizi (REA) ve gerçek zamanlı PZT yöntemleri kullanılabilir (3,4,98). Bu yöntemlerden altın standart olarak kabul edilen dizi analizi, iş yükü fazla olan ve pahalı ekipman gerektiren bir yöntemdir. LIPA yöntemi ise ticari bir kit ile uygulanabilen standart bir yöntem olmasına karşın pahalı olması kullanımını kısıtlamaktadır. REA ise, tasarım aşaması ve değerlendirmesi güç fakat maliyeti yönünden diğerlerine göre daha uygun bir yöntemdir (3). Önemli diğer bir konu ise LIPA ile örnekteki virus popülasyonunun %10’unu oluşturan minor suşların bile

tanımlanabilmesi, dizi analizi yöntemi ile ancak popülasyonda %50 ve üzeri bulunan dizilerinin saptanabilmesidir (118). Bu nedenlerle antiviral tedavi alan hastalarda klinik takipte kullanılacak yöntemlerin seçiminde, rutinde kullanılabilir olmaları, kısa sürede sonuç vermeleri, yoğun iş yükü gerektirmemeleri, maliyetlerinin düşük olması ve en önemlisi tedaviye karşı direnç gösterebilecek mutant virusların minör popülasyonlarını erken dönemde yakalayabilme özellikleri göz önünde bulundurulmaktadır.

Viral direnç, tedavi ile sağlanan viral replikasyonun baskılanmasından sonra serum HBV-DNA düzeylerinde meydana gelen artış (1 log₁₀ ve üstü) olup ya uygunsuz tedavi ya da ilaca dirençli mutantların ortaya çıkmasıyla meydana gelmektedir (126). Genellikle lamivudin direncinin primer sorumlusu olan YMDD motif mutasyonunun saptanmasından bir süre sonra gelişmektedir. Fakat mutasyon saptanan hastalarda her zaman viral direnç gözlenmemektedir (118,127). Viral yükteki artış, sıklıkla karaciğer hastalığının alevlenmesinden önce olmaktadır. Lamivudin direnç mutasyonları, tedavi öncesi HBV DNA ve ALT düzeyi yüksek olan olgularda daha sık gözlenmektedir (68,74,129). LAM direnci gelişme riskinin, HBV genotip/subtipi ile ilişkisi, tartışmalı konulardan biridir. Direnç gelişme riskinin HBsAg'nin adw tipinde ayw tipine göre daha fazla bildirilmiştir (50).

YMDD mutant tipinin, klinik sonuçlar üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu çalışmalardan birinde YMDD mutant tipinin farklı özelliklere bağlı olarak ortaya çıktığı ve virolojik/ biyokimyasal relapsla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (129). Bazı yazarlar ise mutasyon paternleri ile klinik seyir arasında belirgin bir ilişki olmadığını bildirmektedir (130).

Lamivudin ile seçilen HBV pol/rt mutasyonlarının S geninde de mutasyonlara yol açabildiği ve buna bağlı olarak antijenik özelliği etkilenen HBsAg proteininin, invitro olarak antikörelere azalmış affinite gösterdiği bilinmektedir. Ancak bu değişikliğin biyolojik ve klinik sonuçları net değildir(104,124,125).

Tedavi sırasında HBV pol geninde saptanan değişikliklerin izlenmesi ve bildirilmesi, yeni ilaç direnç paternlerinin ve klinik sonuçlarının tanımlanmasını sağlayacaktır. Bu bilgilerden yola çıkarak planladığımız çalışmamızda,

1) LAM direnç mutasyonlarının gelişme sıklığının ve zamanının belirlenmesi,

- 2) HBV polimeraz geninde oluşan YMDD motif mutasyonlarının saptanması için dizi analizi (DA), restriksiyon enzim analizi (REA) ve strip hibridizasyon (LiPA) yöntemlerinin karşılaştırılması,
- 3) LAM direnç mutasyonu saptanan olgularda, mutasyonun saptanma zamanı ile viral yük / ALT değerlerindeki artış arasındaki ilişkinin belirlenmesi,
- 4) LAM direnç mutasyonları ile çakışan bölgedeki S mutasyonlarının incelenmesi,
- 5) HBV-DNA polimeraz geninde oluşan diğer sekans değişikliklerinin belirlenmesi
- 6) Olguların viral genotip ve subtiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma grubumuz, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'nın izlediği kronik B hepatiti nedeniyle lamivudin tedavisi başlanan olgulardan oluşturulmuş ve iki alt grupta değerlendirilmiştir.

Grup A: En az bir yıl izlenen, tedavi öncesi ve tedavinin 3, 6, 9, 12. ayına ait seri serum örneği bulunan 30 olgu ve

Grup B: Seri örnekleri olmayan ancak tedavinin farklı zamanlarına ait serumları bulunan 16 olgu. Bu gruptaki 11 olgunun 12. ay, 14 olgunun 24. ay ve 9 olgunun 36. ay serum örneği vardı.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Tarihçe

Hepatit, karaciğerin inflamasyonu ve nekrozudur. Sarılıktan ilk söz eden Babil Talmudları ve Hipokrat'ın yazıları olmasına karşın, bulaşıcı sarılığa ait ilk gözlemler, birkaç binyıl önce Çinliler'den gelmiştir (1). Viral hepatit tanımı ise ilk olarak M.Ö. 5. yüzyıla dayanmaktadır (5). Viral hepatite bağlı salgınlar ise ilk olarak 19. yüzyılda dikkat çekmiştir. Bu salgınların çoğu olasılıkla hepatit A virusuna bağlıdır. HBV'nin epidemik bulaşı ise kan ve kan ürünleri kullanımının yaygın olduğu yerlerde gözlenmeye başlamıştır (6).

Kan ve kan ürünleri ile bulaşan hepatit formu ilk kez, 1883 yılında Lurman tarafından, Bremen'de çiçek aşısı yapılan 1289 tersane işçisinin 191'inde, aşı uygulamasından sonra sarılık ortaya çıktığında saptanmıştır (1,5). Viral hepatit 19. yüzyılda kızamık ve kabakulak immun profleksisi amacıyla plazma verilen kişilerde insan serumu ihtiva eden sarı humma aşısı yapılan askeri personelde, kontamine iğnelerin kullanıldığı cinsel yolla bulaşan hastalıklar kliniklerinde tedavi gören hastalarda yaygın olarak görülmeye başlamış ve II. Dünya Savaşı sırasında kan transfüzyonu yapılan askerlerde ciddi sorunlara neden olmuştur (1,7).

Gönüllü mahkumlar üzerinde 1930'lu yıllarda yapılan çalışmalarla infeksiyöz hepatit ve serum hepatiti etkenlerinin birbirinden ayırt edici özellikleri hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir (1,7). 1943 yılında A.B.D.'de bulaşıcı hepatit "infeksiyöz hepatit" olarak isimlendirilirken, İngiltere Sağlık Bakanlığı aynı yıl bir memorandum ile kan, plazma ve serum naklinden sonra gelişen sarılıkları "homolog serum sarılığı" adı altında toplamıştır. 1947 yılında McCallum, infeksiyöz hepatit için "hepatit A", serum hepatiti için ise "hepatit B" deyimlerini kullanmıştır (8).

Krugman ve arkadaşları, 1950'li yılların sonu ile 1960'lı yılların ilk yarısında New York 'da özürü çocuklar üzerinde yürüttükleri çalışmalar sonucunda epidemiyolojik, klinik ve immünolojik olarak birbirinden farklı iki ayrı hepatit virusunun varlığını doğrulamışlardır. Bu okulda yapılan çalışmalarda hepatitli hastalardan sarılığın başlamasından hemen önce alınan serum karışımı önce oral yoldan çocuklara verilmiş ve kısa bir süre sonra sarılık meydana geldiği gözlenmiştir. Altı ay sonra bu çocuklara aynı serum karışımı intramüsküler yoldan verilmiş ve çocuklarda

ilk sarılıktan daha uzun kuluçka süreli, yavaş yavaş yükselen, ama uzun süre yüksek seviyelerde seyreden KCFT titreleri ile karakterize ikinci bir sarılık geliştiği gözlenmiştir. İki virüsle farklı zamanlarda infekte "M.S." isimli çocuktan sarılığın başlamasından hemen önce alınan serum örnekleri MS-1 ve MS-2 olarak isimlendirilmiştir (1). Bunların başka çocuklara oral ve intramusküler yoldan verilmesi sonucunda inkübasyon süreleri farklı, iki tip etkenin varlığı ortaya konmuş, MS-1'in hepatit A (kısa kuluçka süreli hepatit, infeksiyöz hepatit) MS-2'nin ise hepatit B (uzun kuluçka süreli hepatit, serum hepatiti) virüsü olduğu anlaşılmıştır. Aynı araştırmacılar HBV'li serumları sulandırıp bir dakika kaynattıktan sonra gönüllülere vermiş ve bu kişilerde sarılık oluşmadığını, dahası HBV'ye karşı korunduklarını gözlemişlerdir. Bu sürpriz gelişme hepatit B aşısının gelişiminde büyük rol oynamıştır. Ayrıca bu viruslardan birine karşı gelişen bağışıklığın diğeri için koruyucu olmadığı da gösterilmiştir (1).

HBV'nin tarihçesinde bir diğere önemli olay Blumberg ve arkadaşlarının 1965 yılında insan serum proteini polimorfizmini incelerken serumda yeni bir antijeni bulmalarıdır. Antijen ilk olarak hemofili hastası olan ve çok sayıda kan transfüzyonu yapılmış olan Avustralya'lı bir yerlinin serumunda bulunmuş olup, jelde gerçekleşen presipitasyon ile varlığı saptanmıştır (7). Günümüzde hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) olarak bilinen bu proteine "Avustralya antijeni-Au antijeni" adını vermişlerdir (1). Dane ve arkadaşları 1970'de HBV'nin kısmen saflaştırılmış preparatlarının elektron mikroskopik incelemelerinde üç değişik partiküle rastlamışlardır (1,7). Bunlardan infeksiyöz özelliğe sahip, 42 nm çapında olanlara "Dane partikülü" adı verilmiş ve sonraki yıllarda, kor antijeni, DNA polimeraz ile viral DNA tanımlanmıştır (8).

4.2. Sınıflandırma

HBV Hepadnaviridae ailesinin prototipidir (5). HBV'nin keşfinden sonra bazı memeli hayvanlar ile kuşlarda hepatite neden olan farklı yeni virüsler bulunmuştur. 1978 yılında kronik aktif hepatit ve hepatomalı dağ sıçanı (*Marmata monax*) otopsislerinde sık bulunan ve "woodchuck hepatitis virus" (WHV) adı verilen yeni bir virüs keşfedilmiş, başlangıçta Philadelphia hayvanat bahçesindeki dağ sıçanlarında gösterilen bu etkenin Pennsylvania, Maryland ve New Jersey'de yaşayan yabani dağ sıçanlarında da bulunduğu saptanmıştır (7). 1980 yılında Kuzey California'da

yaşayan vahşi yer sincaplarından (*Spermophilus beecheyi*) “ground squirrel hepatitis virus” (GSHV) izole edilmiştir (9). Yapılan nükleotid dizi analiz çalışmaları sonucunda, HBV ile GSHV ve morfolojik olarak insan HBV'sinden ayrılması çok zor olan WHV arasında yaklaşık %70 homoloji bulunduğu gösterilmiştir. Ancak her iki virüs (WHV ve GSHV) da kendilerine özgü türler dışındaki diğer türlerde (insan ve primatlarda) infeksiyon oluşturmazlar (10).

Sonraki yıllarda A.B.D.'de HCC'li pekin ördeklerinde “duck hepatitis B virus” (DHBV)'un varlığına dikkat çekilmiş, aynı etkene Virginia, California, Illionis eyaletlerindeki ticari ördek sürülerinde de rastlanmıştır ve virüs deneysel olarak evcil kazlara da nakledilebilmiştir. Kronik DHBV infeksiyonu, genellikle in-vivo geçiş sonrası çalışılmakta olduğu için, özellikle hepadnavirus replikasyonunun incelenmesi amacı ile kullanılmaktadır (11).

Hepadnaviridae ailesinde bulunan virusların, konak farklılığı, viryon ince yapısı, polipeptit büyüklüğü, gen sayısı, genom nükleotid dizi homolojisi ve antijenik çapraz reaksiyonlar dikkate alındığında, memeli hayvan viruslarının bulunduğu **orthohepadnavirus** (HBV, WHV, GSHV) ve kanatlı hayvan viruslarının bulunduğu **avihepadnavirus** (DHBV) olmak üzere iki cins altında sınıflandırılması önerilmektedir (7,12).

Tablo 1: Ortohepadnaviridae ve avihepadnaviridae'nin genel özellikleri (1).

Özellik	Ortohepadnaviridae (HBV,WHV,GSHV)	Avihepadnaviridae (DHBV)
Genom	3.2-3.3 kb	3.0 kb
Viryon çapı	40-42 nm.	46-48 nm.
DNA	Kısmen çift sarmallı	Tamamlanmış çift sarmallı
Konak	Memeli hayvanlar ve insanlar	Kanatlı hayvanlar

Son yıllara kadar HBV'nin sadece insanlarda infeksiyon oluşturduğu düşünülmeyle birlikte, doğadan yeni yakalanmış bazı şempanze, gibbon ve orangutan gibi hayvanların kanında HBsAg saptanmış olması bu virüsün insanlardan başka primatlarda da hastalık oluşturulabildiğini düşündürmektedir. Söz konusu

hayvanlarda anti-HBs'nin de tespit edilmiş olması HBV ile önceden infekte olduklarını göstermektedir (13,14). Deneysel olarak şempanze ve bazı yüksek primatlarda subklinik HBV infeksiyonu oluşturulabilmesine rağmen, rat, fare, dağ sıçanı ve sincaplarda başarılı olunamamıştır.

4.3. Genel özellikler

HBV, Hepadnaviridae ailesinin orthohepadnavirus cinsinde yer alan hepatotropik, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virüsüdür. 3200 nükleotidden oluşan genomik yapısı ile, bilinen hayvan DNA virusları içinde en küçük olanıdır. Hepadnaviridae ailesinin üyeleri içinde insanlarda infeksiyon oluşturulan tek tür HBV'dir (5).

HBV içeren serumdan hazırlanan preparatlar elektron mikroskopunda incelendiğinde, büyüklük, yapı ve miktar gibi özellikler açısından farklı üç tip partiküle rastlanır (5,7) (Şekil 1):

a. Ortalama 42 nm. (40-48 nm.) çapında, tam bir viryon yapısında, küresel şekilli olan ve bulan kişinin adıyla anılan Dane partikülleri, infeksiyözdür. Dane partikülünde:

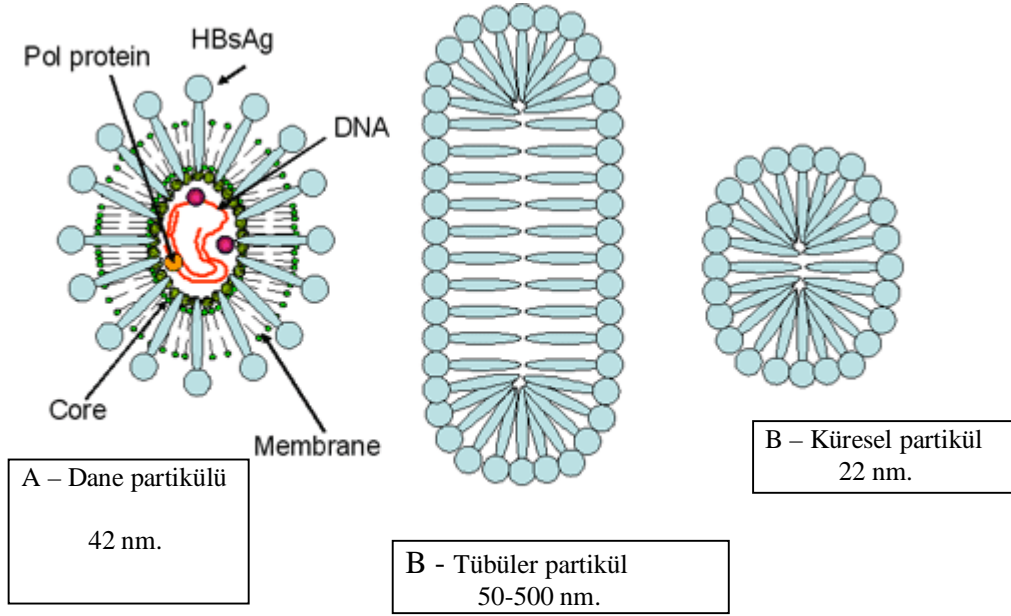
Bir adet sirküler, kısmi çift sarmallı **DNA**, DNA polimeraz ve Rnase H aktiviteli enzim,

İkozahedral yapıda, tek bir fosfoprotein (HBcAg) kopyalarından oluşan **kapsid**,

Virusun kodladığı üç adet protein (HBsAg) ve hücreden kazanılan lipidlerden oluşan **zarf** bulunur.

b. Yaklaşık 22 nm. (17-25 nm.) çapında, içinde nükleik asit bulunmayan, infeksiyöz olmayan küresel partiküller.

c. 22 nm. çapında, 50-500 nm uzunluğunda nükleik asit içermeyen, infeksiyöz olmayan tübüler (filamentöz) partiküller.



Şekil 1: HBV partikülleri (Kaynak 15'den alınmıştır).

Her üç form da infekte konak serumunda yüksek miktarda (200-500 mg/ml) saptanabilen ve HBsAg adı verilen yüzey antijenine sahip olup, immünojeniktir. Anti-HBs antikoları ile reaksiyon verirler (1,5). İnfeksiyöz olmayan partiküller daha fazla miktarda üretilir. Dane partiküllerinin sayısı 10^4 - 10^9 /ml arasında iken, infeksiyöz olmayan ve kanda en fazla bulunan küresel partiküllerin miktarı 10^{13} / ml veya daha fazladır (7,16).

4.4. Genom yapısı

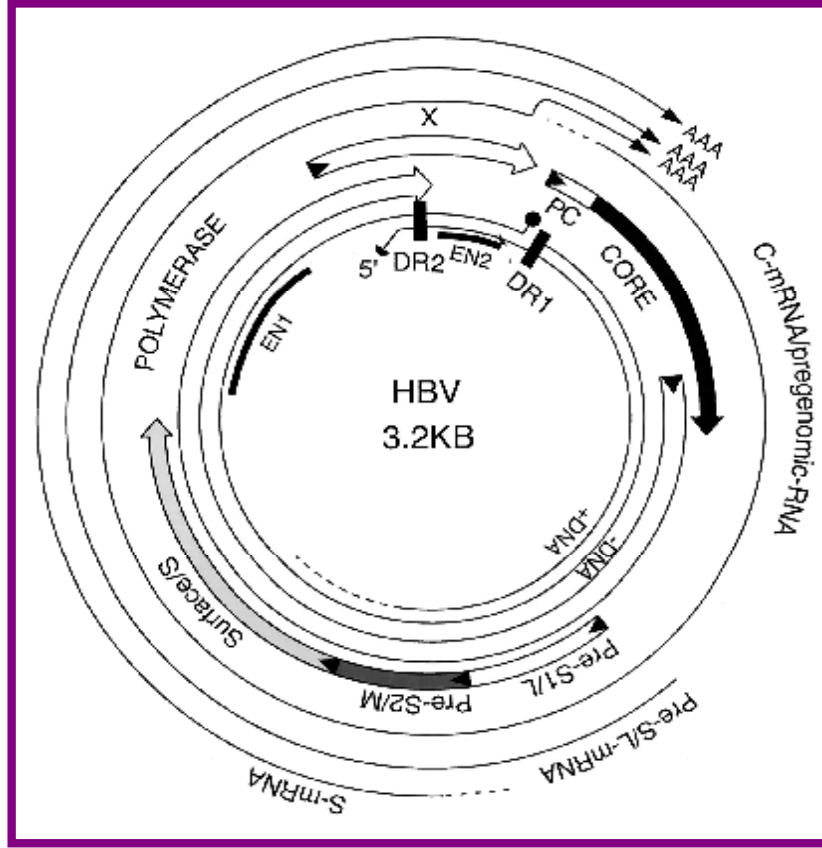
HBV, kısmen çift sarmallı, çembersel bir DNA molekülü taşır. DNA'nın molekül ağırlığı 2.3×10^6 dalton, G+C oranı ise yaklaşık %49'dur. Bilinen hayvan DNA virusları içinde en küçük olanıdır (7). Genom uzunluğu genotiplere bağlı olarak 3181 ile 3221 baz arasında değişmektedir (17).

HBV-DNA, yaklaşık 3200 nükleotid taşıyan uzun (L veya negatif) ve uzunluğu değişkenlik gösteren (1800 ile 2700 nükleotid) kısa (S veya pozitif) zincir olmak üzere iki sarmaldan meydana gelmiştir. Bu zincirler çembersel bir yapı halinde bulunmakla beraber her birinin 3' ve 5' uçları birleşik olmadığından aslında lineer molekül yapısındadırlar. İki sarmal arasında değişken uzunlukta tek sarmallı bir bölge vardır. Negatif zincirin 5' ucunda, sentez sırasında öncül olarak görev yapan bir protein

bulunurken; pozitif zincirin 5'ucunda aynı işlevi yerine getiren bir RNA dizisi yer alır. Negatif sarmalın 3'ucu ise 8-9 nükleotidlik arık uç ile sonlanır. Bu bölge replikasyon esnasında süperkırımlı, çember şeklinde, çift sarmallı (ccc) DNA molekülünün oluşumunda rol oynar (1,5).

HBV'de genetik bilgi negatif sarmal üzerinde kodlanmış olup, bu sarmal C, S, X ve P kısaltmaları ile gösterilen dört farklı protein kodlayan nükleik asit dizisine ("open reading frame", ORF) sahiptir. ORF'lerin transkripsiyonu promoter (prom=başlatıcı) ve enhancer (enh = güçlendirici) denilen düzenleyici dizinler tarafından kontrol edilmektedir. HBV genomunda fonksiyonel olarak tanımlanmış dört promoter (pre-S1 prom, S prom, X prom ve pre-C prom) ve 2 enhancer (Enh 1 ve Enh 2) bölgesi bulunmaktadır (5,16).

HBV'deki genler arka arkaya dizilmiş ve birbirinden ayrı bölgelerde bulunmazlar. Bazı bölgelerde binişik durumdadırlar. P geni; X ve C genleri ile kısmen, S geni ile tamamen binişik halde bulunmakta, sonuç olarak uzun sarmal birbuçuk defa okunmaktadır. Bu sayede HBV, bilinen hayvan virusları içinde en küçük genomik yapıya sahip olmasına karşın, kodlama kapasitesi en fazla olan virusdur. S geninde pre-S1, pre-S2 ve S olmak üzere üç, C geninde de pre-C ve C olmak üzere iki farklı başlangıç kodonu bulunmaktadır. Sonuç olarak HBV'de dört adet ORF olmasına rağmen yedi değişik polipeptid sentezlenmektedir. (1,18) (Şekil 2).



Şekil 2: HBV'nun genomik yapısı (Kaynak 11'den alınmıştır.)

4.5. Replikasyon

Hepadnavirusların replikasyonu ile ilgili bilgilerin çoğu hayvan modelleri üzerinde yürütülen çalışmalar sonucunda elde edilmiş olup, üç önemli özellik vardır (19):

- 1-DNA sarmallarının sentezi sırasında negatif iplikçiliğin sentezi, pozitif iplikçiliğin sentezinden önce tamamlanır.
- 2- Viral polimeraz, ters transkriptaz ("reverse transcriptase") olarak da fonksiyon görür.
- 3- Negatif iplikçiliğin sentezinde, 5' ucuna kovalen olarak bağlı terminal protein öncül olarak kullanılırken, pozitif iplikçiliğin öncülü, viral genomik RNA'dan köken alan bir oligoribonükleotiddir.

İnfeksiyon, virusun hepatosite tutunması ve reseptöre bağlı endositozla hücreye girmesi ile başlar. HBV'nin tutunduğu reseptör veya reseptörler kesin olarak bilinmemektedir. Adaylar arasında, apolipoprotein H (apo-H), poli-insan serum albumini (pHSA), fibronektin, interlökin 6, gp180 ve henüz tam olarak tanımlanmamış

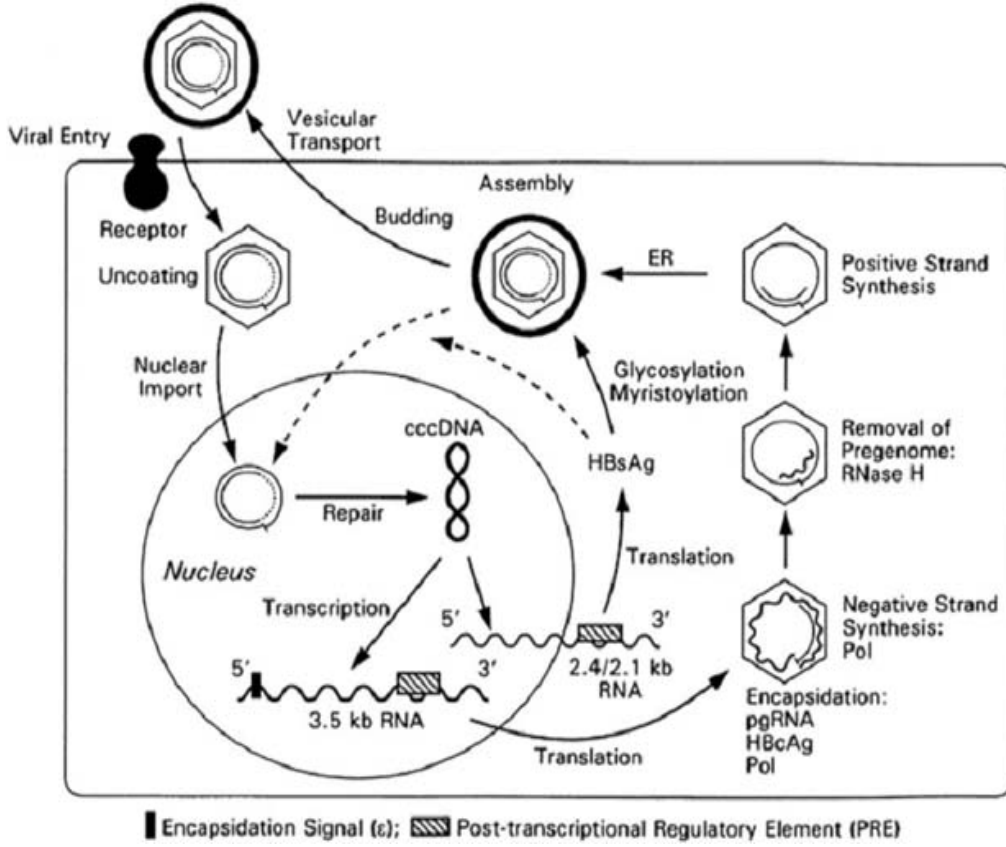
80 kDa ağırlığında bir protein bulunmaktadır (20,21,22,23). HBV'nin hepatositlere tutunmasında L ve M proteinlerinin önemli olduğu saptanmış, in vitro olarak pre-S1 (21-47 aminoasitleri arası) ve pre-S2'de karaciğere spesifik tutunma bölgeleri tanımlanmıştır. L protein, karaciğer plasma membranına ve mononükleer hücrelere bağlanabilir. SHBs proteini de hepatositlere olduğu kadar primat böbrek hücre hattına da bağlanabilmektedir (17).

Hücreye giren ve zarftan ayrılan nükleokapsid, işlenmeden konak hücre çekirdeğine taşınmaktadır. Kısmen çift sarmallı ve her iki ucu serbest halde bulunan DNA'nın (rcDNA) kısa sarmalının eksik olan bölümü endojen DNA polimeraz tarafından tamamlanır. Bu sırada uzun sarmalın 5' ve 3' uçları arasındaki açıklık da onarılır ve sonuçta çift sarmallı, süper kıvrımlı, uçları kapalı, sirküler yapıda bir HBV-DNA (cccDNA) meydana gelir. Replikasyonun normal seyri sırasında, HBV-DNA'nın konak genomuna integrasyonu görülmez. Viral mRNA'ların transkripsiyonunda kalıp görevini yapan cccDNA, viral minikromozomlar oluşturacak şekilde nükleozomların içinde organize olur (24).

Kalıp olarak kullanılan cccDNA'dan konak hücre RNA polimerazının yardımı ve viral düzenleyicilerin etkisiyle viral RNA'lar sentezlenir (Şekil 3). HBV'de fonksiyonu bilinen dört mRNA transkripti tanımlanmıştır. Genomdan daha uzun olan 3.5 kb'lık kalıp, viral replikasyondan, pre C/C ve polimeraz proteinlerinin ekspresyonundan sorumludur. 2.4 kb'lık transkriptten ise pre-S1, pre-S2 ve HBs Ag kodlanırken, 2.1 kb'lık transkriptten de pre-S2 ve HBsAg kodlanır. 0.7 kb'lık en küçük transkriptten ise X proteini sentezlenir. Translasyon sırasında oluşan pregenom, kor partikülü içine yerleşir. Konak hücre sitoplazmasında devam eden replikasyon boyunca 3.5 kb'lık RNA'dan negatif DNA iplikçığı sentezlenir (19).

Negatif iplikçığın sentez işlemi, DR1'in 3' ucunda terminal proteinin bulunduğu yerden başlar. Sentez ilerledikçe RNA, enzimin RNase H etkisiyle tahrip edilir. Kısa zincirin sentezinde kalıp olarak uzun sarmal kullanılır. Sentez DR2'nin 3' ucundan başlar ve uzun zincirin 5' ucundaki terminal protein geçilinceye kadar devam eder. Kısmen çift sarmallı sirküler yapıdaki kor yapısının kılıf proteinleri tarafından çevrelenmesi ve aynı zamanda polimerazın da tükenmesi nedeniyle kısa zincirin sentezi tamamlanamaz ve bu sarmal eksik kalır (1,12).

HBs proteinleri, endoplazmik retikulumda öncelikle transmembran proteinleri olarak sentezlenir. Daha sonra HBc proteini sitozolde sentezlenip zarf proteinleri (özellikle LHb) tarafından paketlenir. Transgenik farelerde ve hücre kültürleri üzerinde yürütülen çalışmalarda pre-S1'in hücre içinde birikmesinin HBsAg sekresyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir. Ancak pre-S I / HBsAg oranının, HBsAg'nin dışarı atılımındaki rolü kesin olarak bilinmemektedir. HBsAg, cccDNA formasyonunu inhibe ettiğinden bunun HBV replikasyonunda negatif "feedback" mekanizması olduğu kabul edilir (1,12,24). HBV'nin replikasyon şeması Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3: HBV'nin replikasyon şeması (Kaynak 25'den alınmıştır.)

4.6. Replikasyonu kontrol eden düzenleyici elemanlar

HBV'nin replikasyonunun düzenlenmesinde, enhancer, promoter, negatif düzenleyici eleman (NRE) ve CCAAT motifi rol oynar. Ayrıca, poliadenilasyon sinyali, post-transkripsiyonel düzenleyici eleman (PRE) ve enkapsidasyon sinyali de replikasyonun düzenlenmesinde aracı rol oynar (26).

Transkripsiyonun başlangıcı için dört promoter(pre C/C, pre S1, pre S2) ve iki “enhancer” (Enhancer 1 ve 2) ile negatif düzenleyici elemana (NRE) ihtiyaç vardır. Prekor-kor promoter, bazal kor promoter (BKP) olarak da isimlendirilir. 3.5 kb’lik mRNA’dan kor ve pol proteinlerinin translasyonunu sağlar. Prekor-kor promoter bölgesinin 5’ ucunda yer alan ve bu bölge üzerine kuvvetli uyarıcı etki gösteren “core-upstream regulatory sequence” (CURS) adı verilen bir bölge mevcuttur. Bu bölgede kendi içinde CURS-A ve CURS-B olmak üzere ikiye ayrılır. Negatif düzenleyici eleman ise prekor-kor promoter sentezini inhibe eder. Pre-S1 promoter pol geninde yer alır ve 2.4 kb.’lik mRNA’nın translasyonunu düzenler. Pre-S1 promoter TATA kutucuğu içerir. Pre-S2/S promoter, 2.1 kb.’lik mRNA’dan MHBs ve SHBs proteinlerinin transkripsiyonunda rol oynar. İnfekte hepatositlerde 2.4 kb’lık mRNA, 2.1 kb.’lik mRNA’ya oranla daha az miktarda bulunur. X promoter ise transkripsiyonu birçok bölgeden başlatır ve aktivitesi Enh 1 ile kontrol edilir. HBx mRNA’nın (0.7-0.9 kb) karaciğer dokusundaki ekspresyonu zayıftır. Poliadenilasyon sinyali, tüm mRNA’lar için ortak olup transkripsiyonun sonlanması ve mRNA moleküllerinin 3’ ucuna poli-A kuyrukları takılması için gereklidir. Post-transkripsiyonel düzenleyici eleman, HBV’nin replikasyonu sırasında mRNA’ların kesilmeden çekirdekten çıkabilmesini sağlar. Enkapsidasyon sinyali, HBV pol proteinin nükleokapsidde paketlenmesinden sorumludur. HBV genomunda karaciğere özgü proteinler tarafından aktive olan iki adet “enhancer” (Enh) bölgesi vardır. “Enhancer 1” S ve X gen bölgesi üzerindedir. Prekor ve HBx mRNA sentezi üzerine arttırıcı etkisi vardır. “Enhancer 2”, X geni üzerindedir ve prekor-kor promoter bölgesi üzerindeki “CURS” dizisi ile çakışır. Enh2 pre-S, S, C ve X promoterlerin aktivitesini artırır. Enh2, A ve B olmak üzere iki bölgeden oluşur. Tek başına “enhancer” fonksiyonu olmayan bu iki bölgenin fonksiyon görebilmesi için bu iki bölgenin işbirliği gereklidir (26).

4.7. Virus proteinleri

4.7.1. Yüzey (kılıf) proteinleri

Pre-S / S geni ürünleridir ve HBV’nin yüzey (HBs) proteinlerini oluştururlar. HBV-S geni üzerinde başlangıç kodonları farklı ancak ortak 3’ ucuna sahip üç ayrı gen bölgesi bulunmaktadır. Pre-S1 gen bölgesi 2850-3174. nükleotidler arasında

olup, Pre-S2 3174-157. nükleotidler arasında yer alır. S gen bölgesi ise 157-833. nükleotidler arasında yer alır (1).

LHBs: Okuma işlemi gen üzerindeki ilk kodondan başlarsa pre-S1 + pre-S2 + S gen bölgelerinin tümü okunacağından kılıfın büyük proteini (L protein: LHBs) sentezlenir. Bu protein 39 kDa molekül ağırlığında 389 – 400 aminoasitten oluşmuş bir polipeptid olup (p39), glikolize edilmiş formu 42 kDa ağırlığındadır (gp42). LHBs en fazla Dane partiküllerinin yüzeyinde bulunur. Tübüler partiküllerin kılıfında da bir miktar L proteinine rastlanır ama küçük küresel partiküllerdeki miktarı çok azdır (1,12). Viryonun konak hücreye bağlanmasında L proteininin rolü olduğuna inanılmaktadır. LHBs'nin 21-47. aminoasitleri arasındaki bölgenin hepatositlere tutunma özelliğine sahip olduğu saptanmış ve bu bölgeye karşı oluşturulan antikörlerin bağlanmayı engellediği gösterilmiştir. Dane partiküllerinin oluşumu, biraraya gelmesi ve konak hücreden salınması için M proteininin varlığı şart olmamakla birlikte S ve L proteinlerinin mutlaka sentezlenmiş olması gerekmektedir (27). Hepatosit içinde Pre-S1 ürünlerinin birikimi endoplazmik retikulumda dilatasyona neden olmakta, hücreler balonlaşmakta, buzlu cam görünümü almakta, sonuçta koagülasyon nekrozu ile hücreler ölmektedir. Kılıf proteinleri içinde asetillenmiş halde bulunan tek polipeptid LHBs'dir. Bu nedenle pre-S1 proteini hücreden tek başına salınamaz. Bu molekülün sekresyonu için S proteinine gerek vardır. Ancak aşırı L protein konsantrasyonları M ve S proteinlerinin salınımını bloke eder. Yüzey proteinlerinin sekresyonundaki bu karışık durum ve LHBs / SHBs oranı hepatositlerde oluşan partikülün morfolojisini belirler. LHBs düzeyleri %5'den daha az olduğunda sadece 22 nm.'lik küresel partiküller meydana gelirken, daha yüksek konsantrasyonlarda tübüler partiküller sekrete edilmekte, aşırı LHBs konsantrasyonlarında ise tübüler sekresyonu önlenmektedir. Diğer taraftan kor partiküllerinin kılıflanabilmesi için de L proteinine ihtiyaç vardır (1,12).

MHBs: Okuma işlemi S geni üzerindeki ikinci kodondan başlarsa pre-S2 + S bölgelerinin ürünü olan orta protein (M protein: MHBs) sentezlenir. Bu protein 33 kDa molekül ağırlığında 281 aminoasitten oluşmuş bir polipeptid (p33s) olup, daima bir ya da iki bölgesinden glikolize edilmiş haldedir. Glikolize formu 36 kDa ağırlığındadır (gp36s). M proteininin 133-139. aminoasitleri arasındaki bölge gruba özgü, 137-143. aminoasitleri arasındaki bölge ise tipe özgü epitoplara olarak tanımlanmıştır (19). Her

üç partikül tipinde de bulunan MHBs'nin miktarı, viryon ve tübüler partiküllerde en az, 22nm'lik küresel partiküllerde ise LHBs'den biraz daha fazladır. Replikasyonun olmadığı durumlarda HBsAg içinde yer almaz. Bu nedenle MHBs, asemptomatik HBsAg taşıyıcılarında az miktarda bulunur. (1- M Kıyan). M proteinini 124-147. aminoasitleri arasındaki bölge kompleks bir antijenik yapıya sahip olup bu bölgeye karşı gelişen antikorlar tüm HBV subtiplerine karşı koruyucudur(28).

HBV'nin karaciğer hücrelerine tutunmasında rolü olabileceği düşünülen reseptörlerden biri de preS2-glikandır. M proteini üzerinde pozisyon 4'de bir asparagin rezidüsü bulunur. Bu rezidü mannoz ile sonlanan bir oligosakkarid ile glikolize haldedir. HBV'nin bu bölgeden mannoz bağlayan protein (MBP) aracılığı ile hepatositlere bağlandığı sanılmaktadır. MBP, doğal immunitede önemli rolü olan kalsiyuma bağımlı bir lektindir. Kendisi ile ilişkili serin proteazla kompleman sistemini ve fagositozu aktive eder. Sahip olduğu kollajen bölgeleri ile kollektin reseptörlerine bağlanarak opsonin gibi hareket eder. Mannoz bakımından zengin bir oligosakkarid içeren M proteini MBP'e bağlanıp hepatositlere tutunabilir(1,29) .

SHBs: Okuma işlemi, üçüncü kodondan başlarsa sadece S bölgesi okunarak kılıfın küçük proteini (S protein: SHBs) sentezlenir. Bu protein 24 kDa molekül ağırlığında (p24s) 226 aminoasitten oluşmuş bir peptid olup glikolize edilmiş formu 27 kDa (p27s) ağırlığındadır. HBsAg'nin büyük kısmını oluşturan SHBs kılıfın majör proteini olarak bilinir ve B lenfositleri için epitop özelliğine sahiptir (1,6). HBsAg değişik oranlarda S, L ve M kılıf proteinlerini içerir.

Kanda dolaşan S geni ürünlerinin yaklaşık %5-15'i M, % 1-2'si L ve geri kalan kısmı S proteininden oluşmaktadır. Yapılan çalışmalar bu üç proteinin, çeşitli HBV partikül tipleri arasında eşit oranda dağılmadığını ortaya koymuştur. Her üç partikül tipinde de baskın olarak S proteinleri bulunurken, subviral 22 nm'lik partiküllerde değişebilen miktarlarda M polipeptidleri ve çok az miktarda L zincirleri bulunur. Küçük partiküllerde bazen LHBs'e hiç rastlanmayabilir ama Dane partiküllerinde L proteini daima vardır. L proteininin reseptör tanıma alanına sahip olması ve viryonlarda diğer partiküllerden farklı olarak daha fazla miktarda yer alması konak hücre yüzey reseptörlerine bağlanmada Dane partiküllerini avantajlı hale getirmektedir. 22 nm'lik küresel partiküller, viryonlardan 1.000-1.000.000 kat daha fazla sayıda olsa da, Dane

partikülleri içerdikleri L proteinleri sayesinde hepatositlere kolaylıkla bağlanabilmektedir. Dane partiküllerinde L:M:S oranı yaklaşık 1:1:4 şeklindedir. Viryon ve tübüler partiküllerde S>L>M, küçük partiküllerde ise S>M>L düzeni hemen hemen daima korunur (12,24).

SHBs'yi oluşturan aminoasitlerin belli bölgelerdeki diziliş farklılıklarına göre HBsAg üzerinde en az 5 antijenik determinant (a, d/y ve w/r) bulunduğu saptanmıştır. Bütün subtiplerde ortak olarak yer alan özgül "a" determinantı, 124-147. aminoasitler arasındaki hidrofilik bir bölgedir. "a" determinantına karşı oluşan antikorlar HBV'nin hepatositlere bağlanmasını engeller ve tüm subtiplere karşı etkili bir bağışıklık sağlar. SHBs üzerindeki bu bölge, yapısında yer alan 7 adet sistein arasındaki disülfid köprülerince oluşturulan ve 124 ile 147. aminoasitler arasında yer alan iki ilmik sayesinde oldukça iyi korunmuştur. Viryonun dış yüzünde bulunan "a" determinantı, aşı veya doğal infeksiyon sonrası oluşan anti-HBs'lerin büyük kısmını bağlama özelliğine sahiptir (28).

4.7.2. Kor proteinleri

HBV genomunun C geninde bir ORF bulunmasına rağmen, gen üzerinde okuma işleminin başladığı iki farklı kodon (1816. ve 1903. nt) yer alır. Bu nedenle prekor ve kor olmak üzere iki bölgeye ayrılan C geni, antijenik özellikleri farklı, iki değişik protein (HBeAg ve HBcAg) sentezleyebilir. 1816 ve 1903.nt arasında yer alan prekor bölgesi 29 aminoasitlik bir peptidin üretiminden sorumludur. Prekor dizisi, aynı gen tarafından sentezlenen polipeptidlerin sitoplazmada mı kalacağı yoksa endoplazmik retikuluma mı gideceğinin belirlenmesinde, karboksi-terminal uçtaki DNA bağlayan kısmın konak hücre tarafından uzaklaştırılmasında, hücre membranlarında protein birikmesinde ve HBeAg özelliği gösteren p25c'nin sekresyonunda rol oynayan, diğer bir deyişle sentezlenen proteinlerin kaderini belirleyen bir yapıdır. Her iki bölgeye ait stop kodon (2452. nt) ortak olduğu için protein sentezi sırasında okuma işlemi hangi başlangıç kodonundan başlarsa başlasın aynı noktada sonlanır (1).

HBcAg: 1903 ile 2452. nükleotidler arasında yer alan C bölgesinden, genotipe bağımlı olarak değişen 183 (genotip B-F), 185 (genotip A) veya 195 (genotip G) aminoasit uzunluğunda bir polipeptid (p23c) olan HBcAg'nin öncülü sentezlenir (17).

C geninin ikinci bölgesi tarafından sentezlenen p23c, 29 aminoasitlik ek sekansı olmadığı için endoplazmik retikuluma gidemez, konak hücre sitoplazmasında kalır. Hücre sitoplazmasında modifikasyona uğrayan p23c HBcAg' ye dönüşür ve karboksiterminal ucundaki 34 aminoasitlik kısım sayesinde viral DNA'ya sıkıca bağlanır. Safılaştırılmış viryon korlarında ve HBV ile infekte hasta hepatositlerinde gösterilebilen HBcAg sıklıkla intranükleer yerleşimlidir. Ancak aktif hastalık döneminde ve aşırı viral replikasyon gösteren olgularda sitoplazmada da yaygın olarak saptanabilir (1,7). İnfekte hepatositlerden safılaştırılan HBcAg partikülleri ile viryon korlarında protein kinaz ve proteaz aktivitesi bulunduğu tespit edilmiştir (11). Dolaşımında serbest halde HBcAg'ye rastlanmaz. Kanda sadece Dane partiküllerinin içinde bulunur. Serum defalarca dondurulup, çözülür veya lipid eriticiler ile işleme sokulursa viryonlar parçalanır ve HBcAg serbestleşir (1). Lipit eriticilerle serum muamele edilerek antijen açığa çıkartılmış ve serumda da varlığı gösterilmiştir (30).

HBeAg: Prekor bölgesinden başlayan okuma işleminde 25 kDa molekül ağırlığında bir polipeptid (p25c) sentezlenir. Bu proteinde, HBcAg'den farklı olarak bulunan ek aminoasit dizisi, sentez sırasında giderek uzamaya başlayan prekor polipeptidini (p25c) endoplazmik retikuluma yönlendirir, burada bir peptidaz tarafından C terminal bölgesindeki 34 aminoasitlik bölüm kesintiye uğrar ve işlenmiş protein haline gelerek golgi cisimciği üzerinden HBeAg olarak sekrete edilir (18). HBeAg'nin HBc proteininin sekrete edilebilen formu olduğu söylenebilir. HBe antijeni, persistan infeksiyonun oluşması için gereklidir. Kronik infeksiyonun toleran fazında, serumda yüksek düzeyde HBe proteini ile birlikte yüksek viral yük ve normale yakın karaciğer histolojisi bulunur. HBeAg'nin eliminasyonu genellikle virus ile infekte hepatositlere karşı artmış bir bağışık yanıt ile birlikte olur. Bu durumda viral yük belirgin olarak düşer. HBe antijeni sekrete edemeyen mutant HBV, genellikle kronik infeksiyon sırasında oluşur (17). HBe proteini, HBV ile infekte hepatositlerin bağışık yanıtla eliminasyonunu baskılamakta ve *in vivo* tolerojen olarak fonksiyon göstermektedir (31).

HBeAg ve HBcAg immunojendir. HBcAg'nin immunojenitesi HBsAg'den daha fazladır ve T hücre-bağımsız antijen özelliği gösterir. HBV ile infekte hastaların hemen tamamında gerek HBeAg gerekse HBcAg'ye karşı hem hücresel hem de sıvısal yanıt gelişir. Değişik çalışmalar her iki antijenin de T ve B hücrelerince tanınan

epitoplara sahip olduğunu ortaya koymuştur (1,7,18). HBeAg'de 85 ile 138. aminoasitler arasında en az iki adet B hücre epitopu (HBe1 ve HBe2) vardır. HBe1 lieneer, HBe2 konformasyoneldir. HBcAg epitopları ise 74-89 ve 107-118. aminoasitler arasında tanımlanmıştır (17).

4.7.3. P proteini

P geni, HBV genomunun yaklaşık 3/4'ünü kaplayan en uzun gendir. 2309 ile 1623.nt arasında yer alır ve yaklaşık 832 aminoasitten oluşmuştur. Hepadnavirusların P genindeki 835 - 845. kodonlar arası bölge HIV'e ait ters transkriptaz ile homoloji göstermektedir (18,24). P proteini, ters transkriptaz, endonükleaz (RNase H) ve hem DNA hem de RNA'ya bağımlı polimeraz aktivitesine sahiptir. 90 kDA molekül ağırlığındaki bu proteinin en az dört farklı işleve sahip bölgesi vardır. Aminoterminal parçası, negatif DNA sarmalının sentezlenmesinde RNA pregenomunun ters transkripsiyonu için öncül görevi görür. Orta parça, negatif sarmal sentezi için ters transkriptaz ve pozitif sarmal sentezi için DNA polimeraz olarak işlev yapar. Karboksi uçtaki parça ise negatif sarmal sentezi sırasında RNA pregenomunun degradasyonu için gerekli olan RNase H'ı kodlar. DNA polimeraz bölgesi, ters transkriptaz aktivitesi için gerekli olan YMDD aminoasit motifini taşır (1).

4.7.4. X proteini

X geni, 154 aminoasit uzunluğunda, 17 kDA molekül ağırlığında HBx proteinini kodlar. HBV genomunda 1376 ile 1838. nükleotidler arasında yer alan en küçük gen bölgesidir. Kanatlı hayvan hepadnaviruslarında bulunmadığı halde tüm memeli hepatit B viruslarında bulunur. HBx mitojen-aktive edici protein kinaz (MAPK), c-Jun N-terminal kinaz ve Scr tirozin kinaz gibi hücrel sinyal yollarını aktive edebilir (32,33). Diğer taraftan X proteini tümör supresör gen ürününün (p53) işlevini bozar. Bu durum HBV ile ilişkili hepatokarsinogenez sürecinin ilk aşamasında etkili olarak, HBxAg'nin HCC gelişiminde rol oynayabileceğini akla getirmektedir. X dizisine karşı oluşan antikolar, HCC araştırılmasında ve HBV ile infekte karaciğer dokularındaki X proteininin saptanmasında kullanılmıştır. HBxAg, yüzey ve kor antijenlerinden çok daha az olarak tespit edilebilmiştir. X dizisi içeren sentetik peptidler, hasta

serumlarında anti-HBx antikörlerinin saptanmasında kullanılmış ve HCC'un erken tanısında yararlı olabileceği bildirilmiştir (34).

4.8. Genotip ve subtipler

S proteinin oluşturan aminoasit dizilerinin belli bölgelerdeki farklılıklarına göre *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq-*, ve *adrq+* olarak dokuz ayrı subtip tanımlanmıştır. Bütün subtiplerde ortak "a" determinanı, virüsün dış yüzeyindeki S proteininde 124 - 147. aminoasitler arasında yer alır. S proteinindeki diğer determinantlar ise 122. (*d* veya *y*) ve 160. (*w* veya *r*) pozisyonlarda bulunan aminoasitler ile belirlenir. "d" ve "w" subtip determinantlarının her iki pozisyonunda lizin, *y* ve *r* 'de ise arjinin vardır (1,35) (Tablo 2). *ayw1-ayw2* subtipleri arasında 5 rezidülük fark tanımlanmıştır. Bunlar pozisyon 134 (Phe/Tyr), 143(Thr/Ser), 159(Ala/Gly), 161(Tyr/Phe), 168(Val/Ala) de bulunan aa'ya göre belirlenmektedir (121).

Tablo 2: HBV'nin antijenik subtipleri ile S bölgesindeki aminoasit pozisyonları arasındaki ilişki

Pozisyon	Aminoasit	HBsAg subtipi
122	Lizin	d
	Arjinin	y
127	Prolin	w1/w2
	Treonin	w3
	Lösin/İzolösin	w4
160	Lizin	w
	Arjinin	r

HBsAg subtipleri arasında biyolojik farklılıklara rastlanmaz. Ancak genotiplerle ilişkili oldukları için coğrafi dağılımları farklılık gösterir. HBsAg subtiplerinin saptanması, epidemiyolojik çalışmalarda, infeksiyon kaynağının izinin sürülmesinde

ve HBV'nin bireyler veya toplumlar arasındaki yayılımının izlenmesinde önemli ipuçları verir. A.B.D.'de "w" subtipi "r" den daha yaygın iken, Tayland'da en sık görülen subtip "r" dir. Kuzey Avrupa, Amerika ve Avustralya'da "adw", Doğu Avrupa, Doğu Akdeniz, Kuzey ve Orta Asya'da baskın olarak "ayr" bulunur. Malezya, Japonya, Tayland ve Endonezya'da "adr" daha sık olmakla beraber "adw" subtipine de rastlanmaktadır.

Son yıllarda moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucunda, HBV genomları arasındaki farklılıklar incelenmiş, benzerlik oranı %92 ve daha fazla olan HBV suşları aynı grupta toplanarak 6 farklı genotip (A-F) belirlenmiştir (36).Yakın zamanda Fransa ve A.B.D'de diğer genotiplerden tüm genom düzeyinde %11,7 ile %15,3 farklılık gösteren yeni bir genotip bulunmuş ve genotip G olarak adlandırılmıştır (37). 2002 yılında Arauz-Ruiz ve arkadaşları tarafından, genotip F'e benzer, Nicaragua, Mexico ve California'da saptanan ve H olarak adlandırılan yeni bir genotip bulunmuştur (38).

Genotipler ile HBsAg subtipleri arasındaki ilişkilerin saptanması amacıyla genom dizileri ile S geni dizileri karşılaştırılmış, S geni düzeyinde genotip farklılık sınırı %4 olarak tespit edilmiş ve genotip-subtip dağılımı yapılmıştır (Tablo 3) (17).

Tablo 3: HBV genotip ve subtiplerinin coğrafi dağılımı ve nükleotid farklılıkları

			HBV Proteinleri (aa)			
Genotip	Subtip	Genom uzunluğu (nt)	Pre-S1	Pol	Kor	Coğrafi dağılım
A	adw2 ayw1	3221	119	845	185	Kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika, Afrika
B	adw2 ayw1	3215	119	843	183	Endonezya, Çin, Vietnam
C	adw2 adr ayr	3215	119	843	183	Doğu Asya, Kore, Çin, Japonya, Polinezya
D	ayw2 ayw3	3182	108	832	183	Akdeniz Bölgesi, Hindistan
E	ayw4	3212	118	842	183	Batı Afrika
F	adw4 adw	3215	119	843	183	Orta ve Güney Amerika, Polinezya
G	adw2	3248	108	842	195	ABD, Avrupa
H	adw3	3215	108	844	183	Orta Amerika

HBV prevalansının düşük olduğu Kuzeybatı Avrupa ve A.B.D.'deki taşıyıcılar arasında genotip A baskındır. Amazon bölgesi ve Peru gibi yüksek HBV prevalansına sahip ülkelerde ise genotip F'nin sık olduğu saptanmıştır. HBV bulaşında vertikal geçişin ilk sırada olduğu Doğu Asya ülkelerinde genotip B ve C' nin prevalansı yüksektir. Bu durum kısmen, vertikal geçişten sorumlu olan HBeAg pozitif (replikatif) dönemin daha uzun oluşu ile açıklanır. HBV'nin endemik olduğu bölgelerde, yüksek taşıyıcılık oranının devamında en önemli mekanizmanın vertikal geçiş olduğu kabul edilmektedir. Bunun aksine genotip A ve D' nin dominant olduğu Akdeniz ve Sahra altı Afrika ülkelerinde horizontal geçiş daha önemlidir (39). Ülkemizde yapılan çalışmalarda en sık raslanan genotipin D olduğu ve en sık raslanan subtiplerin ise ayw3 ve ayw2 olduğu bildirilmiştir (40, 41)

Genotip ile klinik sonuç arasındaki ilişki konusunda fikir birliğini sağlayacak veri bulunmamaktadır. Bu konudaki çalışmalar çoğunlukla Uzakdoğu'da yapılmıştır. Bu toplumlardaki yaygın genotip B ve C olduğu için, bu genotiplerle ilgili veriler daha fazladır. Kao ve ark.'nın Tayvan'da yaptığı çalışma sonucunda, bölgede genotip B ve C'nin baskın olduğu, genotip C'nin daha ciddi karaciğer hastalığı ile genotip B'nin ise 50 yaş altı hastalarda HCC gelişimi riski ile ilişkili olduğu görülmüştür (42). Japonya'daki çalışmada ise Kao ve ark.'nın sonuçlarından farklı olarak genotip C'nin HCC ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (43). Mayerat ve ark.'nın İsviçre'de yaptıkları çalışmada, genotip A akut, B ise daha çok kronik infeksiyonlu hastalarda saptanmıştır (44). Hindistan'da Thakur ve ark.'nın genotip A ve D'den oluşmuş bir hasta popülasyonu ile yaptıkları bir çalışmaya göre, asemptomatik hasta gruplarında genotip D ve A'nın sırasıyla %48 ve %42 oranında bulunduğu ve 40 yaş altında genotip D'nin HCC ile daha fazla ilişkili olduğu görülmüştür. (45). Fung ve Lok ise HBeAg seropozitifliğinin genotip B ve D'de daha nadir olduğunu, genotip D'de prekor ve kor mutasyonları nedeniyle HBeAg'nin negatifleştiğini, interferon tedavisine yanıtın genotip A ve B'de genotip C ve D'ye göre daha yüksek oranda görüldüğünü, genotip D'nin daha çok akut hastalığa, genotip A'nın ise daha çok kronik hastalığa neden olduğunu bildirmiştir (46).

HBV genotipleri ile tedaviye yanıt arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, Almanya'da yapılan bir çalışmada interferona bağlı HBeAg serokonversiyonunun

genotip A'da D'den daha sık olduğu görülmüştür (47). Tayvan'daki çalışmada ise interferon tedavisine yanıt, serum aminotransferaz düzeylerinin normale düşmesi, tedavide sonraki 48 haftalık izlemde HBeAg ve HBV-DNA'nın kaybolması olarak değerlendirildiğinde genotip B'nin C'den daha iyi yanıt verdiği bildirilmiştir (48). Japonya'da akut hepatitli olgularda yapılan çalışma sonucunda, genotip A'nın akut HBV infeksiyonunda kronik infeksiyona oranla daha sık görüldüğü ve akut HBV infeksiyonunun persistan hale geldiği yedi olguya uygulanan interferon (IFN) tedavisinde, genotip A dışındaki genotipler ile infekte olan hastalarda daha iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir (49). Genotipler ile lamivudin tedavisi arasındaki ilişkiyi araştıran çalışma sonuçlarına göre, subtip *adw*'nin *ayw*'ye göre lamivudine daha yüksek oranda direnç geliştirdiği saptanmıştır (50). Tayvan'da yapılan bir çalışmada lamivudin tedavisine yanıt, HBeAg serokonversiyonu ve serum aminotransferaz düzeylerinin normalleşmesi olarak değerlendirildiğinde genotip B'de yanıtın C'ye göre daha iyi olduğu, bununla birlikte direnç gelişim zamanları arasında anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir (51).

4.9. HBV mutasyonları

HBV bir DNA virusu olmasına rağmen, yaşam siklusu sırasında pregenomik RNA'dan ters transkripsiyonla DNA sentezler. Ters transkriptazın ilk okuma yeteneğindeki zayıflık nedeni ile nükleotid yerleşiminde hatalar meydana gelmekte ve sonuçta genom yapısında mutasyonlar ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden HBV diğer DNA viruslarından 10 kat fazla mutasyon oranına sahiptir. Ortalama nükleotid değişim hızı $1,4 - 3,2 \times 10^{-5}$ nükleotid / yıl olarak hesaplanmaktadır. Ayrıca genom üzerindeki genler birbiri ile binişik olduğu için bir gende olan mutasyonel değişiklik diğer genleri de etkilemektedir (17).

HBV'de oluşabilecek mutasyonlar klinik açıdan önemlidir. Bunlar;

- a- Virusun replikasyonunu arttırabilir,
- b- Virusun antijenik yapısını değiştirerek bağışık yanıttan kaçabilmesine yol açabilir,
- c- Virusun hücreye girişini ve integrasyonunu kolaylaştırabilir,
- d- Antiviral ilaçlara direnç gelişmesine yol açabilir.

4.9.1. Yüzey (S) mutasyonları

Bu bölgenin mutasyonları, preS ve S bölgesi değişiklikleri olarak incelenmektedir.

PreS Bölgesi: Yüksek heterojeniteye sahip olan PreS1 ve preS2 gen bölgesi ile ilgili bir dizinin silinmesi, yer değiştirmesi veya yeniden düzenlenmesi şeklinde mutasyonlar görülebilmektedir (1). PreS1 gen bölgesinin ikinci yarısında ve preS2 gen bölgesinde interferon tedavisinden sonra geniş delesyonlar görülmektedir (32). Pol proteinin enzim aktivitesi için gerekli olmayan "spacer" bölgesi ile örtüşen preS2 bölgesi, HBV'de önemli bir immunolojik yapı olup, bu bölgedeki delesyonlar virusun bağışık yanıtı kaçmasını sağlamaktadır. Anti-HBe pozitif kronik HBV enfeksiyonlu hastalarda preS2 bölgesi mutasyonlarına sıklıkla rastlanmaktadır (17).

S Bölgesi: Bu gen bölgesinde ortaya çıkan mutasyonlar virusun antijenik yapısını etkileyerek aşılı bireylerde enfeksiyon ortaya çıkmasına ve HbsAg saptayıcı testlerde tarama testlerinde yanlış negatif sonuçlara neden olur. HBV kılıf varyantları ile ilgili olarak tanımlanan ilk önemli mutasyon, subtip determinant çiftlerinde (d/y veya w/r) saptanmıştır. Bununla birlikte subtip değişikliğinin enfeksiyonun doğası üzerinde bir etkisi yoktur. S HBs Ag'nin 99 - 169. nükleotidler arası major hidrofilik bölge olup epitop kümesini içerir. Bu yapı disülfid köprüleriyle stabilize edilmiş olup 8 korunmuş sistein bütün subtiplerde ortaktır. Bu bölgede B hücre epitopu olarak bilinen "a" determinantı mevcut olup 124-147 aa.lar arasındadır (52,53,54). "a" determinantı nötralizan antiHBs'nin subtipten bağımsız olarak hedefi olup aktif ve pasif immünoprofilaksiste kullanılır. Tüm subtiplerde "a" determinantı ortak olduğu ve bu bölgeye karşı oluşan antikorlar HBV'nin hepatositlere bağlanmasını engellediği için, aşı veya doğal enfeksiyon sonucu herhangi bir subtipe karşı gelişen humoral bağışık yanıt, tüm serotiplere karşı koruyuculuk sağlar. Fakat "a" determinantında değişiklik taşıyan HBsAg'nin, klasik HBsAg subtiplerine karşı oluşmuş antiHBs antikoruna bağlanma kapasitesinde belirgin azalma olmaktadır. Tam bir antijenik yapı gösterebilmesi için 142. pozisyonda prolin bulunması gerekmektedir (53,55,56).

Aşı ile ilişkili ilk kaçak mutant 1988 yılında İtalya'da görülmüştür. HBeAg pozitif anneden doğduğu için pasif ve aktif immünizasyon uygulanan bir bebekte yeterli düzeyde anti-HBs bulunmasına karşın HBsAg ve HbeAg'nin pozitifleştiği ve daha sonra kronik hepatit geliştiği saptanmıştır. Yapılan dizi analizi sonucunda "a"

determinantının 145. pozisyonunda glisin-arginin değişimi saptanmıştır (57). Daha sonra Çin, Japonya, Almanya, Arjantin gibi dünyanın farklı ülkelerinden "a" determinantının farklı pozisyonlarında mutasyonlarla oluşan açıdan kaçan mutantlar bildirilmiştir (55,58,59,60).

4.9.2. Prekor ve kor mutasyonları

Prekor ve kor proteinlerini kodlayan ORF'de iki farklı başlama kodonu bulunmaktadır. HBeAg, prekor başlama kodonunun okunması ile sentezlenir ve translasyon sonrası değişikliklerden sonra hücre dışına salınır. HBeAg yapısal bir protein değildir ve gerçek fonksiyonu bilinmemektedir. HBeAg replikasyon göstergesi olarak kabul edilse de bazı replikatif infeksiyonlarda HBeAg saptanamamaktadır. Bunun en sık nedeni prekor stop kodon, daha ender olarak da kor promoter mutasyonlarıdır (61).

Prekor Bölgesi: 1816 ve 1900. nt arasındadır. 1816. nükleotidde HBeAg'nin başlangıç kodonu bulunmaktadır. Prekor bölgesi viral replikasyon için kritik olan paketleme (enkapsidasyon) sinyalinin veren epsilon bölgesinin gövde ve ilmik ("stem-loop") yapısını içerir. Bu bölge aynı zincir üzerinde oluşan baz iftleşmelerine bağlı olarak meydana gelen ikincil yapıya sahiptir. Prekor bölgesinde görülen en sık mutasyon HBeAg'nin üretilmemesi ile karakterize olan stop kodon oluşumudur. Normalde prekor bölgesinde stop kodon bulunmaz ve prekor bölgesinin başlangıç kodonundan başlayan sentez işlemi, kor bölgesi ile devam eder. Eğer prekor bölgesinin 1896. nt'deki guaninin (G) yerine adenin (A) gelirse triptofan kodonu (kodon 28, TGG), stop kodon (TAG) haline gelir ve HBeAg'nin öncül proteini oluşamaz. Söz konusu nokta mutasyonu kor bölgesinin start kodonundan önce meydana geldiği ve HBeAg ile HBcAg farklı mRNA moleküllerinden sentezlendiği için HBeAg üretilemez ancak HBcAg'nin sentezi devam eder. A1896G mutasyonu, bazı HBV genotiplerinde "stem-loop"un sekonder yapısını daha kararlı (stabil) hale getiren bir baz çifti oluşumuna yol açar. Genotip B, C, D ve E'de 1858. pozisyonda bulunan C, A1896G değişimini kolaylaştırarak bu pozisyondaki G ile bir baz çifti oluşturur. Oluşan G1899A mutasyonu kararlı yapının gelişmesine katkıda bulunduğu için stop kodon mutasyonu sıklıkla 1858. pozisyonda C taşıyan suşlarda görülür (1,56).

HBeAg sentezini engelleyen diğerk bir mutasyon ise 1862. nt'deki değişimdir. Bu mutasyon iki farklı noktada HBeAg sentezini engellemektedir. Bu bölge hem sinyal peptit ayrılma bölgesine yakın olduğu için, hem de pregenomik RNA'nın ters transkripsiyonunun engelleyerek HBeAg sentezini engellemektedir. Prekor mutantlarının varlığı asemptomatik HBV taşıyıcılarında, kronik viral HBV'li olgularda, ciddi karaciğerk hastalığı olanlarda ve fulminant hepatitli hastalarda gösterilmiştir (56,62).

Bazal Kor Promoter Bölgesi: HBeAg negatif olguların bir kısmında prekor mutasyonu bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda HBeAg sentezini transkripsiyon düzeyinde kontrol eden bazal kor promoter bölgesindeki bazı mutasyonların, HBeAg negatif olgularda pozitif olanlara oranla daha fazla görüldüğü saptanmıştır. Bazal kor promoter bölgesi ters transkripsiyon için önemli DR1 bölgesini kapsar. 1742-1849. nt arasında yer alan bu bölge, *in vivo* olarak hem preC mRNA hem de pg RNA transkripsiyonunun başlaması ve düzenlenmesinde büyük önem taşır. Bu nedenle bazal kor promoter mutasyonları, hem mRNA transkripsiyonunu hem de bunların gen ürünlerinin ekspresyonunu etkiler. Ayrıca bölge üzerinde dört adet AT'den zengin bölge (TATA benzeri kutu) bulunmaktadır. TA1 (1750-1755), TA2 (1758-1762), TA3 (1771-1775) ve TA4 (1788-1795) bölgeleri prekor m-RNA'nın optimal transkripsiyonu için gereklidir. X geninin 3' ucu da 1838. nt'de sonlanmaktadır (63).

Çalışmalarda 1750 ve 1775.nt arasının değişken bir bölge olduğu saptanmıştır. Bazal kor promoter mutasyonları arasında hakkında en fazla bilgi birikimi olan ve HBeAg sentezini baskılayan A1762T-G1764A çift baz mutasyonu, genotip A ve C'de daha sık gözlenmektedir. Bu mutasyonun karaciğerk hasarı ve HCC ile ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (56,64).

Son yıllarda antiviral tedaviye yanıtın değerlendirildiği çalışmalarda prekor ve kor promoter mutasyonlarının da etkileri incelenmiştir. Tassopoulos ve ark., HBeAg pozitif ve negatif olgular arasında tedaviye yanıt açısından anlamlı bir fark bulmamışlardır (65). Cho ve arkadaşlarının çalışmasında ise lamivudin (LAM) tedavisi sırasında prekor ve kor promoter mutantlarının, yabanıl tipe değişim gösterdiği saptanmış, bu nedenle mutant suşların LAM'e daha duyarlı olabilecekleri ileri sürülmüştür. Ancak aynı çalışmada, uzun süreli tedavide mutant suşların tekrar ortaya çıkmaları bu görüşü çürütmüştür (66). Prekor mutantlarının LAM duyarlılığına

etkisinin invitro araştırıldığı Chen ve ark.'nın yaptığı çalışmada, mutasyonun ilaç duyarlılığına etkisinin olmadığı, bununla birlikte prekor mutasyonlarının LAM direçli suşların replikasyonunu arttırabileceği görülmüştür (67).

Kor Bölgesi: Hepatosit yüzeyinde eksprese olan kor antijeni major bir immun hedefidir. T ve B lenfositlerce tanınan epitoplara sahip olup CD4 ve CD8 hücrelere sunulabilmektedir. Kor bölgesi ile ilgili mutasyonlar sıklıkla yardımcı-T ve B hücre epitolarında ortaya çıkar. Kor bölgesinin yardımcı-T hücre epitopu içinde yer alan 12. pozisyonundaki treonin'in serin ile yer değiştirmesi, HBV'nin CD4(+)T hücre cevabından kaçmasını sağlamaktadır. Ayrıca yardımcı-T hücre epitopu ile HBeAg/HBcAg'ye ait B hücre epitopu çevresinde yoğunlaşmış delesyonlar da saptanmıştır (1,18,56).

4.9.3. Polimeraz mutasyonları

Hepadnaviruslar, retroviruslarda olduğu gibi ters transkripsiyon aktivitesine sahiptir. Ters transkriptazların aktif bölgesinde (C bölgesi) polimerizasyon aktivitesi için gerekli olan yüksek derecede korunmuş tirozin-metionin-aspartat-aspartat (YMDD) motifi bulunur. HBV infeksiyonunun doğal seyri sırasında polimeraz gen mutasyonları nadiren ortaya çıkmakta ve interferon tedavisi boyunca polimeraz mutasyonları indüklenmemektedir (68).

Günümüzde kronik B hepatiti tedavisinde lamivudin ve adefovir gibi antiviral ilaçlar, HBV replikasyonunu baskılamak amacıyla kullanılmaktadır. Bu ajanlar HBV replikasyonunu baskılamakta etkili olmakla birlikte, uzun süreli kullanımlarından sonra ilaca dirençli HBV suşları ortaya çıkmaktadır. HBV pol geninin katalitik (C bölgesi) bölgesinde yer alan YMDD motifini etkileyen mutasyonlar lamivudin (LAM) direncinden sorumludur (Tablo 4) (69,70,71). LAM tedavisi sırasında seçilen en önemli polimeraz mutasyonları, metiyoninin valin veya isolösine dönüşmesi (rtM204I/V) şeklinde görülür. rtM204I mutasyonu tek başına ilaç direnci sağlayabilirken, rtM204V mutasyonu sıklıkla pol geninin B bölgesinde yer alan 180. kodondaki lösün metiyonin (rtL180M) mutasyonu ile birlikte görülmektedir. Bu birliktelik her bir mutasyonun tek başına yol açtığı ilaç direncinden daha kuvvetli bir dirence neden olur. 204. kodondaki her iki mutasyon da virus replikasyonunu

azaltmaktadır. Ancak, C ve B bölgesinde birlikte mutasyon olan suşlarda replikasyon, sadece C bölgesinde mutasyon olan suşlardan daha fazladır (68).

Bugüne kadar yürütülmüş çalışmalarda HBV genotipiyle ilişkili polimorfizm nedeniyle B ve C bölgesindeki farklı aminoasit numaralarından söz edilmekteyse de, Stuyver ve arkadaşlarının HBV polimeraz bölgesi mutasyonlarına ilişkin olarak önerdikleri genotipten bağımsız standardize isimlendirme sistemi kullanılarak bu karışıklık giderilebilir (72).

Çalışmalarda LAM direnci ile ilişkili YVDD ve YIDD mutasyonları saptanmışken 2001 yılında yapılan bir çalışmada YMDD motifinde yeni bir mutasyon bildirilmiştir. Daha nadir görülen bu mutasyonda 204. kodonda metiyonin yerine serin aa'i gelmektedir (YSDD) (69).

Primer LAM direnç mutasyonlarının, rtM204I/V/S olduğu bilinmektedir. Ancak rtL80I/V, rtV173L, rtL180M mutasyonlarının, tek başına dirence neden olmayan ancak YMDD motif mutasyonları ile birlikte bulunduğu hem replikasyonu arttıran hem de dirence neden olan destekleyici mutasyonlar olduğu bildirilmiştir. A181T ilk olarak uzun süreli LAM tedavisi alan hastalarda YMDD mutasyonu olmadan saptanmıştır fakat yakın zamanda adefovir tedavisi sırasında da gözlenmiştir (122, 123).

Tablo 4. Lamivudin direncine neden olan mutasyonların gruplandırılması. (Kaynak 73' den alınmıştır.)

Grup	rtL80V/I	rtV173L	rtL180M	rtA181T	rtM204V	rtM204I	rtM204S
I	-	-	+	-	+	-	-
II	-	-	-	-	-	+	-
III	+	-	-	-	-	+	-
IV	-	-	+	-	-	+	-
V	-	+	+	-	+	-	-
VI	-	-	-	+	-	-	-
VII	-	-	+	-	-	-	+

Önemli bir diğer konu ise, HBV genomunda pol/rt geninin, S geni ile binişik olmasıdır. Lamivudin ile seçilen HBV pol/rt mutasyonları, S geninde mutasyonlara yol açabilmekte ve bu mutasyonlar, HBsAg proteinlerinin aa dizisini dolayısıyla antijenik özelliğini değiştirebilmektedirler (Tablo 5). Toressi ve arkadaşları bu mutasyonlara bağlı olarak antijenik yapısı değişmiş olan HBsAg'ye, anti-HBs antikörlerinin daha az bağlandığını bildirmişlerdir. Anti-HBs'ye affinitesi azalmış HBsAg, tanıda problemlere veya aşı ya da HBIG ile infeksiyonun önlenmesinde başarısızlığa yol açabilmektedir (124,125,104).

Tablo 5: HBV pol/rt geni lamivudin direnç mutasyonları ve S genindeki karşılıkları

HBV pol/rt geni	S geni
rtV173L	E164D
rtM204I	W196S/L
rtM204V	I195M
rtV207I	M198I
rtL180M	Etkisiz
rtL80V/I	Etkisiz

LAM tedavisi sırasında ortaya çıkan mutasyonlar, genellikle tedavinin 6. ayından sonra görülmeye başlar ve görülme sıklığı zamanla artar. Tedavinin birinci yılında mutasyon oranı %15 civarında iken, dördüncü yılda bu oran %67'ye yükselmektedir (2). Mutant gelişimi sonucunda virolojik ve biyokimyasal parametrelerde bozulma saptanır. Tedavi sırasında baskılanmış olan HBV DNA düzeyi yeniden ölçülebilir düzeye yükselir veya tedavi ile inilen noktaya göre en az 1 log₁₀'luk artış meydana gelir, ALT artar. HBV DNA artışı karaciğer hastalığının alevlenmesinden öncedir ve moleküler yöntemlerle aylar öncesinden ortaya konabilir. Lamivudine direnç sağlayan mutasyonlara, tedavi öncesi ALT ve HBV DNA düzeyi yüksek olan ve viral replikasyonun tam baskılanamadığı hastalarda daha sık rastlanmaktadır (68,74).

Lamivudin dirençli mutant infeksiyonunun uzun dönemde doğal seyri iyi bilinmemektedir. Kısa dönem gözlemler, HBV DNA ve ALT seviyelerinin başlangıç değerlerinden daha yüksek olmadığını göstermekte, histolojik olarak karaciğer hastalığının önemli bir ilerleme göstermeyebileceğini ortaya koymaktadır (2). Ancak tedavide başarısızlık sonrasında hepatit alevlenmesi gerçekleşirse sirotik hastalarda hastalığın seyri kötüleşerek kompanze siroz dekompanze siroza dönüşebilir. Karaciğer transplantasyonu yapılan hastalarda ise karaciğer fonksiyon testleri bozulabilir (75).

Günümüzde lamivudine dirençli olguların tedavisinde adefovir kullanılmaktadır. Adefovir kullanılan hastalarda direnç sorununa lamivudin kullanan hastalara oranla daha az rastlanmaktadır; ilk yıl dirence rastlanmazken, ikinci yılda %3, üçüncü yılda %8, dördüncü yılda %18, beşinci yılda ise %29 oranında dirence rastlanmaktadır (76,77). Adefovir kullanan hastalarda dirence neden olan mutasyonlar pol geninin B bölgesindeki rtA181V/T ve D bölgesindeki rtN236T aminoasit değişiklikleridir. rtA181V/T mutasyonunda adefovir duyarlılığı 2 - 4 kat azalırken, rtN236T mutasyonu, duyarlılığı 7 - 13 kat azaltmaktadır. Yakın zamanda rtV214A, rtQ215S, rtI233V mutasyonlarının da adefovire dirençten sorumlu olabileceği gösterilmiştir (105). Lamivudine dirençli olgular genellikle adefovire duyarlı olmasına karşın adefovir ile ilgili deneyimlerin artmasıyla her iki ilaca da farklı düzeylerde direnç gösteren, rtA181T/V, rtV214A / rtQ215S ve A bölgesi (80., 84., 85. kodon) mutasyonlarını taşıyan suşların varlığı gösterilmiştir (78). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada LAM tedavisi başarısız olan hastalarda ADV direnci gelişiminin daha hızlı olduğu bildirilmiştir (122). Adefovire karşı direnç geliştiğinde de virolojik, biyokimyasal ve histolojik parametrelerde bozulma gözlenmektedir (78,79,80). Adefovir direncine yol açan mutasyonlar, kısmen tenofovir direncine de neden olmaktadır.

Entekavir ile yapılan çalışmalarda nadir de olsa direnç gelişimine rastlanmıştır. Direnç, tedavi başlangıcının ilk yılında görülmemekte, en erken ikinci yılda rastlanmaktadır. Entekavir direnci pol geninin E bölgesindeki rtM250V mutasyonu ile oluşmaktadır. Özellikle LAM direnci olanlarda, rtT184G ve rtS202I mutasyonları da entecavir direncine yol açmaktadır (82). Entecavire kısmi dirençten sorumlu bir diğer mutasyon rtl169T'dir (123).

4.9.4. X mutasyonları

X gen bölgesi 465 nükleotidten oluşmaktadır. Virusun replikasyonu ve ekspresyonu için önemlidir. X proteini HBV genlerini transaktive etmekte ve kor promoter, enhancer II, DR1 ile DR2 bu bölgede yer almaktadır (83).

X geninde meydana gelen mutasyonların fonksiyonel önemi tam olarak açıklığa kavuşmamış olmakla beraber bu tip varyantların infektiviteleri zayıf, replikasyon yetenekleri düşüktür. Kronik HBV enfeksiyonlu, HCC'li, fulminant hepatitli ve sirozun son döneminde bulunan hastalarda X geni üzerindeki 130. (AAG (lizin) → ATG(methionin)) ve 131. (GTC (valin) → ATC (izolösin)) kodonlarda nokta mutasyonlar bildirilmiştir. Her iki mutasyon da transaktivasyon için gerekli olan ve genomun 132 - 139. kodonları arasında bulunan enhancer II-kor promoter bölgesinde yer alır. 1770 - 1777. pozisyonlar arasındaki 8 nükleotidlik delesyonunun, DNA ekspresyon ve replikasyonunu baskıladığı ve sonuçta HBsAg'nin negatif hale geldiği bildirilmiştir (83).

4.10. Epidemiyoloji

Bütün dünyada yaygın olarak görülen HBV, akut ve kronik karaciğer hastalığının en önemli nedenlerinden biridir. Erişkinlerde HBV'ye bağlı akut hepatitin ortalama %5'i kronikleşir. Dünyada yaklaşık iki milyar kişinin HBV ile karşılaşmış olduğu ve 360 milyon kişide kronik B hepatiti olduğu düşünülmektedir. Bu olgularda da siroz ve hepatosellüler kanser gelişme riski, sırasıyla %8-20 ve %6-15 civarında olup yılda yaklaşık 520.000 kişinin HBV nedeniyle (50.000 kişi akut hepatit B nedeniyle, 470.000 kişi siroz ve karaciğer kanseri nedeniyle) ölmektedir (6,84,85).

HBV enfeksiyonunun dünyadaki dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. HBsAg ve anti-HBs pozitifliği oranları, enfeksiyonun alınma yaşı ve virüsün en sık hangi yolla bulaştığı gibi kriterler göz önüne alınarak dünya, düşük, orta ve yüksek endemisite bölgelerine ayrılmıştır (84).

Düşük endemisite: Bu bölgelerde taşıyıcılık prevalansı %2'den azdır. Erişkinlerde enfeksiyonla karşılaşma oranı yaklaşık %20 olup, cinsel temas en önemli bulaş yoludur. Etken ile çoğunlukla erişkin dönemde karşılaşılır. Ancak perinatal ya da erken çocukluk dönemlerinde bulaş da önemlidir. Düşük endemisite, daha çok Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda gibi gelişmiş

ülkelerde görülmektedir. Bu ülkelerde HBV insidansı genel popülasyonda düşük iken, hemofili, hemodiyaliz hastaları, eşcinseller ve damar içi uyuşturucu bağımlıları gibi risk gruplarında yüksektir (7).

Orta endemisite: Güney ve Doğu Avrupa, Güney ve Orta Amerika, Orta Asya ile Türkiye'nin de içinde bulunduğu Ortadoğu'da izlenmektedir. Bu grupta, toplumdaki HBsAg pozitifliği %2-8 arasında değişmekte ve erişkinlerin %20-60'ında anti-HBs pozitifliği bulunmaktadır. Başlıca bulaşma yolu yatay olmakla birlikte diğer bulaşma yolları da infeksiyonun yayılmasında rol oynarlar (84,85).

Yüksek endemisite: Afrika ve Asya gibi bölgelerde toplumun %8'den fazlası HBV ile kronik olarak infektidir. Erişkinlerin %70'den fazlasında anti-HBs pozitifdir. Yüksek endemisite bölgelerinde bulaşma sıklıkla perinatal veya horizontaldir. Bu bölgelerde HBsAg pozitif kadınların %35-50'sinde HBeAg pozitifliği bulunmaktadır. Endemik bölgelerde infeksiyonun bebeklikte alınması ve en yüksek taşıyıcı kitlesini çocukların oluşturması, primer hepatosellüler kanser insidansının yüksek olmasına yol açmaktadır (84,85)

HBV infeksiyonu, Türkiye'de karaciğer hastalıklarının başta gelen nedenidir. Viral etiyojolojiye bağlı karaciğer sirozlu hastaların %46'sından, HCC'lerin ise %45-50'sinden HBV sorumludur. Ülkemiz orta derecede endemik bir bölgede yer almaktadır. Taşıyıcılık oranı yaklaşık %6 civarında olmakla birlikte bölgesel farklılıklar göstermektedir. Batı bölgelerinde ortalama %2'ye kadar düşerken, doğu bölgelerinde %10'un üzerinde değerler bildirilmektedir (86).

4.10.1. Bulaş yolları

HBV, infekte kan ya da vücut salgıları ile parenteral temas (perkütan), cinsel temas, infekte anneden yeni doğana bulaşma (perinatal-dikey) ve infekte kişilerle yakın temas (yatay) ile bulaşmaktadır. Oral yolla bulaş ancak infekte kanın hasarlanmış oral mukoza ile temas etmesiyle oluşabilmektedir. Bütünlüğü bozulmuş deri ve göz mukozası da virus bulaşında önemli rol oynamaktadır (7).

Perkütan bulaş: Virüsün perkütan inokülasyonu, infekte kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, infekte aletlerin kullanımı (endoskop, yapay solunum cihazı, akupunktur, enjektör, dövme, vb) veya kan ile temas riskinin fazla olduğu hemodiyaliz gibi işlemler sırasında olmaktadır. Ayrıca infekte kanla bulaşmış havlu, jilet, tıraş

makinesi, diş fırçası, banyo malzemeleri gibi günlük eşyaların ortak kullanımı da perkütan bulaşa neden olabilmektedir. Kan ve kan ürünlerinde HBsAg taramasının zorunlu hale getirilmesinden ve paralı yerine gönüllü donörlerin kullanılmaya başlanmasından sonra transfüzyon aracılığıyla HBV'nin bulaşması oldukça azalmıştır. Aşılamanın yaygınlaşmasıyla korunma sağlanmış olup bulaş azaltılmıştır. (84)

Cinsel temasla bulaş: Homoseksüeller arası cinsel temas, HBV için en riskli cinsel bulaşma yoludur. Hasarlanmış ve bütünlüğü bozulmuş rektal mukozanın infekte kan veya semenle teması riski arttırmaktadır. Genital sekresyonlar kandan daha az konsantrasyonda virus içermelerine karşın bulaşa neden olmaktadır. Heteroseksüel yolla bulaşmada, HBV taşıyıcılarının eşleri en çok tehlike altında olanlardır. Çoklu heteroseksüel partneri veya diğer cinsel yolla bulaşan hastalığı olanlarda risk daha fazladır (84).

Perinatal bulaş: Annenin HBV taşıyıcı olması, hamileliğinin üçüncü trimesterinde veya doğum sonrası ilk iki ayı içinde akut hepatit B enfeksiyonu geçirmesi, perinatal bulaşmaya yol açabilmektedir. Özellikle anne HBeAg pozitifse bulaşma riski artmaktadır. Anneden bebeğe bulaş, doğum esnasında veya doğumdan sonra oluşabilen deri ve mukoza sıyrıklarının infekte maternal sıvılarla teması, vaginal kanaldan geçiş sırasında anne kanının yutulması, sezaryen sırasında anne kanıyla temas veya plasenta hasarı sonucu maternal dolaşımın fetal dolaşıma karışması gibi nedenlerle meydana gelmektedir (84).

Yatay bulaş: Parenteral, cinsel ya da perinatal temasın söz konusu olmadığı durumlarda ortaya çıkan bulaşma yatay (horizontal) bulaşma olarak tanımlanır. Bu tip bulaşmanın mekanizması tam anlaşılmamıştır. Tükürük ve idrar gibi vücut sıvılarının hasarlı deriyle teması da bulaşmaya neden olabilir. Özellikle serumdaki HBV DNA miktarı ile orantılı biçimde idrar, tükürük gibi vücut sıvılarında viral DNA miktarı artmaktadır (87). Yatay yol, özellikle ev içi bulaşmada önemlidir. HBV'nin zeka özürülü çocuk bakımevleri başta olmak üzere anaokulu, kreş, yatılı okul, kışla, yurt, hapisane gibi yerlerde kolay yayıldığı belirlenmiştir. Kalabalık yaşam şartları, kötü hijyen ve düşük sosyo-ekonomik düzey HBV'nin bulaşma oranını arttırmaktadır (7,84).

4.10.2. Risk grupları

Parenteral bulaşma yolu açısından en riskli gruplar, sık kan ve kan ürünleri verilen hemofili hastaları ile sık perkütan girişimde bulunulan hematoloji-onkoloji ve hemodiyaliz hastalarıdır. Damar içi uyuşturucu bağımlıları da ortak enjektör kullanımı nedeniyle perkütan bulaşma açısından risk taşırlar. Sağlık personelinde HBV ile karşılaşma oranı, hastayla temastan çok kanla temas etme oranıyla paralellik göstermektedir. Bu nedenle kanla doğrudan teması daha fazla olan cerrahlar, diş hekimleri, hemşireler, hastabakıcılar, laboratuvar teknisyenleri ve ilk yardım çalışanları yüksek risk altındadırlar.

Perinatal bulaşma yolu açısından riskli grup, HBV taşıyıcısı olan, hamileliğinin son trimesterinde veya doğum sonrasında ilk iki ayı içinde akut HBV enfeksiyonu geçiren, HBeAg pozitif annelerin bebekleridir.

Yatay bulaş yönünden riskli gruplara örnek olarak, sosyoekonomik düzeyi düşük ve kötü hijyen koşullarında kalabalık olarak yaşayan aileler verilebilir. Ayrıca anaokulu, kreş, yatılı okul, kışla, yurt, hapisane gibi toplu yaşam alanlarında HBV yayılımı daha kolay olabilmektedir. Zeka özürlü bireylerin, sosyal ilişkilerde riskli davranışlarda bulunabilmeleri nedeniyle yatay bulaşa daha açık oldukları belirtilmektedir(84).

4.11. Patogenez

HBV sitopatik etkisi olmayan virüslere tipik bir örnektir. Hastalık, immun aracılı doku hasarı ve hepatosit ölümü sonucu gelişmektedir. Virüsün temizlenmesinde, enfekte hücrelerin ortadan kaldırılması tek mekanizma değildir. HBV ile enfekte hayvan modellerinde sitokin aracılı, sitolitik olmayan mekanizmalar ile de virüsün ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir.

HBV enfeksiyonuna yeterli immun yanıt için özgül immun yapıların tanınması gereklidir. Antijen sunan hücreler viral antijenleri işleyerek T hücrelerine sunar. HBV'ye karşı primer immun yanıt lenf nodlarında HBV spesifik T hücreler tarafından başlatılır. Enfeksiyonun erken dönemlerindeki patolojik süreçten özellikle sitotoksik T hücreleri sorumludur. Zarf antijenlerine yönelik sıvısal antikor yanıtı dolaşımdaki viral partiküllerin temizlenmesine yardımcı olurken, zarf, nükleokapsid ve polimeraz antijenlerine yönelik hücresel yanıt enfekte hücrelerin temizlenmesini sağlar. CD4+

hücrelerinden salınan sitokinler sitotoksik T lenfositlerinin anti-viral aktivitesine katkıda bulunur ve böylece immun yanıtın etkinliği artar. Yardımcı ve sitotoksik T hücreleri HBV enfeksiyonu sonrasında birkaç yıl aktif kalmaktadır. Bunun sebebi az miktarda da olsa dolaşımda virus bulunabilmesidir. HBsAg'nin saptanmaması, tüm virus partiküllerinin temizlendiği anlamına gelmez. Bu sonuç, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin HBV'yi kalıcı bir biçimde baskılaması nedeniyledir.

Konak hücrelerine virusun girmesine engel olmak için serbest HBV partiküllerinin nötralizasyonu önemlidir. Zarf antijenlerine karşı oluşan antikolar akut enfeksiyonun ortadan kalkmasından sonra kalıcı hale gelirler. B hücrelerinden antikor üretimi CD4+ T hücrelerinin yardımıyla üretilen sitokin aracılı bir süreçtir.

Kronik enfeksiyonlarda virusun immun sistemden kurtulması için ya virusun T hücreleri tarafından tanınmaktan kurtulması (zayıf peptid sunumu, antijenik değişim, virusun immün sistemden korunmuş yerlerde saklanması) ya da konak immün yanıtının baskılanması (Th1 sitokin fonksiyonunun azalması, virus-spesifik T hücrelerin tükenmesi) gerekmektedir. Kaliteli immün yanıtın ve nötralizan antikor yapımının başlaması için öncelikle antijenik epitoplara, HLA sınıf-II allelleri ile CD4+ T hücre reseptörüne (TCR) sunulmasını gerektirmektedir. Bu yüzden viral persistansın, konağın immünogenetik yapısı ile ilişkisi üzerinde durulmuştur.

HBV enfeksiyonunun kontrolünde sitotoksik T lenfositleri önemlidir. Kronik enfeksiyonlu hastalarda özgül CD8+ T hücre yanıtının olmadığı veya zayıf ve sınırlı epitoplara karşı geliştiği gösterilmiştir. Çeşitli viral proteinlere karşı immun tolerans gelişmesi etkin bir virus temizliğini engellemektedir.

Sonuç olarak immun yanıtın gücü ve kalitesi HBV enfeksiyonunun doğal seyrinde en önemli belirleyici faktördür. İmmun yanıt, enfeksiyonun sınırlandırılması için gerekli olmakla birlikte HBV'nin elimine edilemediği durumlarda viral replikasyon ile immun yanıt arasındaki ilişki karaciğer hasarına yol açmaktadır. Kronik hepatosit hasarına eşlik eden yangı ve rejenerasyon DNA hasarına yol açarak hepatosellüler kanser gelişimi ile sonlanabilmektedir. Viral DNA'nın konak DNA'sına integrasyonu da konak genleri üzerine etki ederek kanser gelişimine katkıda bulunabilmektedir (88,89,90).

4.12. Klinik

HBV infeksiyonu, iyileşme ile sonlanan akut hepatitten fulminan hepatite, inaktif taşıyıcılıktan karaciğer sirozuna kadar değişen farklı klinik tablolar göstermektedir. Bu seyirlerden hangisinin gerçekleşeceği virusa ve konakçıya ait çeşitli faktörler tarafından belirlenir. HBV infeksiyonunun seyri Şekil 4'te gösterilmiştir.

Akut HBV infeksiyonu: Klinik gidiş infeksiyonun alındığı yaşa, virusun genetik özelliklerine, eşlik eden başka hepatotrop virus infeksiyonunun varlığına ve konakçının immün yanıtına bağlıdır. Yenidoğan döneminde alınan infeksiyon %90 oranında kronikleşirken, bu oran ilk beş yaşta %30'a, erişkin çağda %5'in altına inmektedir. Yenidoğan ve erken bebekte geçirilen infeksiyonlar genellikle asemptomatiktir. Bununla birlikte erişkin dönemde alınan infeksiyon %30 - 50 oranında sarılıkla seyretmektedir(35,85).

Akut HBV infeksiyonunun inkübasyon dönemi 4 - 28 hafta olarak belirlenmiş olup çoğu vakada bu süre 60 - 180 gündür. Hepatitin ortaya çıkması, serumda HBsAg'nin saptanmasından ortalama 4 hafta (1 - 7 hafta) sonradır (7).

Akut hepatitin başlangıç semptomları belirgin değildir. Semptomatik akut HBV infeksiyonu hafif (anikterik) veya ciddi ve ikterle birlikte olabilir. HBV'yi almış olan erişkinlerin %5-20'sinde klinik olarak belirgin akut hepatit belirtileri ortaya çıkmaktadır. Tipik semptomlar, halsizlik ve yorgunluk olup bunu iştahsızlık, bulantı, kusma ve sağ üst kadranda hafif künt bir ağrı takip eder. Preikterik dönemdeki bu semptomlar genellikle 3 - 10 gün sürer (7).

Sarılığın başlaması ve koyu idrar çıkması ile ikterik dönem başlar. Total serum bilirubini genellikle 10 - 14 gün yüksektir ve çoğu hastada 10 mg/dl'yi geçmez. Akut viral hepatitin esas göstergesi serum transaminazlarının hızlı yükselişidir. Transaminazların artışı semptomlardan önce başlar ve genellikle semptomların birinci haftasında en yüksek düzeyindedir. Düzey genellikle 1000 Ü/ml'nin üzerindedir ve alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST)'dan daha yüksektir. Serum alkalin fosfataz seviyesi normal veya hafif yükselmiştir. Hastaların bir kısmında birkaç gün süren hafif kaşıntı oluşur, nadiren kaşıntı uzayabilir. Kolestazın ilerlemesi ile idrar koyu, dışkı açık veya çamur renginde saptanır. Sarılığın süresi genellikle 1 - 3 haftadır, nadiren 4 haftayı aşar. Çocuklar genellikle 2 haftada, erişkinler ise 4 - 6 haftada iyileşir (7).

Fulminan hepatit, karaciğer yetmezliği ve ensefalopatinin eşlik ettiği, mortalitesi yüksek, ciddi bir formdur. Akut HBV hepatitli olguların %1 - 2'sinde fulminan tablo oluşabilir ve %63 - 93 oranda fatal seyirlidir. Fulminan hepatitten ölüm genellikle semptomların başlangıcından sonraki 1 - 3 hafta içinde olur.

Kronik HBV enfeksiyonu: HBV enfeksiyonunun doğal seyri enfeksiyonun alındığı yaşa göre değişmektedir. Erken yaşlarda immün sistemin yeterince olgunlaşmamış olması nedeniyle virüse karşı yetersiz yanıt sonucu **immün tolerans** dönemi başlar. Bu dönemde immün yanıt yetersiz olduğu için virüs çoğalmakta ama karaciğer hücreleri tahrip olmadığı için ALT düzeyleri normal bulunmaktadır. Immün tolerans dönemin özellikleri şunlardır:

HBeAg pozitifliği

HBV DNA yüksekliliği

Normal ALT

Normal karaciğer biyopsisi

İmmün tolerans dönemi 10 - 30 yıl devam ettikten sonra olasılıkla virüsünantijenik yapısındaki bazı değişiklikler nedeniyle sonlanır ve konakta virüsle infekte hepatositlere karşı immün yanıt oluşmaya başlar. Bunun sonucunda HBV DNA düzeyi düşer, hücre yıkımından dolayı ALT düzeyi yükselir, karaciğer biyopsisinde kronik hepatit bulgularına rastlanır ve sıklıkla HBeAg serokonversiyonu görülür. HBeAg serokonversiyon oranı yaşlılarda, kadınlarda, ALT düzeyi yüksek olanlarda ve genotip B ile infekte kişilerde (genotip C'ye göre) daha yüksektir.

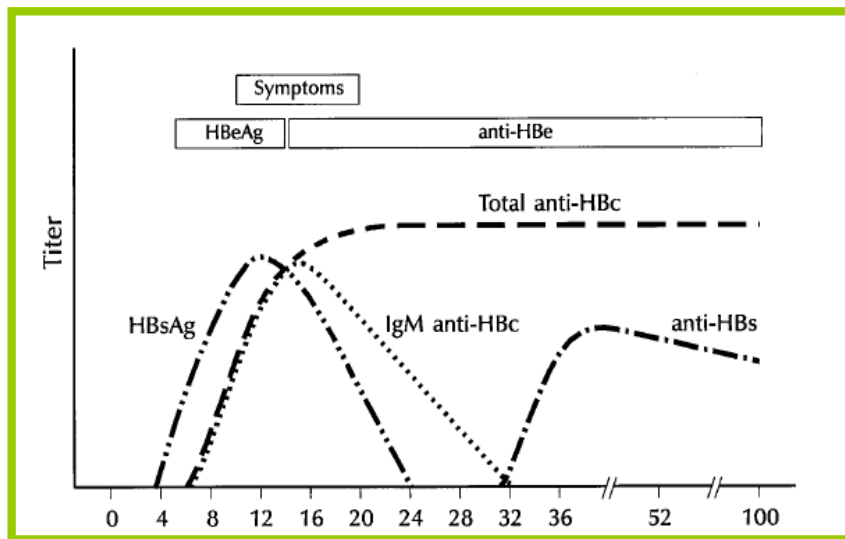
Hastalar **immün temizlenme** döneminde akut alevlenmeler hariç çoğunlukla asemptomatiktir. Akut alevlenme döneminde hastaların HBV enfeksiyonu önceden bilinmiyorsa, anti-HBc IgM pozitifliği nedeniyle hatalı akut HBV tanısı konulabilir. İmmün temizlenme dönemi ne kadar aktif ve uzun sürerse siroz gelişme riski o kadar artar. Eğer bu dönem kısa sürer ve aşırı alevlenmeler görülmez ise immün temizlenme döneminden sonra hasta inaktif taşıyıcı durumuna gelir.

İnaktif taşıyıcılıkta immün temizlenme sırasında hastalarda infekte hepatositlerin büyük oranda temizlenmesi ve virüsün baskılanması nedeniyle kalıcı bir HBeAg negatifliği ve anti-HBe pozitifliği meydana gelir. Virüsün replikasyonu ve

antijen ekspresyonu azalır. HBV DNA düzeyi 10^{4-5} kopya/ml'nin altındadır. HBsAg pozitif saptanır ancak klinik bulgu yoktur. Hepatosellüler karsinom gelişme riskinin yüksek olması dışında prognoz oldukça iyidir. Bununla birlikte %20 - 30 olasılıkla HBV DNA'nın ve ALT'nin yükselmesi, bazen de HBeAg'nin yeniden pozitifleşmesi ile giden alevlenmeler görülebilir. Bu alevlenmeler sonrasında kronik hepatit gelişebilir.

HBeAg negatif kronik hepatit ise HBeAg serokonversiyonu sonrasında bazı hastalarda replikasyonun devam etmesidir. Hastalarda HBsAg (+), HbeAg (-), anti-HBe (+) ve HBV DNA pozitifdir ($>10^{4-5}$ kopya/ml). HBeAg'nin sekresyonunu engelleyen mutasyonlardan dolayı immün tolerojen sayılan HBeAg salınamaz ama replikasyon devam eder. Hastaların %50'den fazlasında orta-ağır nekroinflamasyon bulguları vardır. Kendiliğinden kalıcı remisyona girme olasılığı çok düşüktür. Hastalık ALT dalgalanmalarıyla seyredebileceği için ALT normal olan zamanlarda inaktif taşıyıcılıktan ayırmakta güçlük çekilebilir. Hastalarda en az bir yıl boyunca anti-HBe pozitif olması, zaman zaman veya sürekli ALT yüksekliği ve viral yükün $>10^{4-5}$ kopya/ml olması, HBeAg negatif kronik hepatit lehinedir. Uzun dönemde hastalığın prognozu iyi değildir.

Kronik HBV infeksiyonlarının hepsi karaciğer komplikasyonları ile sonuçlanmaz. Virusun alındığı yaş çok önemlidir. Adolesan ve genç erişkin döneminde ortaya çıkan kronik infeksiyonlarda siroz ve hepatosellüler kanser gelişme riski %15 civarında iken erken çocukluk döneminde bu oran %25'in üzerindedir (6,85).



Şekil 4: Akut HBV infeksiyonunun haftalara göre seyri (Kaynak 91'den alınmıştır).

4.13. Tanı ve antiviral ajanlara direncin saptanması

4.13.1. Tanı

Akut ve kronik hepatitte, tanıda en önemli testler HBV'ye ait nükleik asit, antijen ve antikorların değerlendirildiği özgül testlerdir. Özgül testlerin yanısıra karaciğer hasarını değerlendirmek amacıyla da çeşitli hematolojik ve biyokimyasal testlerden yararlanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan "Karaciğer Fonksiyon Testleri" arasında karaciğer parankim hasarını saptamada aminotransferazlar, özellikle de karaciğerde lokalize olan ALT oldukça yararlıdır. Özgül tanıda, virüse ait antijenler HBsAg, HBeAg ve bunlara karşı oluşan anti-HBs, anti-HBe ve anti-HBc antikorları kullanılır. Ayrıca replikatif viryonların varlığını araştıran moleküler tabanlı testler (kalitatif / kantitatif HBV DNA) tanı ve tedavinin izleminde önemli bir yer tutmaktadır (1,5,7).

HBsAg, HBV ile temastan 1 - 12 hafta sonra veya semptomların başlangıcından 2 - 8 hafta önce serumda saptanır ve yaklaşık 3 ay sonra kaybolur. HBsAg'nin altı aydan uzun süre pozitif saptanması, infeksiyonun kronikleştiğinin göstergesidir. Erişkin dönemde geçirilen infeksiyonların %95'inde HBsAg silinirken, %5'inde kronik HBsAg taşıyıcılığı gelişir. HBsAg kaybolduktan sonra (hastalığın başlangıcından 3 ay sonra), anti-HBs oluşur. Bu antikor, iyileşmeyi ve immünitelyi gösterir. Anti-HBs çoğu kişide hayat boyu kalır. Anti-HBs ile birlikte anti-HBc IgG'nin saptanması geçirilmiş infeksiyona bağlı bağışıklıklığı, sadece anti-HBs pozitifliği ise aşılama ile oluşan koruyuculuğu gösterir (1,5,7).

HBcAg, sadece infekte karaciğer hücrelerinde saptanabilir. Anti-HBcIgM ve IgG semptomların başlamasıyla ortaya çıkar. Anti-HBcIgM birkaç ay pozitif kalır ve hastalığın başlangıcından 4 - 8 ay sonra serumda saptanamaz. HBsAg'nin serumdan kaybolup anti-HBs gelişinceye kadar geçen tanısal pencere döneminde anti-HBcIgM'in varlığı akut infeksiyonu gösteren en önemli göstergedir. Anti-HBc IgG yıllarca veya hayat boyu pozitif kalabilir (1,5,7)

HBeAg viral replikasyonun devam ettiğini ve infektiviteyi gösterir. HBsAg'den kısa bir süre sonra pozitifleşir, 10 haftadan daha uzun süre devam etmesi infeksiyonun kronikleşeceğinin belirtisidir. Anti-HBe nisbeten düşük infektivitenin ve hastalığın iyileşeceğinin bir göstergesidir. Anti-HBe genellikle akut infeksiyondan yıllar sonra kaybolur. HBeAg, replikasyon göstergesi olarak kabul edilse de, sentezi

önleyen mutasyonların gelişmesi sonucu anti-HBe pozitif replikatif suşlar bulunabilmektedir (1,5,7,92).

HBV-DNA'nın serumda saptanması, viral replikasyonun belirlenmesinde, özellikle HBeAg negatif olgularda infeksiyonun tanısında ve tedavinin izleminde kullanılmaktadır. Akut HBV infeksiyonu sırasında HBsAg, HBV ile temastan 1-12 hafta sonra veya semptomların başlangıcından 2-8 hafta önce pozitifleşirken HBV DNA serum transaminaz düzeyleri ile paralel olarak HBsAg'den 3-5 hafta önce saptanabilmektedir. HBV DNA'nın saptanması ve kantitasyonu amacıyla farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar, hibridizasyon temelli (sinyal amplifikasyonu) ve nükleik asit amplifikasyonu (PZT vb) temelli tekniklerdir (93). Testlerin arasında duyarlılık ve kantitasyon aralığı açısından farklar vardır. Hibridizasyon temelli tekniklerde yakalama sınırı 10^{4-5} kopya/ml, kantitasyon aralığı 3-4 log'dur. Klasik nükleik asit amplifikasyonunda ise 10 - 100 kopya/ml saptayacak duyarlılığa ulaşılmakta ancak kantitasyon üst sınırı 10^5 kopya/ml'yi aşamamaktadır. Gerçek zamanlı PZT yönteminde standardizasyon sağlanabilirse her iki tekniğin avantajları birleştirilebilmekte ve yakalama sınırı 10 - 100 kopya/ml'ye kadar inebilmekte kantitasyonun üst sınırı ise 10^{9-10} kopya/ml'ye kadar çıkabilmektedir (94,95).

4.13.2. Antiviral ajanlara direncin saptanması:

Nükleozit/nükleotid analoglarına karşı direnç gelişimi sıklıkla HBV DNA polimeraz gen bölgesi mutasyonları sonucu olmaktadır. Direnç araştırmada kullanılan yöntemler indirekt, fenotipik ve genotipik yöntemler olarak üçe ayrılmaktadır. Genotipik yöntemler viral dirençle ilişkili daha önce tanımlanmış mutasyonlar hakkında bilgi verirken, fenotipik yöntemler hücre kültüründe hastadan izole edilmiş virusların, ilaca karşı olan duyarlılığını ölçmemizi sağlamaktadır (106).

İndirekt yöntemler:

HBV DNA viral yük tayini

İlaç düzeyi analizi (3)

Fenotipik yöntemler (106):

Hücre kültürü veya deney hayvanlarında, HBV DNA replikasyonu ve ilaca duyarlılık değerlendirilir. Replikasyon bazlı yöntemler ikiye ayrılmaktadır:

Vektörsüz fenotipik testler

Vektörlü fenotipik testler

Genotipik Yöntemler (96,106):

Tüm genotipik yöntemler hasta serumundan izole edilen HBV-DNA'nın bir bölümünün veya tamamının PZT ile amplifikasyonunu baz almaktadır.

Dizi analizi

Restriksiyon enzim analizi (RFLP; Restriction fragment length polymorphism)

Strip hibridizasyon (LiPA ; Line Probe Assay)

Gerçek zamanlı PZT

Diğer yeni geliştirilen genotiplendirme yöntemleri arasında DNA çip, "mini-sequencing" karışık hibridizasyon-dizi analizi-PZT, "mass spectrometry", lusiferaz testleri, guanin oksidasyon sinyalini ölçen elektrokimyasal biyosensörler , "revers dot blotting" bulunmaktadır.

Dizi analizi için seçilmiş gen bölgesi (direkt veya klonlanarak) PZT ile çoğaltılır. PZT ürünü saflaştırılarak nükleotid dizisi otomatize cihazlarda tek veya çift yönlü olarak belirlenir. Araştırılan gen bölgesine ait dizi, referans dizi ile eşleştirilerek nükleotid ve aminoasid değişimleri araştırılır. Direkt uygulanan dizi analizinde mutasyonun saptanabilmesi için mutant nükleotidin, incelenen virus popülasyonunda baskın olması gereklidir. Virus popülasyonu içerisinde % 30'dan az oranda bulunan mutant suşlar bu yöntemle saptanamazlar. En önemli avantajı yeni mutasyonları saptamaya açık olmasıdır. Dizi analizinin iş yükü fazladır ve özel ekipman gerektirir (3,96,97).

REA, yöntem olarak PZT sonrası elde edilen ürünün araştırılan bölgesinin restriksiyon endonükleazlar aracılığıyla tanınması ve kesilmesi esasına dayanır. Bir veya daha fazla endonükleaz tarafından kesilerek elde edilen DNA fragmanlarının jel elektroforezinde incelenmesiyle mutasyon varlığı araştırılır. Dizi analizi gibi iş yükü

fazla olan bu yöntem, optimize edildiğinde baskın olmayan viral popülasyonu da saptayabilmesi açısından dizi analizine üstündür (96, 98).

LiPA ise mutasyon araştırılan gen bölgesinin öncelikle PZT ile çoğaltıldığı, daha sonra araştırılan mutasyonların problar aracılığıyla tespitine dayanan bir yöntemdir. PZT ürünü, şeritler üzerine yerleştirilmiş oligonükleotid problara komplementer ise hibridizasyon gerçekleşmekte ve şerit üzerinde enzim-substrat kullanılarak gerçekleştirilen kimyasal reaksiyon neticesinde hibridler bantlar şeklinde görüntülenmektedir. Oluşan bu bantlar referans şerit ile karşılaştırılarak mutasyon varlığı araştırılır. Sadece bilinen mutasyonları saptayabilen, minor popülasyonları da yakalayabilen ancak pahalı bir yöntemdir (99,100).

Gerçek zamanlı PZT ise araştırılan mutasyona uyum olarak hazırlanmış prob/problar kullanılarak amplifikasyonla eş zamanlı saptama yapabilen bir yöntemdir. Problar farklı boylarla işaretlenerek saptama yapılabileceği gibi, erime ısı analizine dayalı olarak da mutasyon belirlenebilir. Erime ısı analizi, prob / amplikon hibridinin erime ısısının, probdan elde edilen sinyalin, ortam ısısının giderek arttırılması sırasında incelenmesi ile belirlenir. Mutasyona özgü erime ısısının belirlenmesi ile tanı konur. Sadece bilinen mutasyonları saptayabilen bir yöntemdir. Bu yöntemin en önemli avantajları, hızlı sonuç vermesi, nispeten ucuz olması ve otomatize sistemle çalışıldığı için daha az iş gücü gerektirmesidir (4,101,102).

Genotipik yöntemlerin karşılaştırılması Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6: Mutasyon analizi için kullanılan yöntemlerin karşılaştırması.

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
Dizi analizi	Dizinin tamamı incelenir Yeni mutasyonlar belirlenebilir	Fazla iş gücü gerektirir %30'dan az olan popülasyonlar saptanamaz Pahalı ekipman gerektirir
RFLP	Çok sayıda örneğin çalışılmasına uygundur Minor popülasyonu da saptayabilir	Fazla iş gücü gerektirir Bilinen mutasyonlar incelenebilir
LIPA	Çok sayıda örneğin çalışılmasına uygundur Standardize edilmiş, ticari test bulunmaktadır Minor popülasyonu da saptayabilir	Pahalıdır Bilinen mutasyonlar incelenebilir
Gerçek Zamanlı PZT	Hızlıdır Eş zamanlı olarak kantitasyon da yapılabilmektedir. Maliyeti düşüktür.	Pahalı ekipman gerektirir. Bilinen mutasyonlar incelenebilir

4.14. Kronik B Hepatitinde tedavi:

Günümüzde kronik B hepatiti tedavisinde hastanın klinik özelliklerine göre aşağıdaki ilaçlar kullanılmaktadır.

Interferon alfa 2a ve 2b

Lamivudin

Adefovir

Entekavir

Telbivudin

KHB tedavisinde kullanılmak üzere yeni nükleozit/nükleotid analogları geliştirilmektedir. Bu ilaçlardan klevudin, emtrisitabin ve tenofovir tedavide kullanılmaya aday ilaçlardır (81).

Interferonun antiviral, antiproliferatif ve immün sistemi düzenleyici etkileri bulunmaktadır. HBV çoğalmasını engelleyerek karaciğerdeki hasarı azaltıcı etki göstermektedir (103).

Lamivudin, L-konformasyona sahip bir nükleozid analogu olup sentezlenmekte olan DNA zincirine katılarak hepadnavirus DNA sentezini sonlandırıp, hem DNA'ya hem de RNA'ya bağımlı DNA sentezini inhibe eder. Sonuçta virus replikasyonu bloke olur (112). Günümüzde kronik B hepatitinde en yaygın kullanılan ilaçtır. Ucuz bir ilaç olup toksisitesi azdır. KHB hastalarında LAM'ın uygun dozunu belirleme, güvenlik ve etkinlik açısından yapılan çalışmalarda, Dienstag ve ark. günlük 100 mg ve 300 mg dozlarla LAM tedavisinin 12. haftasında bütün hastalarda HBV-DNA düzeyinin saptanamayacak düzeyde olduğunu ve 100 mg /gün dozuyla sağlanan etkinin yüksek dozların etkinliği ile benzer olduğunu belirlemişlerdir (113). Emtricitabine, telbivudine ve clevudine benzer yapıya sahip diğer nükleozid analoglarıdır.

KHB tedavisinde tam iyileşme sağlanabilmesi için viral replikasyonun baskılanması yeterli olmayıp hem hepatosit içindeki viral cccDNA'nın hem de ekstrahepatik rezervuarlardaki HBV'nin eradikasyonu gerekir. Bugüne dek yürütülmüş olan çalışmalar LAM başta olmak üzere geliştirilen anti-HBV ajanların cccDNA ve ekstrahepatik rezervuarlara etkisiz olduğunu ortaya koymuştur. cccDNA'nın yarılanma süresi çok uzun olup, hepatosit ölümüne bağlı gözükmektedir. Bu durumda infekte hücrelerin eliminasyonu, hepatosit içindeki cccDNA'yı etkisiz kılmanın en olası yoludur. İnfekte hepatositlerin öngörülen yarıömürü 100 günden uzun olduğundan, viral kinetik çalışmalara dayanılarak 1 yıllık antiviral tedavi ile infekte hücre sayısının başlangıç değerinin yaklaşık %8'inin düşürülebileceği tahmin edilebilir (117). Tedavi süresinin uzatılması ise viral mutasyon ve direnç sorununu beraberinde getirmiştir. Liaw ve arkadaşlarının Asya çalışmasında bir yıllık tedavi sonucunda direnç oranını %14, iki yıllık takip sonucunda %40 olarak saptamışlardır (114). LAM tedavisinin etkinliğini arttırmak için interferon alfa ile kombinasyon tedavisine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Schalm ve arkadaşları 230 KHB hastasında LAM, IFN ve IFN+LAM kombinasyonu uygulamasında serokonversiyon

oranını sırasıyla %18, 19 ve %29 olarak saptamışlardır (115). Perillo ve arkadaşları ise 805 KHB hastasında LAM, IFN ve IFN+LAM uygulaması sonucunda HBeAg negatifleşme oranını en yüksek LAM tedavisi uygulananlarda saptamışlardır (116).

İlaç direncini azaltmak ve etkiyi hızlandırmak için kombine tedavilerden yararlanılabilir. Farklı kombinasyon tedavilerini birbiriyle ve tekli ilaç kullanımı ile karşılaştıran çalışmalar devam etmektedir.

Adefovir, nükleotid analogu olup DNA polimerazı inhibe eder. Özellikle lamivudine direnç geliştiren hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak pahalı ve nefrotoksik bir ilaçtır. Uzun süreli kullanımı sonucunda lamivudine oranla daha nadir olmakla birlikte polimeraz gen bölgesinde mutasyonlar görülebilmektedir (103).

HBV tedavisinde kullanıma giren üçüncü grup ilaçlar arasında bugüne dek geliştirilen en potent etkili anti-HBV ajan olan entecavir bulunmaktadır (105).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, kronik HBV enfeksiyonu nedeniyle lamivudin tedavisi alan olguların serum örneklerinde, lamivudin direncine neden olan HBV DNA polimeraz geni mutasyonlarının izlenmesi ve mutasyonların belirlenmesinde dizi analizi, strip hibridizasyon (LiPA; INNOLiPA HBV DR, Innogenetics, Belçika) ve restriksiyon enzim analizi yöntemleri karşılaştırılmıştır. Mutasyonların gelişimi ile HBV DNA viral yük miktarı arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla, ticari bir gerçek zamanlı PZT kiti (Artus HBV RG PCR, Qiagen, Almanya) kullanıldı. Tedavi öncesi serum örneğinde YMDD mutasyonu saptanan bir olguda tedavi öncesi ve tedavinin 9. ayına ait serum örneklerinden klonlar elde edilerek dizi analizi yapıldı.

5.1. GEREÇ

5.1.1. Çalışma grubu ve örnekler

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'nın izlediği, kronik B hepatiti nedeniyle lamivudin tedavisi başlanan olguların serum örnekleri kullanıldı. Bu olguların ortak özellikleri, 6 aydan uzun süreli HBsAg pozitifliği, HBV DNA pozitifliği (kantitatif PZR ile 10^4 kopya/ml), ALT yüksekliği (son bir yılda, normalin 1,5 katı) ve karaciğer biyopsisinde belirgin nekroinflamatuvar aktivitesinin saptanmış olmasıydı.

Olgular, iki grupta değerlendirildi:

- Grup A: Tedavi öncesi ve tedavinin 3, 6, 9, 12. ayına ait seri serum örnekleri bulunan 30 olgu,
- Grup B: Seri örnekleri olmayan ancak tedavinin farklı zamanlarına ait serumları bulunan 16 olgu. Grup B'de, 11 olgunun 12. ay, 14 olgunun 24. ay ve 9 olgunun 36. ay serum örneği çalışmaya alındı. Serum örnekleri, ana tüpten filtreli pipet uçları kullanılarak nükleaz içermeyen steril ependorflara alındı. Örnekler -20°C 'de saklandı.

5.1.2. Ayraçlar

5.1.2.1. Agaroz jel elektroforezi için kullanılan ayraçlar

1- EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) (Sigma E5134)

	<u>0.5 M</u>
Na ₂ EDTA	18.6 g
Distile su	100 ml

EDTA pH=8'de erir. pH'ı ayarlamak için NaOH pelleti kullanıldı. Daha sonra otoklavlandı.

2- Tris-Borik asit-EDTA (TBE 5X)

Tris base (Sigma, T8524)	54 g
Borik asit (Sigma, B6768)	27.5 g
0.5 M EDTA	20 ml

Distile su ile 1000 ml' ye tamamlandı.

3- Agaroz (Sigma, A9539)

4- Etidyum bromid (1000X, 5 mg/ ml) (Sigma E8751)

Etidyum bromid	0.5 g
Distile su	100 ml

Işıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplandı.

5- Jel yükleme tamponu (6X)

%0.25 bromfenol mavisi (Sigma B5525) (%10'luk stoktan)	0.75 ml
%0.25 xylene siyanol FF (Sigma X4126) (%5'lik stoktan)	1.5 ml
%30 gliserol (su içindeki karışımı)	9 ml
Distile su	18.75 ml

6- DNA büyüklüğü belirleyicisi

"pBR 322 DNA/BsuRI (*Hae*) Marker,5" (Fermentas SM0271)

“GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder” (Fermentas SM0371)
“50 bp StepLadder” (Sigma S7025)

5.1.2.2. Viral nükleik asit ekstraksiyon kiti

“High Pure Viral Nucleic Acid Kit” (Roche 1 858 874)
“PureArt™ DNA Mini Kit ” (Qiagen-Artus 90204-50)

5.1.2.3. dNTP karışımı

“10 mM dNTP Mix” (Fermentas R0192)

5.1.2.4. Taq DNA Polimeraz

“Hot Start Taq DNA Polymerase” (Fermentas EP0602)

5.1.2.5. Kullanılan öncüller, dizileri ve hedef bölgeleri

- Dizi analizi için gerçekleştirilen dış PZT’de kullanılan öncüller (119):

<u>Öncül adı</u>	<u>Tip</u>	<u>Dizi</u>	<u>Hedef bölge</u>
P1s	Ön öncül	5'-CCCTGCTCGTGTTACAGGCGG-3'	188-208 nt
P2a	Ters öncül	5'-GTTGCGTCAGCAAACACTTGGCA-3'	1199-1181 nt

- Dizi analizi için gerçekleştirilen iç PZT’de kullanılan öncüller (119):

<u>Öncül adı</u>	<u>Tip</u>	<u>Dizi</u>	<u>Hedef bölge</u>
P3s	Ön öncül	5'-GACTCGTGGTGGACTTCTCTCA-3'	253-274 nt
P4a	Ters öncül	5'-GGCATTAAAGCAGGATAACCACATTG-3'	1061-1036 nt

- Restriksiyon enzim analizi için gerçekleştirilen PZT’lerde kullanılan öncüller (98):

<u>Öncül adı</u>	<u>Tip</u>	<u>Dizi</u>	<u>Hedef bölge</u>
F1	Ön öncül	5'-CACTGTTTGGCTTTCAGTCAT-3'	720-740 nt
F3	Ön öncül	5'-GTGGGCCTCAGTCCGTTTCTC-3'	648-668 nt
B2	Ters öncül	5'-GTTCAAATGTATACCCAAAG-3'	839-820 nt

5.1.2.6. PZT ürünü saflaştırma kiti

“EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit” (Bio-Basic Inc. BS-364)

5.1.2.7. HBV DNA kantitasyon kiti

“Artus HBV RG PCR kit” (Qiagen, Almanya)

5.1.2.8. “LiPA” kiti

“INNO-LiPA HBV DR v1” (Innogenetics, Belçika)

5.1.2.9. Restriksiyon Enzimleri

Nde I (Promega R6801)

Hsp92 II (Promega R7161)

5.1.2.10. Yüksek rezolüsyonlu agaroz

“MetaPhor Agarose” (Cambrex 50180)

5.1.2.11. Klonlama ile ilgili reaktifler

“TA Cloning Kit” (Invitrogen, ABD K2000-01)

LB broth (Sigma-L3022)

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) (AppliChem A4978)

N,N-Dimethylformamide (Sigma D4551)

5.1.2.12. Plazmit DNA izolasyon kiti

“Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega A1330)

5.1.2.13. Klonlanmış HBV DNA polimeraz gen bölgesi fragmanları:

HBV DNA polimeraz gen bölgesi YMDD motifinde farklılık gösteren HBV izolatlarından elde edilen klonlar kullanıldı. Klonlar pCR 2.1 vektörüne (Invitrogen) yerleştirilmiş olarak Erasmus Tıp Merkezi Moleküler Viroloji Laboratuvarı'ndan sağlandı (Rotterdam, Hollanda). Klonlar, vektör ile uyumlu *E. coli* (One shot INVαF', Invitrogen) hücrelerinde çoğaltılarak saflaştırıldı.

Klonlar:

1) **YMDD klonu:** 5' ... TAT **ATG** GAT GAT ...3' motifini içermektedir.

2) **YVDD klonu:** 5'... TAT **GTG** GAT GAT ...3' motifini içermektedir.

3) **YIDD klonu :** 5'... TAT **ATT** GAT GAT ...3' motifini içermektedir.

5.2. YÖNTEM

5.2.1. Serum örneklerinden HBV-DNA'nın elde edilmesi

HBV-DNA eldesinde "High Pure Viral Nucleic Acid Kit" kullanıldı. Yöntemde kısaca, hedef nükleik asidi ortaya çıkarmak için serum, proteinaz K içeren tampon ile inkübe edildi. Kolon santrifüjleme yöntemi kullanılarak, nükleik asit, "fiber glass" yüzeye bağlandı. Yıkama basamaklarından sonra, nükleik asit, su içerisinde toplandı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda işlem aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

Tek bir serum örneği için;

Her bir çalışma için taze çalışma solüsyonu hazırlandı (5 µl poly A+ 250 µl "Binding Buffer")

200 µl serum, 200 µl çalışma solüsyonu ve 50 µl proteinaz K hemen karıştırılarak 72°C'de 10 dakika inkübe edildi.

Karışımın üzerine 100 µl isopropanol eklenip tekrar karıştırıldı.

Örneğin tümü filtrasyon tüpüne aktarıldı. 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.

Süzülen karışım atıldı. Filtre yeni tüpe aktarıldı.

Filtrasyon tüpüne 500 µl "Inhibitör Removal Buffer" eklendi. 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.

Süzülen karışım atıldı. Filtre yeni tüpe aktarıldı.

Filtrasyon tüpüne 450 µl yıkama solüsyonu eklendi. 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.

Süzülen karışım atıldı. Filtre yeni tüpe aktarıldı.

İkinci kez filtrasyon tüpüne 450 µl yıkama solüsyonu eklendi. 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtrede, kalan sıvıyı atmak için 13000 x g 'de 10 saniye santrifüj edildi

Süzülen karışım atıldı. Filtre steril 1.5 ml'lik reaksiyon tüpüne aktarıldı.

Filtrasyon tüpüne 50 µl su eklendi. 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.

Elde edilen 50 µl nükleik asit alikotlanarak kullanımına kadar -20°C'de saklandı.

5.2.2. Agaroz jel elektroforezi

DNA dizi analizi, LiPA ve REA için gerçekleştirilen PZT'lerde ürünün görüntülenmesi amacı ile %2'lik agaroz jel elektroforezi kullanıldı.. Bunun için 50 ml 1x TBE içine 1 gr agaroz eklendi. Isı ile eritildi ve soğuma sırasında etidyum bromid (5 mg/ml) çözeltisinden 2,5 µl eklendi. Tarakları hazırlanmış jel kalıbına döküldü. Jel donduktan sonra tarakları çıkarılarak jel tankına yerleştirildi. PZT ürünleri, jel yükleme tamponu ile 1/6 oranında (2 µl jel yükleme tamponu + 10 µl PZT ürünü) karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Bir kuyucuğa da, görüntülenmek istenen ürün uzunluğuna uygun DNA belirleyicisi konuldu. Elektroforez, jelle 1xTBE içinde 25-40 dakika süreyle 120 volt uygulanarak gerçekleştirildi. Jeldeki bantlar, ultraviyole transilüminatörde 280-340 nm dalga boyunda incelendi. Bant büyüklükleri DNA belirleyicisi ile karşılaştırıldı ve DNA dizi analizi dış PZT için 1010 bp, iç PZT için 807 bp, LiPA dış PZT için 409 bp, iç PZT için 342 bp, REA dış PZT için 192 bp, REA iç PZT için 119 bp uzunluğunda elde edilen bantlar olumlu olarak değerlendirildi.

REA yönteminde kesilmiş ve kesilmemiş PZT ürünleri arasındaki bant uzunluk farkları çok az olduğu için (24 bp ve 22 bp), sonuçların değerlendirilmesi amacı ile %4'lük yüksek rezolüsyonlu agaroz jel (MetaPhor Agarose) kullanıldı. 150 ml 1xTBE içine 6 gr yüksek rezolüsyonlu agaroz eklendi. Jel, üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı. Etidyum bromid eklenen jel oda ısısında donduktan sonra optimal rezolüsyon amacı ile ek olarak 4°C'de 20 dakika daha bekletildi. REA yöntemiyle kesilmiş PZT ürünleri, jel yükleme tamponu ile 1/6 oranında (4 µl jel yükleme tamponu + 20 µl PZT ürünü) karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez, jelle 1xTBE içinde 1 saat süreyle 100 volt uygulanarak gerçekleştirildi. Bantlar, ultraviyole transilüminatörde 280-340 nm dalga boyunda incelendi.

5.2.3. Artus HBV RG PCR kiti ile HBV DNA viral yük miktarının belirlenmesi

5.2.3.1. Serum örneklerinden HBV-DNA elde edilmesi

HBV-DNA eldesinde “PureArt™ DNA Mini Kit” kullanıldı. Yöntemde kısaca, hedef nükleik asid eldesi için, serum, proteinaz K içeren tampon ile inkübe edildi. Kolon santrifüjleme yöntemi kullanılarak, nükleik asit, silika membran yüzeye bağlandı. Yıkama basamaklarından sonra, nükleik asit, su içerisinde toplandı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda işlem aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

Tek bir serum örneği için;

20 µl Proteinaz K, 200 µl serum örneği ve 5 µl internal kontrol steril 1.5 ml'lik reaksiyon tüpüne konuldu. Üzerine 200 µl Buffer AL eklenen karışım 15 saniye vortekslendi.

Karışım 10 dakika 56 °C'de inkübe edildi.

Üzerine 200 µl etanol eklenerek karışım 15 saniye vortekslendi.

Örneğin tümü kolona aktarıldı ve 1 dakika 8000 x g'de santrifüj edildi.

Altındaki koleksiyon tüpü atıldı, kolon üzerine 500 µl Buffer AW1 eklendi ve 1 dakika 8000 x g'de santrifüj edildi.

Altındaki koleksiyon tüpü atıldı, kolon üzerine 500 µl Buffer AW2 eklendi ve 3 dakika 14000 x g'de santrifüj edildi.

Altındaki koleksiyon tüpü atıldı, kolon üzerine 50 µl Buffer AE eklendi ve 1 dakika 8000 x g'de santrifüj edildi.

Elde edilen 50 µl nükleik asit alikotlanarak kullanımına kadar -20°C'de saklandı.

5.2.3.2. HBV DNA'nın Real Art HBV RG PCR kiti kullanılarak kantitasyonu

1- PZT karışımı, toplam hacim 50 µl olacak şekilde hazırlandı. Tek bir örnek için karışımın içeriği:

HBV RG Master Miks	30 µl
DNA	20 µl

2- Isı döngü programı

PZT tüpleri Rotor-Gene (Corbett Research, Avustralya) gerçek zamanlı PZT cihazına yerleştirilerek aşağıdaki program uygulandı.

95 °C'de 10 dakika ön denatürasyon

95 °C'de 15 saniye }
55 °C'de 30 saniye } 45 döngü
72 °C'de 15 saniye }

Yöntemde, kit içinde bulunan negatif kontrol ve kantitasyon standartları kullanıldı (Tablo 7). Kalite kontrol örneklerine 20 µl internal kontrol eklendi ve vortekslendi. Daha sonra bu karışımdan alınan 20 µl, 30 µl mikse eklenerek test gerçekleştirildi.

Tablo 7: HBV RG PCR Kiti kantitasyon standartları.

Kantitasyon standardı no	HBV DNA içeriği (kopya/ml)
QS 1	17500
QS 2	175000
QS 3	1750000
QS 4	17500000
QS 5	175000000

HBV DNA viral yük miktarı "TaqMan" probu ile yapılan gerçek zamanlı ("Real-time") PZT yöntemi ile belirlendi. Yöntemde HBV DNA'nın belirlenmesi için FAM ile işaretli TaqMan probu (hidrolize edilen prob), internal kontrolün saptanması için ise JOE ile işaretlenmiş TaqMan probu kullanılmaktadır. Kantitasyon, üretici firmanın önerilerine uygun olarak kite ait beş adet standart yardımıyla çizilen eksternal kantitasyon eğrisi ile yapıldı (Tablo 7). Yöntemin kantitasyon aralığı, 1.75×10^3 kopya/ml ile 1.75×10^9 kopya/ml arasındadır. 1.75×10^3 kopya/ml'nin altındaki

örnekler için ise sonuç, kalitatif olarak değerlendirilmektedir. Testin duyarlılığı 200 kopya/ml'dir.

5.2.4. DNA Dizi Analizi

PZT için serum örneklerinden "High Pure Viral Nucleic Acid Kit" ile elde edilen DNA kullanıldı.

5.2.4.1. DNA dizi analizi dış PZT yönteminin basamakları:

1- Tek bir örnek için toplam hacim 50 l olacak şekilde aşağıdaki karışım hazırlandı.

10x Hot Start PCR Buffer	5,0 µl	
25mM MgCl ₂	6.0 µl	(3 mM/final)
10mM nükleotid karışımı	1,0 µl	(0.2 mM/final)
Ön Öncül P1s (10 pmol/µl)	2,0 µl	
Ters Öncül P2a (10 pmol/µl)	2,0 µl	
Hot Start Taq DNA Polimeraz (5U/µl)	0.3 µl	
H ₂ O	23,7 µl	
DNA	10,0 µl	
	<hr/>	
	50,0 µl	

2- Isı döngü programı

PZT tüpleri ısı döngü cihazına (Perkin Elmer 9600) yerleştirilerek aşağıdaki program kullanıldı.

95 °C'de	7 dakika	ön denatürasyon
94 °C'de	1 dakika	} 35 döngü
54 °C'de	1 dakika	
72 °C'de	2 dakika	
72 °C'de	10 dakika	son uzatma

Ürün agaroz jelde yürütüldü. 1010 bp uzunluğunda bant görülmesi durumunda dış PZT ürünü, saflaştırma kiti ile temizlenerek dizi analizi yapıldı.. Dış PZT ürününün saptanamaması durumunda iç PZT öncülleri kullanılarak “nested” PZT yapıldı.

5.2.4.2. DNA dizi analizi iç PZT yönteminin basamakları:

1- Tek bir örnek için toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıdaki karışım hazırlandı.

10x Hot Start PCR Buffer	5,0 µl	
25mM MgCl ₂	5.0 µl	(2.5 mM/final)
10mM nükleotid karışımı	1,0 µl	(0.2 mM/final)
Ön Öncül P3s (10 pmol/µl)	1,0 µl	
Ters Öncül P4a (10 pmol/µl)	1,0 µl	
Hot Start Taq DNA Polimeraz (5U/µl)	0,3 µl	
H ₂ O	34,7µl	
DNA dizi analizi 1.PZT ürünü	2,0 µl	
	<hr/>	
	50,0 µl	

2- Isı döngü programı

PZT tüpleri ısı döngü cihazına (Perkin Elmer 9600) yerleştirilerek aşağıdaki program kullanıldı.

95 °C'de	7 dakika	ön denatürasyon
94 °C'de	1 dakika	} 30 döngü
56 °C'de	1 dakika	
72 °C'de	2 dakika	
72 °C'de	10 dakika	son uzatma

Ürün agaroz jelde yürütüldü. 807 bp uzunluğunda bant görülmesi halinde PZT ürünü, saflaştırma kiti ile temizlenerek dizi analizi yapıldı.

5.2.4.3. PZT ürünlerinin saflaştırılması

DNA dizi analizi PZT ile elde edilen ürünler “EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit” ile saflaştırıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda işlem aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

PZT ürünü 1.5 ml’lik ependorf tüpe aktarılıp, üzerine 3 katı hacimde bağlanma tamponu eklendi.

Karışımın tümü kolona aktarıldı ve oda ısısında 2 dakika inkübe edilerek 5000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.

Tüp içinde süzülen karışım atılarak, kolona 500 µl yıkama tamponu eklendi ve 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj edildi.

Yukarıda belirtilen yıkama basamağı bir kez daha tekrarlandı.

Kolonda kalan yıkama tamponunu uzaklaştırmak için 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj edildi.

Kolon steril 1.5 ml’lik ependorf tüpe aktarılıp, üzerine 50 µl elüsyon tamponu eklendi. Oda ısısında 2 dakika inkübe edildikten sonra 10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.

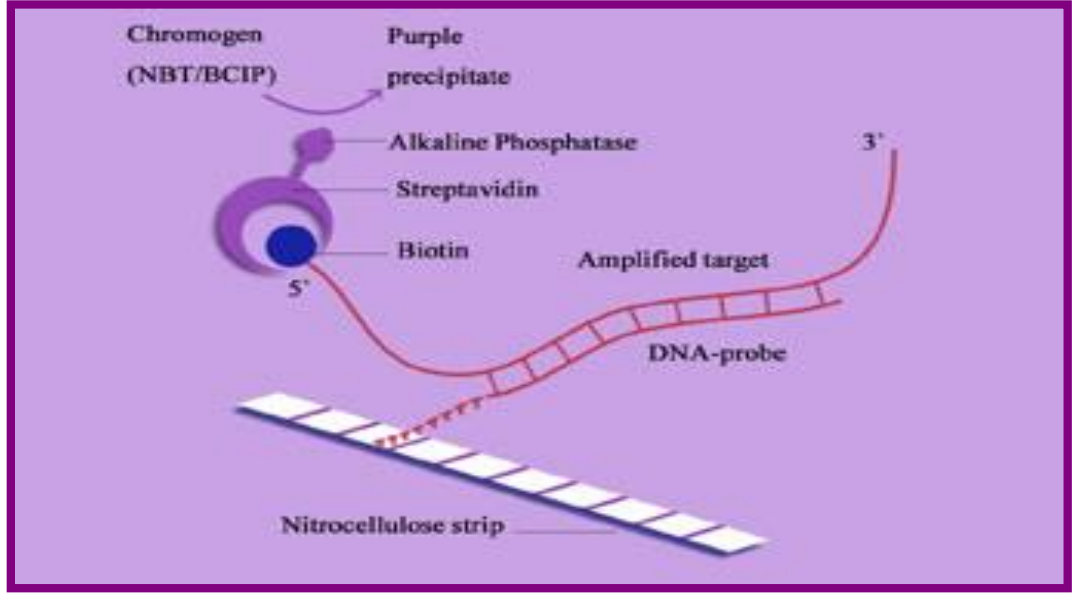
Elde edilen 50 µl saflaştırılmış DNA alikotlanarak kullanımına kadar -20°C’de saklandı.

PZT ile elde edilen ve saflaştırılan 1010 bp veya 807 bp uzunluğundaki HBV-DNA pol gen bölgesi ürünü, MacroGen Inc. (Seul, Güney Kore) DNA dizileme merkezine gönderildi. Dizi analizi, PZT primerleri ile “Big Dye Terminator 3730 xl DNA Analyzer” cihazında çift yönlü olarak yaptırıldı.

5.2.5. Strip hibridizasyon (LiPA)

Bu amaçla kullanılan INNO-LIPA HBV DR v1.0 (Innogenetics, Belçika) kiti, ters hibridizasyon temeline dayanmaktadır. Biotin ile işaretlenen ampikon, nitroselüloz membran esaslı şeritler üzerinde bulunan problemler ile hibridize edilir.

Streptavidin ile işaretli alkalen fosfatase eklenerek biotin ile işaretli komplekse bağlanması sağlanır. Kromojen substrat eklenerek inkübasyona geçilir. Oluşan mor-kahverengi bantlar değerlendirilir.



Şekil 5: INNO-LiPA testinin çalışma prensibinin şekilsel anlatımı. (96)

LiPA yönteminde, serum örneklerinden “High Pure Viral Nucleic Acid Kit” ile elde edilen HBV-DNA'nın pol geni B ve C domeynlerini kapsayan bölgesi biotinli kit öncülleri kullanılarak PZT ile çoğaltıldı. Hibridizasyon bu ampikon kullanılarak gerçekleştirildi.

5.2.5.1. LiPA dış PZT yönteminin basamakları:

1- Üretici firmanın önerileri doğrultusunda, tek bir örnek için toplam hacim 50 l olacak şekilde aşağıdaki karışım hazırlandı.

10X Hot Start PCR Buffer	5,0 µl
Nükleotid karışımı (25mM)	0,4 µl
Biotinli kit öncül karışımı (dış öncüller)	2,0 µl
Hot Start Taq DNA polymerase(5U/µl)	0,2 µl
H ₂ O	32,4 µl
DNA	10,0 µl
	<hr/>
	50.0 µl

2- Isı döngü programı

PZT tüpleri ısı döngü cihazına (Perkin Elmer GenAmp, 9600) yerleştirilerek aşağıdaki program uygulandı.

95 °C'de	7 dakika	
94 °C'de	30 saniye	} 40 döngü
45 °C'de	30 saniye	
72 °C'de	30 saniye	
72 °C'de	10 dakika	

Amplikon agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi. 409 bp'lik ürün 'LiPA' yönteminde kullanıldı. Ürünün saptanamaması durumunda kitin iç öncülleri kullanılarak "nested" PZT yapıldı.

5.2.5.2. LiPA iç PZT yönteminin basamakları:

1- Üretici firmanın önerileri doğrultusunda; tek bir örnek için toplam hacim 50 l olacak şekilde aşağıdaki karışım hazırlandı.

10x Taq Amplification Buffer	5,0 µl
Nükleotid karışımı (25mM)	0,4 µl
Biotinli kit öncül karışımı (iç öncüller)	2,0 µl
Hot Start Taq DNA polymerase (5U/µl)	0,2 µl
H ₂ O	40,4 µl
LiPA 1.PZT ürünü	2,0 µl
	<hr/>
	50,0 µl

2- PZT tüpleri ısı döngü cihazına (Perkin Elmer GenAmp, 9600) yerleştirilerek aşağıdaki program uygulandı.

95 °C'de	7 dakika	
94 °C'de	30 saniye	} 35 döngü
45 °C'de	30 saniye	
72 °C'de	30 saniye	
72 °C'de	10 dakika	

Elde edilen ürün agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi. 342 bp'lik ürün LiPA yönteminde kullanıldı.

5.2.5.3. Strip Hibridizasyon (LiPA) yönteminin basamakları:

10 µl denatürasyon solüsyonu ve 10 µl PZT ürünü test küveti içine eklendi ve 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.

2 ml hibridizasyon solüsyonu eklendi ve yavaşça karıştırıldı.

Test küvetine bir adet LiPA şeriti yerleştirilerek, 50 °C'lik su banyosunda 60 dakika inkübe edildi.

Küvet içindeki sıvı aspire edildikten sonra 2 ml yıkama solüsyonu ile 10-20 saniye iki kez yıkama yapıldı.

2 ml yıkama solüsyonu küvete eklendi ve 50°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edildi.

2 ml durulama solüsyonu ile 1 dakika süreyle iki kez yıkama yapıldı.

2 ml konjugat solüsyonu küvete eklendi ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.

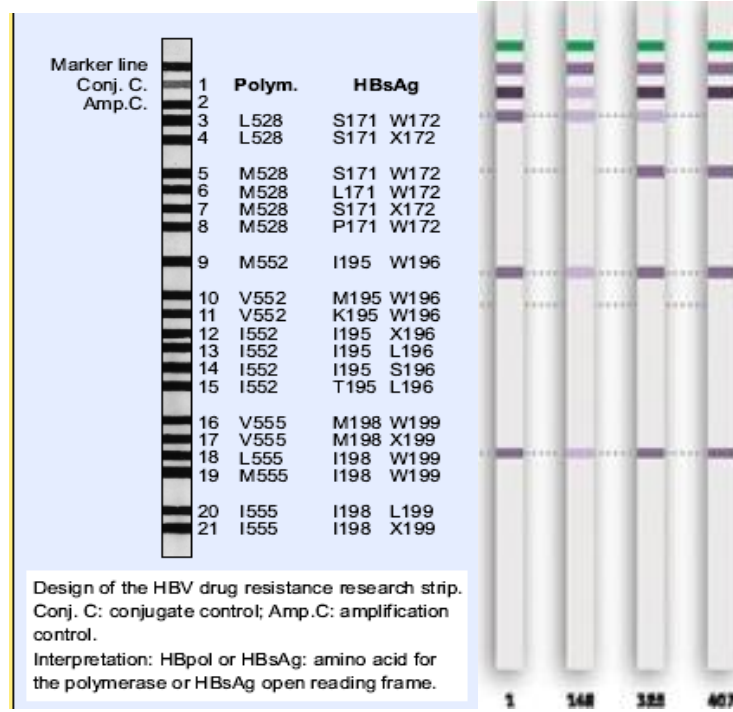
2 ml durulama solüsyonu ile 1 dakika süreyle iki kez yıkama yapıldı.

2 ml substrat tamponu ile 1 dakika yıkama yapıldı.

2 ml substrat solüsyonu eklenerek oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.

2 ml distile su ile iki kez 3 dakika durulama yapıldı ve şeritler incelendi.

Elde edilen şeritler, referans şerit ile karşılaştırılarak HBV DNA polimeraz gen bölgesinde ilaç direncine neden olan YMDD motif mutasyonu varlığı açısından değerlendirildi.



Şekil 6: INNO-LiPA testindeki problemlerin dizilimi ve strip örnekleri. Problemler, polimeraz ve S proteinleri üzerindeki bazı mutasyonları saptamada kullanılmaktadır. Değerlendirilen aminoasitler ve protein üzerindeki yerleşimleri şekilde gösterilmektedir (120)

5.2.6. Restriksiyon enzim analizi (REA)

Lamivudin direncine neden olan HBV DNA polimeraz geni 180 ve 204. kodonunda mutasyonların saptanması için REA yöntemi kullanıldı.

Serum örneklerinden "High Pure Viral Nucleic Acid Kit" ile HBV-DNA elde edildi. İki ayrı kodondaki mutasyon (180 ve 204) değerlendirileceği için, bir serum örneğine ait HBV-DNA, farklı öncül çiftlerinin kullanıldığı ardışık iki ayrı PZT ile çoğaltıldı.

5.2.6.1. REA dış.PZT yönteminin basamakları:

1- Tek bir örnek için toplam hacim 50 l olacak şekilde aşağıdaki karışım hazırlandı.

10x Hot Start PCR Buffer	5,0 µl	
25mM MgCl ₂	4.0 µl	(2.0 mM/final)
10mM nükleotid karışımı	1,0 µl	(0.2 mM/final)
Ön Öncül F3 (10 pmol/µl)	2,0 µl	
Ters Öncül B2 (10 pmol/µl)	2,0 µl	
Hot Start Taq DNA Polimeraz(5U/µl)	0,3 µl	
H ₂ O	25,7µl	
DNA	10,0 µl	
	<hr/>	
	50,0 µl	

2- PZT tüpleri ısı döngü cihazına (Perkin Elmer GenAmp, 9600) yerleştirilerek aşağıdaki program uygulandı.

95 °C'de	7dakika	
92 °C'de	30 saniye	} 40 döngü
50 °C'de	45 saniye	
72 °C'de	30 saniye	
72 °C'de	10 dakika	

F3-B2 öncül çifti ile amplifikasyon sonucu elde edilen ürün agaroz jelde yürütüldü. 192 bp uzunluğundaki REA dış PZT ürünü, HBV DNA polimeraz geni 180. kodonda gelişen mutasyonu saptayabilmek amacıyla REA-1 yöntemi ile çalışıldı.

5.2.6.2. REA iç PZT yönteminin basamakları:

1- Tek bir örnek için toplam hacim 50 l olacak şekilde aşağıdaki karışım hazırlandı.

10x Hot Start PCR Buffer	5,0 µl	
25mM MgCl ₂	4.0 µl	(2.0 mM/final)
10mM nükleotid karışımı	1,0 µl	(0.2 mM/final)
Ön Öncül F1 (10 pmol/µl)	2,0 µl	
Ters Öncül B2 (10 pmol/µl)	2,0 µl	
Hot Start Taq DNA Polimeraz(5U/µl)	0,3 µl	
H ₂ O	25,7µl	
DNA	10,0 µl	
	<hr/>	
	50,0 µl	

2- PZT tüpleri ısı döngü cihazına (Perkin Elmer GenAmp, 9600) yerleştirilerek aşağıdaki program uygulandı.

95 °C'de	7dakika	
92 °C'de	30 saniye	} 40 döngü
50 °C'de	45 saniye	
72 °C'de	30 saniye	
72 °C'de	10 dakika	

F1-B2 öncül çifti ile amplifikasyon sonucu elde edilen ürün agaroz jelde yürütüldü. 119 bp uzunluğundaki REA iç PZT ürünü, HBV DNA polimeraz geni 204. kodonda (YMDD motifindeki ikinci kodon) lamivudin direncine yol açan mutasyonlarını saptayabilmek amacıyla REA-2 yöntemi ile çalışıldı.

5.2.6.3. REA-1 yöntemi ile rt L180M mutasyonunu değerlendirme:

HBV DNA polimeraz geni 180. kodonda lösin (C/TTG) metionin (ATG) değişimi, Hsp92 II restriksiyon enzimi için kesim bölgesi (CATG) oluşturmaktadır

(Şekil 7). REA-1 yöntemi ile Hsp92 II enzimi kullanılarak 192 bp uzunluğundaki REA dış PZT ürününün bu enzim için kesim bölgesi içerip içermediği değerlendirildi. Reaksiyon şu şekilde gerçekleştirildi.

Hsp92 II Buffer (10x)	2,0 µl
Asetile BSA (10 µg/ µl)	0.2 µl
Hsp92 II (10u/ µl)	1,0 µl
H ₂ O	6,8 µl
REA 1.PZT ürünü	10,0 µl
	<hr/>
	20,0 µl

* Kesim için 37°C'de 1 gece bekletildi.

Pol aa173 –V G L S P F L L A L G I H L N – 236..
Pol nt 648 –GTGGGCCTCAGTCCGTTTCTC^T/_CTGGCT...CTTTGGGTATAACATTTGAAC – 839..

F3 öncül B2 öncül dizisinin komplementeri

L L¹⁸⁰ A
(Yabancıl tip) L¹⁸⁰: ...CTC^T/_CTGGCT...
Hsp92 II için kesim bölgesi yok

L M¹⁸⁰ A
(Mutant tip) M¹⁸⁰: ...CTCATGGCT...
↑
Hsp92 II için kesim bölgesi var

Şekil 7: REA-1 yöntemi ile rtL180M mutasyonunun belirlenmesi

192 bp uzunluğundaki PZT ürünü, Hsp92 II enzimi ile kesildiğinde % 4'lük yüksek rezolüsyonlu agaroz (MetaPhor Agarose) jel üzerinde 24 bp ve 168 bp'lik iki bant saptandığında, rt L180M mutasyonu için sonuç olumlu olarak değerlendirildi.

5.2.6.4. REA-2 yöntemi ile YMDD motif mutasyonlarını değerlendirme (rt M204V/I):

REA iç PZT ürünü eldesinde kullanılan F1 öncülü ile HBV polimeraz geni YMDD motifinin tirozin(Y) kodonunda TAT CAT değişimi olmaktadır. Bu değişim yabancı tip dizide (YMDD) Nde I restriksiyon enzimi için kesim bölgesi (CA TATG) oluşturmaktadır. Mutant dizilerde (YVDD veya YIDD) ise bu enzim için kesim bölgesi yoktur. Buna karşılık, 204. kodonda metionin(M) valin (V) aminoasit değişimi (YVDD), Hsp92 II enzimi için bir kesim bölgesi (CATG) oluşturmaktadır. 204. kodonda metionin(M) izolösin (I) aminoasit değişimi olan dizileri (YIDD) Hsp92 II kesememektedir. Bu enzimin kesip kesmemesine bağlı olarak mutant diziler birbirinden ayırdedilebilmiştir (Şekil 8).

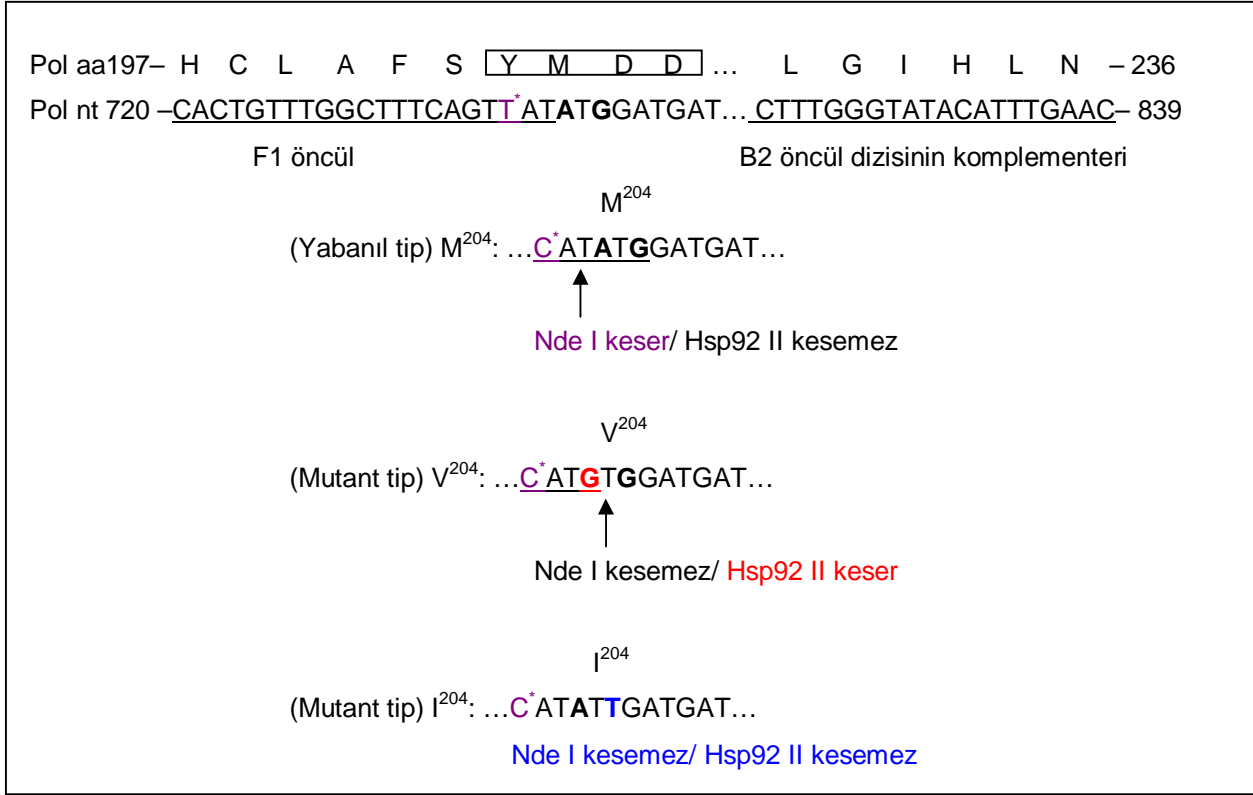
REA-2 yöntemi için REA dış PZT ürünü hem Nde I, hem de Hsp92 II enzimi ile muamele edildi. Reaksiyon şu şekilde gerçekleştirildi:

Hsp92 II için reaksiyon

Hsp92 II Buffer (10x)	2,0 µl
Asetile BSA (10 µg/ µl)	0.2 µl
Hsp92 II (10u/ µl)	1,0 µl
H ₂ O	6,8 µl
REA 2.PZT ürünü	10,0 µl
	<hr/>
	20,0 µl

Nde I için reaksiyon

Nde I Buffer (10x)	2,0 µl
Asetile BSA (10 µg/ µl)	0.2 µl
Nde I (10u/ µl)	1,0µl
H ₂ O	6,8 µl
REA 2.PZT ürünü	10,0 µl
	<hr/>
	20,0 µl



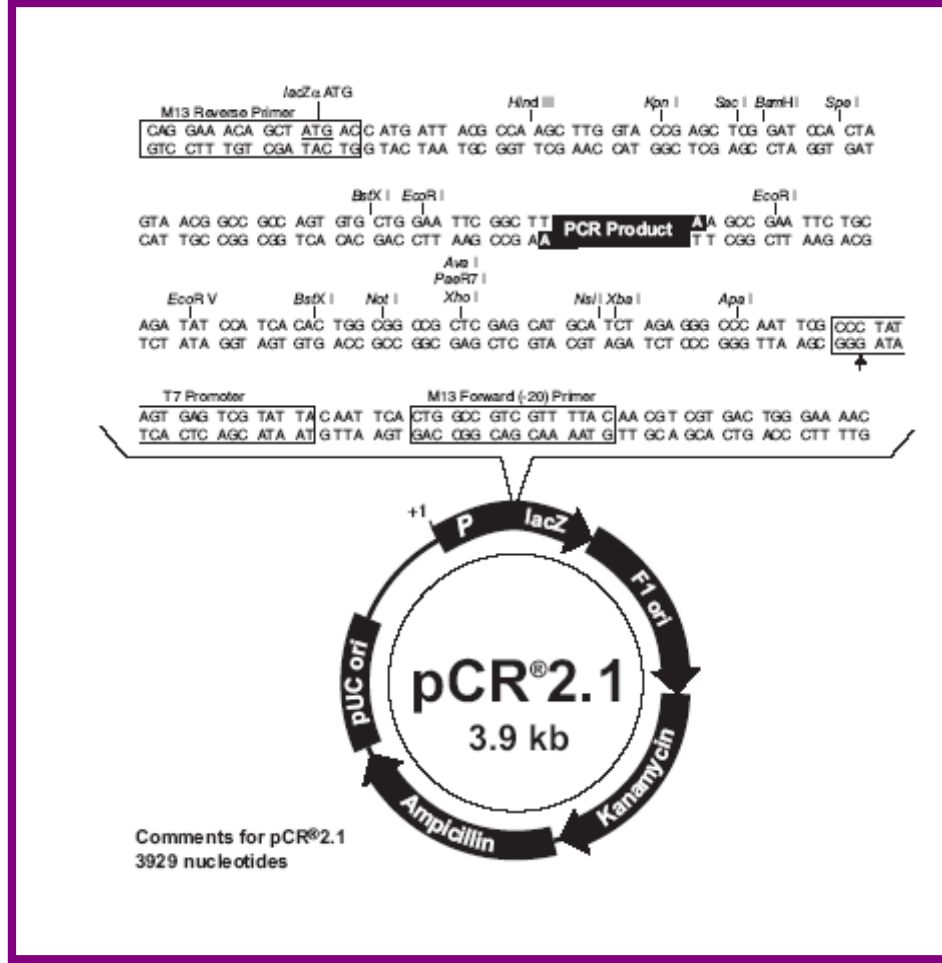
Şekil 8: REA-2 yöntemi ile YMDD motif mutasyonlarının belirlenmesi (rt M204V/I)

REA-2 yönteminde, 119 bp uzunluğundaki REA iç PZT ürünü Nde I enzimi ile kesildiğinde % 4'lük yüksek rezolüsyonlu agaroz (MetaPhor Agarose) jelde 24 bp ve 95 bp'lık iki bant saptanıyorsa yabanıl tip dizi için (YMDD) sonuç olumlu olarak değerlendirildi. Ürün Hsp92 II ile kesildiğinde 22 bp ve 97 bp'lık iki bant saptanıyorsa mutant dizi (YVDD) için sonuç olumlu kabul edildi. 119 bp uzunluğundaki REA iç PZT ürünü, her iki enzimle de kesilmemiş ise mutant dizi (YIDD) için sonuç olumlu olarak değerlendirildi.

5.2.7. PZT ürününün klonlanması

Klonlama için "TA Cloning Kit" kullanıldı. Bu kit ile "TA" klonlama yapılmaktadır. Taq DNA polimeraz enzimi kalıp zincirden bağımsız olarak terminal transferaz aktivitesi ile PZT ürünlerinin 3' ucuna tek bir adenin (A) bazı ekleme özelliğine sahiptir. Üretici firma tarafından plazmit vektörün *lac Z* geni kesilmiş ve 3' uçlarına tek bir timin (T) bazı eklenmiştir. Bu şekilde klonlanacak PZT ürünleri, 3' uçlarına timin (T) bazı eklenmiş lineer vektörlerin *lac Z* geninin arasına yerleşerek

gen inaktive edilmektedir. Vektör ayrıca ampisilin direnç geni taşımaktadır. Bu şekilde plazmit taşıyan bakterilerin besiyerinden seçimi sağlanmaktadır.



Şekil 9: TA klonlama metodu ve pCR 2.1 vektör (131)

5.2.7.1. Ligasyon:

T4 DNA ligaz enzimi kullanılır. Bu enzim diğer ligazlardan farklı olarak ATP kullanır ve az da olsa küt uçlu ürünleri de birbirine bağlama özelliğine sahiptir. Ligasyonda vektörün “T” bazı eklenmiş açık uçları ile PZT ürününün “A” bazı eklenmiş uçları karşılıklı gelerek yapışır. Uygun ortamın oluşturulması ve T4 DNA Ligaz’ın ATP kullanabilmesi amacıyla ortama ligazın tamponu eklenir. Ligaz enzimi ile vektör ve PZT ürününün 5’P ve 3’OH rezidüleri kovalent olarak bağlanır.

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda ligasyon aşağıdaki şekilde gerçekleşti.

Zamana bağılı olarak PZT ürünlerinin 3' uçlarındaki "A" bazları kopacağından, optimal ligasyon etkinliği için taze PZT ürünü kullanıldı.

Ligasyona girecek tahmini ürün miktarının hesaplanabilmesi için, taze PZT ürünündeki DNA miktarı spektrofotometrik ölçümle belirlendi. 260 nm dalga boyunda yapılan ölçümde ürünlerin 1 µl'sinde yaklaşık 5 ng DNA olduğu saptandı.

50 ng vektör (25ng/ µl) ile ligasyon reaksiyonuna girmesi gereken PZT ürün miktarını belirlemede aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{PZT ürünü (ng)} = \frac{(\text{PZT ürününün uzunluğu(bp)}) (\text{vektör(50ng)})}{\text{vektörün uzunluğu (3900bp)}}$$

$$10 \text{ ng ürün} = \frac{807 \text{ bpx } 50\text{ng}}{3900 \text{ bp}} \quad 2 \text{ µl ürün}$$

Ligasyonun en iyi etkinlikte olmasını sağlayan Vektör:Ürün oranı 1:1 önerildiğinden 2 µl ürün reaksiyona girdi.

10 µl ligasyon reaksiyonu aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Taze PZT ürünü	2 µl
10X Ligasyon bufferı	1 µl
Vektör (25 ng/ µl)	2 µl
H ₂ O	4 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
	<hr/>
	10 µl

Ligasyon tüpleri 14°C'de 1 gece inkübe edildi.

Transformasyon yapıncaya kadar ligasyon tüpleri -20°C'de saklandı.

5.2.7.2. Transformasyon:

Ön hazırlıklar:

Su banyosu ısısı 42°C'ye getirildi.

SOC besiyeri oda ısısına getirildi.

100 µg/ml ampisilin içeren LB agar plakları hazırlandı.

100 mg X-Gal üzerine 2,5 ml dimethylformamid eklenerek 40 mg/ml'lik X-Gal stok solüsyonu hazırlandı. Bu stoktan her bir LB agar plağı üzerine 40 µl yayıldı.15 dakika kuruması beklendi.

Transformasyon basamakları:

Ligasyon tüpleri kısa süreyle santrifüjlendi ve buz üzerine konuldu.

Her ligasyon için, kite ait 50 µl'lik bir tüp kompetan hücre (INV F' hücreleri) buz üzerinde erimeye bırakıldı.

Her ligasyon reaksiyonundan 2 µl, kompetan hücre tüpüne pipetleme yapıldı ve pipet ucu ile hafifçe karıştırıldı.

Tüpler 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi.

Çalkalama ve karıştırma olmadan 42°C su banyosunda 30 saniye süreyle ısı şoku uygulandı. Tüpler tekrar buz üzerine konuldu.

Her tüpe 250 µl SOC besiyeri eklendi.

37°C'de, 225 rpm'de tüpler 1 saat bekletildi.

Her ligasyon reaksiyonu için 2'şer 100 µg/ml ampisilin içeren LB agar plağı hazırlandı. Besiyerlerinin her birine yaklaşık 30 dakika önce, önceden hazırlanmış olan X-Gal stoğundan (40µl) eklenerek plak üzerine yayıldı. Besiyerlerine, transformasyon tüplerinden 50'şer ve 200'er µl ekim yapılarak yayıldı.

Plaklar 37°C'de 1 gece bekletildi.

Renk değişimi için plaklar 2-3 saat +4°C'de bekletildi.

Transforme olmuş bakterilerin seçimi:

Plazmitin *lac Z* geni içine hedef bölge yerleştirildiği için bu gen inaktive edilmişti. X-Gal (-galaktosidazın renksiz substratı) bulunan besiyerleri üzerinde üreyen hedef bölgeyi taşıyan koloniler şeffaf, içermeyenler ise mavi renkte görüldü. Ayrıca plazmit, ampisilin direnç geni taşıdığı için sadece plazmite sahip koloniler ampisilinli besiyeri üzerinde üreyebildi.

5.2.7.3. Plazmit DNA eldesi:

Transforme olmuş bakterilerin çoğaltılması amacıyla önce sıvı kültürleri yapıldı. Bunun için 100 µg/ml ampisilin içeren sıvı LB besiyeri hazırlandı.

Steril tüplere 5'şer ml aktarıldı.

İçlerine her bir plaktan 1 şeffaf koloni ekildi.

16 saat 37°C'de bekletildi.

Daha sonra bu sıvı kültürlerden plazmit DNA elde edildi. Bunun için "Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System" kiti kullanıldı. İşlem firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

E.coli kültürü (5ml) 5 dakika 10000xg'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Resüspansiyon solüsyonundan 400µl eklendi ve hücreler 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı.

250 µl lizis solüsyonundan eklendi ve tüp 4 kez alt-üst edilerek karıştırıldı. En fazla 5 dakika olacak şekilde bekletildi.

10 µl alkalın proteaz solüsyonu eklendi ve 4 kez alt-üst edilerek karıştırıldı. En fazla 5 dakika olacak şekilde oda ısısında bekletildi.

350 µl nötralizasyon solüsyonu eklendi ve tüp birkaç kez alt-üst edilerek karıştırıldı.

14.000xg'de 10 dakika santrifüj yapıldı.

Süpernatant dikkatlice toplandı ve toplama tüpüne yerleştirilmiş kolonlara aktarıldı.

Maximum hızda oda ısısında 1 dakika santrifüj yapıldı.

Toplama tüpündeki sıvı atıldı. Kolon yine toplama tüpüne yerleştirildi.

750 µl yıkama solüsyonu eklendi.

Maximum hızda oda ısısında 1 dakika santrifüj yapıldı.

Toplama tüpündeki sıvı atıldı. Kolon yine toplama tüpüne yerleştirildi.

250 µl yıkama solüsyonu eklendi.

Maximum hızda oda ısısında 2 dakika santrifüj yapıldı.

Toplama tüpündeki sıvı atıldı. Kolon steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirildi.

Maximum hızda oda ısısında 1 dakika santrifüj yapıldı.

Toplama tüpündeki sıvı atıldı. Kolon yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirildi.

100 µl elüsyon buffer eklendi. Maximum hızda oda ısısında 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolon atıldı.

Plazmit DNA'lar -20°C'de saklandı.

5.2.7.4. Plazmit DNA'dan PZT:

Plazmitlerde hedef bölge varlığının saptamak için, klonlamayı amaçladığımız PZT ürününü elde etmede daha önce kullandığımız öncüller ile bu kez plazmitten PZT yapıldı.

10x Hot Start PCR Buffer	5,0 µl	
25mM MgCl ₂	5.0 µl	(2.5 mM/final)
10mM nükleotid karışımı	1,0 µl	(0.2 mM/final)
Ön Öncül P3s (10 pmol/µl)	1,0 µl	
Ters Öncül P4a (10 pmol/µl)	1,0 µl	
Hot Start Taq DNA Polimeraz (5U/µl)	0,3 µl	
H ₂ O	26,7µl	
Plazmit DNA	10,0 µl	
	<hr/>	
	50,0 µl	

Isı döngü programı:

95 °C'de	7 dakika	ön denatürasyon
94 °C'de	1 dakika	} 30 döngü
56 °C'de	1 dakika	
72 °C'de	2 dakika	
72 °C'de	10 dakika	son uzatma

Ürünler %2'lik agaroz jelde görüntüledi. Hedef bölgeyi içeren plazmitlerde 807 bp'lik bant görülmesi beklendi.

5.2.7.5. DNA dizi analizi:

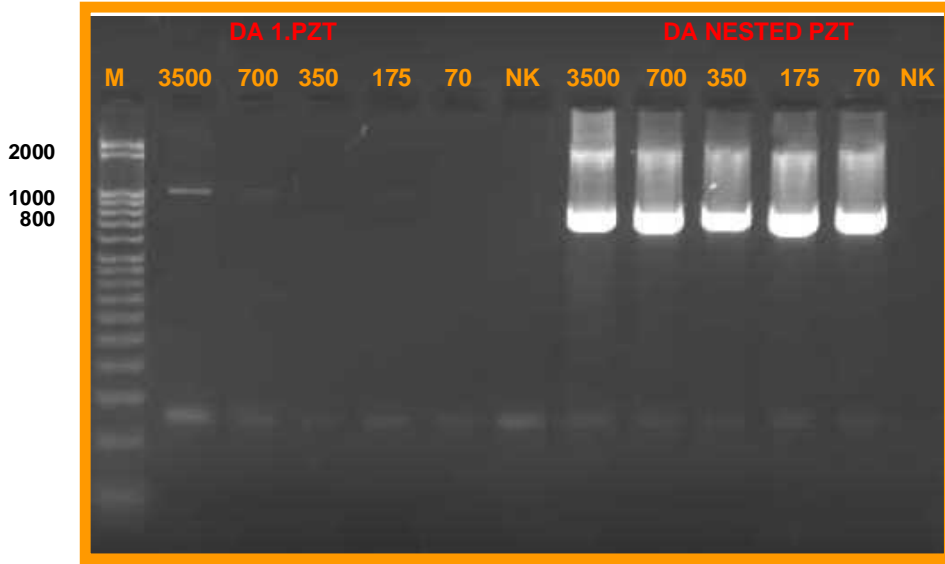
Klonlama sonrasında elde edilen plazmitler DNA dizi analizine alınmak üzere seçildi. Plazmit DNA'ya takılan hedefi dizilemek için plazmit üzerindeki uygun bölgelere özgül

pUC/M13 ön ve ters öncülleri kullanıldı. Dizi analizi Macrogen Inc.(Seul, Güney Kore) dizileme merkezinde ve çift yönlü olarak yaptırıldı.

6. BULGULAR

6.1. DNA dizi analizi, LiPA ve REA için yapılan PZT yöntemlerinin duyarlılığı

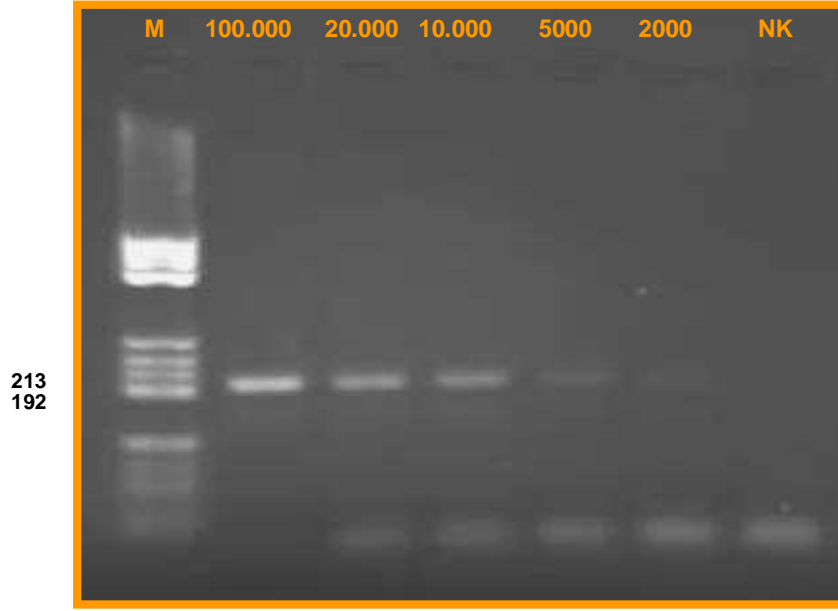
500 IU/ml (3500 kopya/ml) HBV-DNA içerdiği bilinen kalite kontrol serumunun (HBV DNA pozitif kontrol 98/780, NIBSC, İngiltere) 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 sulandırılmaları kullanılarak yapılan çalışmalarda, DNA dizi analizi “nested” PZT’nin 70 kopya/ml HBV DNA’yı saptadığı belirlendi (Şekil 10).



Şekil 10: DNA dizi analizi PZT yönteminde, HBV DNA pozitif kontrolün dilüsyonları ile yapılan çalışmadan elde edilen bant görünüşleri. Dilüsyonlardaki HBV DNA miktarı (kopya/ml) fotoğrafın üstünde belirtildi. Beklenen bant büyüklükleri dış primerlerin kullanımında 1010 bp, “nested” PZT kullanımında 807 bp’dir. (M: marker, NK: negatif kontrol)

LiPA için yapılan PZT’nin analitik duyarlılığı üretici firma tarafından 375 kopya/ml olarak bildirildi.

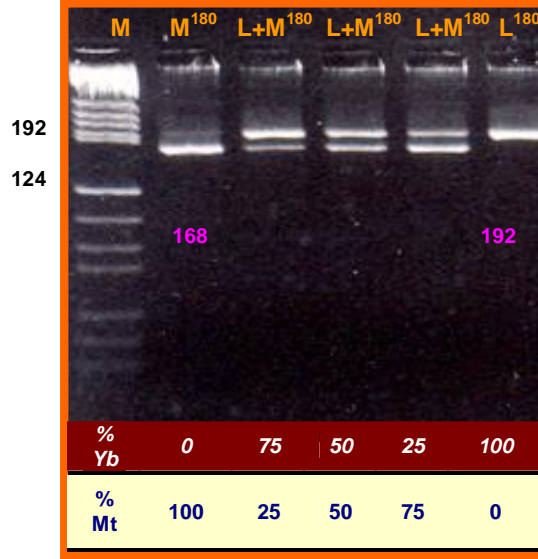
10^5 kopya/ml HBV-DNA içerdiği bilinen kalite kontrol serumunun 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 sulandırılmaları kullanılarak yapılan çalışmalarda REA PZT’nin, 2×10^3 kopya/ml saptadığı belirlendi (Şekil 11).



Şekil 11: REA PZT yönteminde, kontrol serumunun dilüsyonlarına ait bant görünüşleri. Dilüsyonlardaki HBV DNA miktarı (kopya/ml) fotoğrafın üstünde belirtildi. Beklenen bant büyüklüğü 192 bp'dir. (M: marker, NK: negatif kontrol)

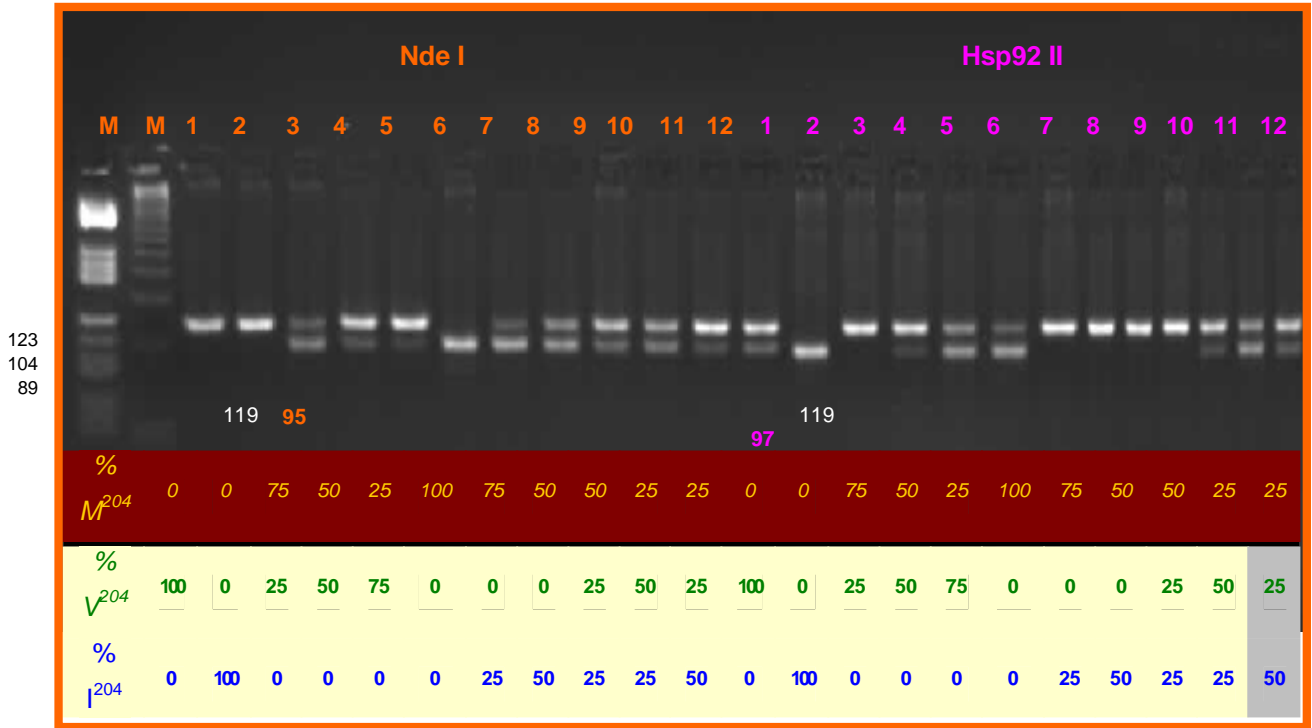
6.2. Klonlanmış HBV DNA polimeraz gen bölgesi fragmanları ile REA-1 ve REA-2 yöntemlerinin deneme sonuçları

REA-1 yöntemi ile rtL180M mutasyonunun saptanabilirliğini değerlendirmek amacıyla; rtL180M + rtM204V mutasyonlarını içeren klonun 100:0, 25:75, 50:50, 75:25, 0:100 oranlarında yabancı tip HBV DNA içeren klon ile karışımları hazırlandı. Bu örneklerden REA 1. PZT ile elde edilen 192 bp'lik ürünler Hsp92 II enzimi ile kesildi. Mutant varlığında gerçekleşen kesim sonucunda elde edilen 168 bp'lik ürün, agaroz jel elektroforezi ile görüntüledi. Yapılan incelemede mutantın %25 ve üstü olduğu dilüsyonda kesimin saptanabildiği belirlendi (Şekil 12).



Şekil 12: REA-1 yönteminde rtL180M mutasyonu içeren örneklerde Hsp92 II enzimi ile kesim sonrası elde edilen bant görüntüleri. Mutantın farklı dilüsyonlarını içeren örneklerde kesime bağlı olarak 168 bp'lik ürün saptandı (Yb:yabanıl, Mt: mutant).

REA-2 yöntemi ile YMDD motif mutasyonlarının (rtM204V/I) saptanabilirliğini değerlendirmek amacıyla, YMDD klonunun, belirli oranlarda YVDD ve YIDD motifini içeren klonlarla karışımları hazırlandı. Bu örneklerden REA 2.PZT ile elde edilen 119 bp'lik ürünler Nde I enzimi ile kesildi. Yabanıl tip (rtM204, YMDD) DNA varlığında gerçekleşen kesim sonrası elde edilen 95bp'lik ürün, agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. REA 2. PZT ürünleri, Hsp92 II enzimi ile de kesilerek mutant olan YVDD (rtM204V) ve YIDD (rtM204I) klonları birbirinden ayırt edildi. YVDD içeren ürünlerde kesim sonucu 97 bp'lik bant, YIDD içeren ürünlerde ise kesim olmadığı için 119 bp'lik bant saptandı (Şekil 13). Kesimlerin, enzime özgü hedefin %25'lik konsantrasyonlarını da saptayabildiği görüldü.



Şekil 13: REA-2 yönteminde Nde I ve Hsp92 II enzimi ile kesim sonrası elde edilen bant görüntüleri. Nde I enzimi ile kesim sonrası elde edilen 95 bp'lik bant ile yabancı YMDD (rtM204), Hsp92 II enzimi ile kesim sonrası elde edilen 97 bp'lik bant ile mutant YVDD (rtM204V) saptandı. Her iki enzim ile kesilmemiş klon ürünleri, YIDD (rtM204I) mutantının belirlenmesini sağladı. Elde edilen bantlar ve klonların karışım oranları şekilde görülmektedir.

6.3. Lamivudin direnç mutasyonlarının gelişme zamanı ve sıklığı

Grup A'da yer alan 30 olgudan 15'inde (%50) tedavinin herhangi bir döneminde dizi analizi yöntemiyle lamivudin direncinden sorumlu YMDD motif mutasyonları saptandı (Tablo 8).

Tablo 8: Grup A'ya ait 15 olguda dizi analizi yöntemiyle saptanan lamivudin direnç mutasyonları, bu mutasyonların lamivudin tedavisinin ilk olarak hangi ayında saptandıkları ve tedavi izlemi sırasında olguların alınmış son örneklerinde belirlenen mutasyonlar gösterilmektedir. Karışık popülasyona sahip olgularda, baskın (major) olan virus tipi kalın karakterle, ikinci olan ise altı çizili olarak verilmiştir. (--) : YMDD motifi, düşük viral yük nedeniyle belirlenemedi. TÖ: tedavi öncesi. *: Dizi analizi yöntemi ile sadece yabancı tip saptanmış, mutasyon saptanmamıştır; burada LiPA yöntemi ile saptanan mutasyon belirtilmiştir.

Grup A hasta no	Mutasyonun ilk saptandığı örnekteki sonuç	Zaman (Ay)	İzlemde alınan son örnekteki sonuç	Zaman (Ay)
1	YMDD+YIDD+YVDD	9	YIDD	15
2	YIDD	15	YIDD+YVDD+L180M+L80I	27
3	YMDD+YIDD	6	YMDD	12
4	YMDD+YIDD	38	YVDD+YIDD+L180M	42
5	YMDD+YIDD *	21	--	44
6	YIDD+ L80I	15	YIDD	32
7	YIDD+ L80I	18	YIDD+ L80I	21
8	YMDD+YIDD YMDD+YIDD	TÖ 30	YIDD+L80I	32
9	YMDD+<u>YIDD</u>+YVDD+L180M	3	YVDD+L180M+V173L	15
10	YIDD+L80V	15	YIDD+L80V	27
11	YIDD+L180M+L80V	34	YIDD+L180M+L80V	34
12	YIDD+YVDD+L180M	15	YVDD +YIDD+ L180M	24
13	YVDD+L180M	24	YVDD+L180M	27
14	YIDD	18	YIDD	18
15	YVDD+<u>YIDD</u>+YMDD+L180M+L80I	21	YVDD+<u>YIDD</u>+YMDD+L180M+L80I	21

A grubunda yer alan 30 izlem olgusunda yıllar içinde dizi analizi yöntemi ile YMDD mutanlığı gelişme oranları değerlendirildi. Olgulardan tümünün lamivudin tedavisinin 1. yılında örneği bulunurken, örneği olan olgu sayısı ikinci yılda 20'ye, üçüncü yılda ise 10'a düştü. YMDD mutanlığı saptanan olgu sayısı, tedavinin birinci yılında 6/30 (%20), ikinci yılında 8/20 (%40), üçüncü yılında 4/10 (%40) idi.

16 olgunun yer aldığı grup B'de 12. ay serum örneği olan 11 olgunun 1'inde (%9), 24. ay örneği bulunan 14 olgunun 5'inde (%35), 36. ay örneği bulunan 9 olgunun 3'ünde (%33) dizi analizi yöntemiyle lamivudin direnç mutasyonu saptanmıştır (Tablo 9).

Tablo 9: Grup B'de yer alan, lamivudin tedavisinin 12, 24 ve/veya 36. ay serum örneği bulunan 7 olgunun dizi analizi yöntemiyle saptanan direnç mutasyonları ve bu mutasyonların tedavinin hangi döneminde geliştikleri gösterilmiştir. Karışık popülasyona sahip olgularda, baskın (major) olan virus tipi kalın karakterle belirtilmiştir. *: Dizi analizi yöntemi ile yabancı tip saptanmış, mutasyon saptanmamıştır; burada LiPA yöntemi ile saptanan mutasyon gösterilmiştir.

Grup B - Hasta No	Mutasyon	Zaman (Ay)
38	YIDD+L80I+L180M	12
	YIDD+L80I+L180M	24
32	YMDD+YVDD*	24
41	YVDD	24
37	YVDD+L180M	24
40	YVDD+L180M	24
	YVDD+L180M	36
34	YIDD+L80V	36
42	YMDD+YIDD+L80V+L180M	36

Grup A ve Grup B olgularının tümü için lamivudin tedavisinin 1., 2. ve 3. yılında dizi analizi ve LiPA yöntemleri ile saptanmış olan direnç oranları tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10: Çalışma grubunun (Grup A ve B) tümünde, lamivudin tedavisinin 1. 2. ve 3. yılında örneği bulunan olgular arasında direnç oranları. Oranlar, olguların her yıla ait örnekleri olmadığı için kümülatif değil, kesitsel olarak belirlenmiştir.

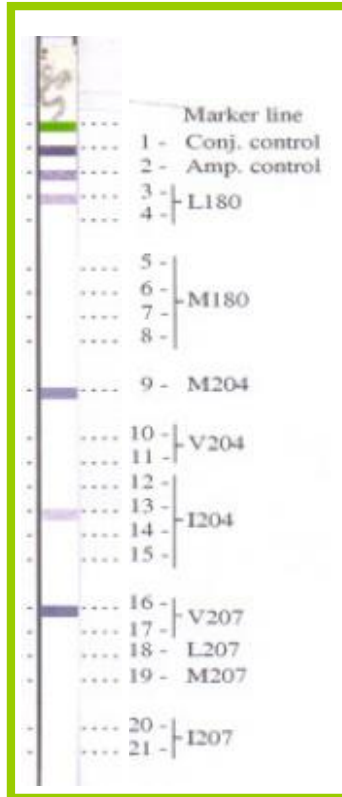
	1. YIL (12 ± 3. AY)	2.YIL (24 ± 3.AY)	3.YIL (36 ± 3. AY)
Dirençli olgular / Tüm olgular	9/39 (%23.1)	12/33 (%36.4)	7/20 (%35.0)

6.4. Lamivudin tedavisinden önce YMDD mutanlığı saptanan olgunun klonlama sonuçları

Lamivudin tedavisinden önce Grup A'ya ait 30 olgudan sadece 1'inde (%3.3; hasta no:8) dizi analizi (DA) ve LiPA yöntemleri ile yabancı tip ile birlikte YIDD mutanlığı saptandı (Şekil 14). Düşük viral yük nedeniyle bazı örneklerde REA yöntemi ile sonuç alınamadı. Olgu, 49 yaşında, kadın ve HBeAg(-) kronik hepatit B tablosuna sahipti. Olgunun izleminde YMDD mutanlığının seyri, viral yük ve ALT değerleri tablo 11'de gösterilmiştir.

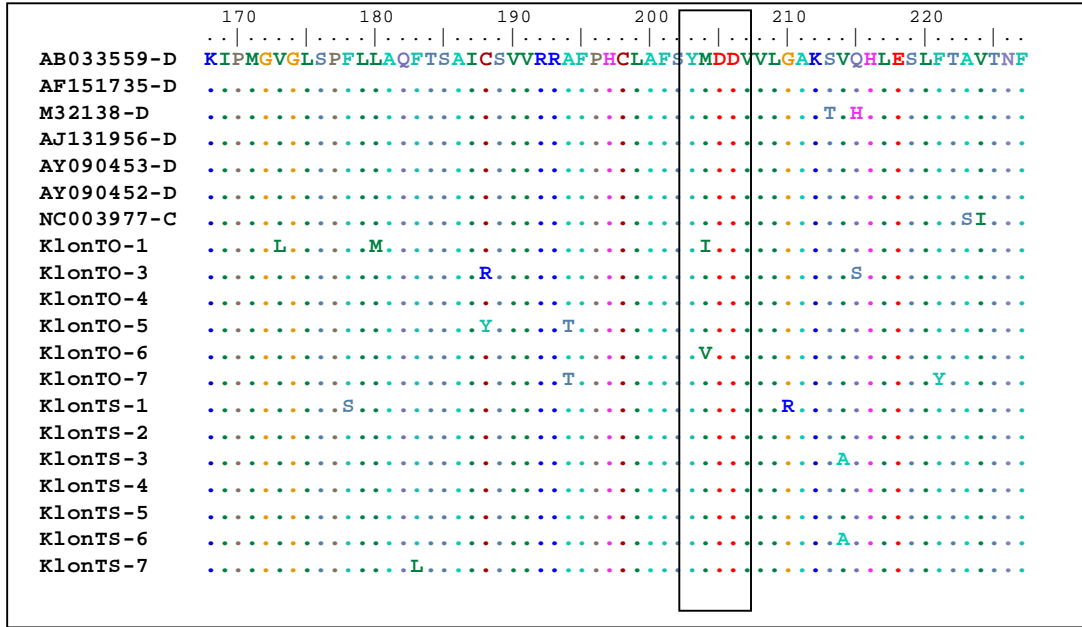
Tablo 11: Grup A, 8 no'lu olgu: Lamivudin tedavisinden önce YMDD mutanını saptanan olgunun izleminde DA, LiPA ve REA yöntemleri ile belirlenen YMDD mutantları, viral yük ve ALT değerleri. Karışık popülasyona sahip olgularda, baskın olan virus tipi kalın karakterle belirtildi. (-) : YMDD motifi, REA yöntemi ile belirlenemedi.

Grup A	LAM tedavi zamanı	TÖ			9.AY			18.AY			21.AY			30.AY			32.AY		
		Yöntem	DA	LiPA	REA	DA	LiPA	REA	DA	LiPA	REA	DA	LiPA	REA	DA	LiPA	REA	DA	LiPA
Hasta no:8	YMDD motifinde 2.aa	M+	M+	-	M	M	-	M	M	M	M	M	-	M+	M+	-	I	I	I
	Viral Yük (kopya/ml)	1216			<1.0x10 ² (96)			296 500			126			251			8424		
	ALT	45			34			61			31			19			77		



Şekil 14: Grup A, 8 no'lu hastanın lamivudin tedavisinden önceki serum örneğinde YMDD+YIDD saptandığını gösteren LiPA testine ait hibridizasyon şeridi.

Lamivudin başladıktan sonra HBV-DNA ve ALT düzeylerinde azalma gözlenirken, tedavinin 18. ayında HBV-DNA ve ALT düzeyleri hastanın ilacı düzensiz kullanmasına bağlı olarak yükseldi, 3 yöntem ile de direnç saptanmadı. Tedaviden önce saptanan YIDD mutantının, tedavinin başlamasıyla kaybolduğu, tedavinin 30. ayında DA ve LiPA yöntemleri ile tekrar saptandığı görüldü. Tedavinin 32. ayında ise üç yöntem ile yabancı tip dizinin kaybolduğu ve egemen olan virus popülasyonunun YIDD dizili YMDD mutanti olduğu saptandı. Bu mutantın ortaya çıkmasıyla HBV-DNA, ALT düzeylerinde yükselme gözlemlendi. Olgunun biri tedavi öncesi(TÖ) biri tedavi sonrası olmak üzere iki ayrı serum örneğinden HBV-DNA klonlama çalışması yapıldı. Lamivudin tedavisinden önceki serum örneğinden 6, lamivudin tedavisinden sonraki (9. ay) serum örneğinden 7 HBV-DNA klonu elde edildi ve klonların HBV-DNA polimeraz/ “revers transcriptase” YMDD motif bölgelerine ait aminoasit dizileri karşılaştırıldı. Tedavi öncesine ait 6 HBV-DNA klonundan biri YIDD, biri YVDD mutanti, diğerleri yabancı tip HBV-DNA taşımaktaydı. Tedavi sonrasına ait 7 klonun tümü yabancı tip HBV-DNA klonuydu (Şekil 15).



Şekil 15: Grup A, 8 no'lu hastanın tedavi öncesi (KlonTO1-6) ve tedavi sonrası (KlonTS1-7) serum örneklerinden elde edilen HBV-DNA klonlarının rt bölgesine ait aminoasit dizilerinin karşılaştırılması. YMDD motifi kutu ile gösterildi.

6.5. Serum HBV-DNA / ALT düzeyleri ile YMDD mutasyonları arasındaki ilişki

A grubunda YMDD mutasyonu gelişen 15 olguda, mutasyonların saptanma zamanı ile tedavi öncesi viral yük değerleri ve viral yük / ALT değerlerindeki artış zamanları arasındaki ilişki değerlendirildi (Tablo 12).

Tablo 12: Lamivudin tedavisi sırasında YMDD mutasyonu gelişen 15 olgunun (grup A) tedavi öncesi viral yükleri ve tedavi sırasında YMDD mutasyonunun, virolojik ve biyokimyasal tedavi başarısızlığının ortaya çıkış zamanlarına ilişkin özellikleri.

a: Olgunun tedavi düzensizliği bildirilmemesine rağmen 6. ay serum örneklerinde hem DA, hem LiPA yöntemleri ile YMDD + YIDD saptanmış olup, 12. ay serum örneğinde ise mutant saptanmadı. Viral yük ve ALT değerlerinde yükselme gözlenmedi.

b: Olgunun tedavi düzensizliği bildirilmemesine rağmen 21. ay serum örneğinde sadece LiPA yöntemi ile YMDD + YIDD saptanmış olup, 27, 38 ve 44.ay serum örneklerinin hiçbirinde mutant saptanmadı. Viral yük ve ALT değerlerinde yükselme gözlenmedi.

c: Tedavinin 15. ve son izlem örneği olan 24. ay serum örneğinde 3 yöntem ile YIDD+YVDD saptanmıştır. 24.ay serum örneğinde viral yükte artış olmuş ALT değerinde olmamıştır. Sonraki izlem örneği bulunmadığından ALT değerinde artış olup olmadığı bilinmemektedir.

d: Tedavinin 18. ayında hem DA, hem LiPA yöntemleri ile YIDD saptandı. Sonraki izlem örneği bulunmadığından viral yük ve ALT değerleri bilinmemektedir.

Grup A					
Hasta No	Tedavi öncesi Viral Yük (kopya/ml)	Mutantların saptanması		Tedavi başarısızlığı	
		Zaman (Ay)	rt204 kodon aa	Viral Yük (Ay)	ALT (Ay)
1	8.46x10 ⁶	9	M/I/V	12	15
2	7.36x10 ⁴	15	I/V	15	24
3	1.15x10 ⁴	6	M/I	^a -	-
4	5.26x10 ⁷	38	M/I	42	47
5	5.70x10 ⁶	21	M/I	^b -	-
6	3.50x10 ⁷	15	I	21	24
7	1.86x10 ⁶	18	I	18	21
8	2,25x10 ⁶	TÖ ve 30	M/I	32	32
9	1.77x10 ⁸	3	M/I/V	9	15
10	2.10x10 ⁶	15	I	21	24
11	4.76x10 ⁶	34	I	38	41
12	4.69x10 ⁵	15	I/V	^c 24	-
13	6.63x10 ⁵	24	V	24	24
14	1.02x10 ⁴	18	I	^d -	-
15	5.11x10 ⁸	21	V/I	21	21
ORT	5.33x10 ⁷	18.8		23.08	26
MIN	1.21x10 ³	3		9	15
MAX	5.11x10 ⁸	38		42	47

Viral tedavi başarısızlığı, tedavi ile elde edilen viral yükte 1 log₁₀ artış olarak tanımlandı. Tedavi başarısızlığı sonucu yeniden yükselen HBV-DNA düzeyleri, tedavi öncesine göre, logaritmik değer olarak, 15 olgunun 3'ünde (%20.0) aynı, 11'inde (%73.3) daha düşük, 1'inde (%6.66) daha yüksekti.

Olguların tedavi öncesi serum örneklerindeki HBV-DNA düzeyleri $2,25 \times 10^6$ ile 5.11×10^8 kopya/ml arasında değişmekteydi. Tedavi başladıktan sonra tüm olguların viral yüklerinde hızla düşüş gözlemlendi. İlk YMDD mutantının saptanma zamanı, tedavinin ortalama 18,8. ayında (3 - 38 ay arası) idi. Viral tedavi başarısızlığı, tedavinin başlangıcından ortalama 23,8 ay (9 - 42 ay arası) sonra gözlemlendi. Buna göre viral yükte artış, YMDD mutantının belirlenmesinden ortalama 5 ay sonra saptandı. Tedavi başarısızlığına bağlı olarak ALT değerlerinde yükselme (değerin, referans aralığın üstüne çıkması), tedavinin başlamasından sonra ortalama 26. ayda (15 – 47 ay arası) gözlemlendi. Onbir olguda ALT değerlerinin viral yük artışından sonra yükseldiği saptandı.

6.6.YMDD mutantlarının saptanmasında DA, LiPA ve REA yöntemlerinin sonuçlarının karşılaştırılması

Araştırmanın temel amaçlarından biri, YMDD mutasyonlarını saptamada DA, LiPA ve REA yöntemlerinin performansını karşılaştırmaktı. Bu amaçla, incelenen 42 olguya ait 123 örneğin üç farklı yöntemle elde edilen sonuçları tablo 13 'de gösterildi.

Tablo 13: YMDD mutasyonlarının değerlendirilmesinde DA, LiPA ve REA yöntemlerinin birbirleriyle karşılaştırılması. HS: LiPA'da 204. kodonda hibridizasyon saptanmadı. (-): Viral yükün düşük olması nedeniyle mutasyonlar değerlendirilemedi.

Hasta No	Serum No	YMDD MUTASYONLARI		
		Dizi analizi	LiPA	REA
1	3	M	M	M
	81	M+I+V	M+I+V	-
	82	I+V+180M	I+V+180M	-
	4	I	I	I
	5	I+M	I+M	I+M
	76	I+M	I+M	I+M
2	6	M	M	M
	7	I	I+M	-
	8	I+V+180M+80I	I+V+180M	I+180M
	85	I+V+180M	I+V+180M	I+180M
3	9	M	M	M
	86	M+I	M+I	-
	10	M	M	-
4	20	M	M	M
	90	M	M	M
	91	M	M	-
	22	M	M	-
	130	V+I+180M+80I	V+I+180M	V+I+180M
5	23	M	M	-
	24	M	M	-
	93	M	M+I	-
6	33	M	M	-
	34	I+80I	I	-
	35	I	I	-
	36	I	I	-
	37	I+M	I+M	-
7	38	M	M	-
	39	I+80I	HS	-
	40	I+80I	HS	-
8	55	M+I	M+I	-
	107	M	M	-

		56	M	M	M
		108	M	M	-
		197	M+I	M+I	-
		206	I+80V	I	I
9		60	M	M	M
		208	M+I+V+180M	M+I+V+180M	M+I
		111	M+I+V+180M	M+I+V+180M	M+V+I
		112	M	M	M
		61	V+180M+173L	V+180M	V+180M
		113	V+180M+173L	V+180M	V+180M
		62	V+M+180M	V+M	V+M+180M
10		66	M	M	M
		114	M	M	-
		140	I+80V	I	-
		198	I+80V	I	I
		209	I+80V	I	I
11		68	M	M	M
		119	M	M	M
		69	M	M	-
		70	M	M	M
		211	I+180M+80I	I+M+180M	I+M+180M
12		122	M	M	M
		212	I+V+180M	I+V+180M	-
		213	V+I+180M	V+180M	V+I+180M
13		73	M	M	M
		125	M	M	-
		74	V+180M	V+180M	V+180M
		75	V+180M	V+180M	V+180M
14		148	M	M	M
		216	I	I	-
15		218	M	M	M
		220	M	M	M
		221	V+I+M+180M+80I	V+I+M+180M	V+I+M+180M
16		1	M	M	M
		77	M	M	-
		78	M	M	-
17		11	M	M	M
		87	M	M	-

		12	M	M	-
		13	M	M	-
18		16	M	M	-
		18	M	M	-
		19	M	M	-
		17	M	M	-
19		26	M	M	-
		27	M	M	-
20		28	M	M	M
		94	M	M	-
		29	M	M	-
		95	M	M	M
		30	M	M	M
21		31	M	M	M
22		46	M	M	-
23		49	M	M	M
		50	M	M	-
		51	M	M	-
24		52	M	M	M
		105	M	M	-
		53	M	M	M
		54	M	M	M
		137	M	M	M
25		57	M	M	M
		58	M	M	M
26		63	M	M	M
		64	M	M	-
27		116	M	M	M
		117	M	M	-
		210	M	M	-
28		146	M	M	M
		215	M	M	-
29		222	M	M	M
30		150	M	M	M
		151	M	M	M
31		153	M	M	-
32		156	M	M+V	-
33		158	M	M	-
34		160	M	M	-
		162	I+80V	I	I

35		163	M	M	-
36		173	M	M	-
		195	I+180M+80V	I+180M	-
37		128	M	M	M
		176	V+180M	V+180M	-
38		177	I+180M+80I	I+180M	I+180M
		178	I+180M+80I	I+180M	I+180M
39		179	M	M	-
		180	M	M	-
40		185	V+180M	V+180M	V+180M
		186	V+180M	V+180M	V+180M
41		187	V	V	-
42		189	M	M	-
		190	M+I+180M+80V	M+I+180M	-

80. ve 173. kodundaki değişiklikler testlerin teknik özellikleri nedeniyle sadece DA ile saptanabilmekte idi. Bu nedenle testler arası uyum incelenirken bu iki pozisyon değerlendirmeye katılmadı. Üç yöntemin uyumlu sonuç verdiği örnek sayısı 54 (%44) idi. DA ve LiPA uyumlu bulunan örnek sayısı 115 (%93.5) idi. Bu örneklerin 57'sinde REA ile sonuç alınamadı. DA ve REA ile benzer sonuç alınan örnek sayısı 56 (%45.5); LiPA ile REA uyumlu örnek sayısı 55 (%45) idi.

6.7. Lamivudin ile seçilen HBV pol/rt geni mutasyonları ile HBV S geni mutasyonları arasındaki ilişki

Lamivudin tedavisine direnç geliştiren olgularımızın tümünde rtM204I, rt M204V, rt V173L polimeraz mutasyonlarının, S bölgesinde sırasıyla W196L/S, I195M, E164D mutasyonlarına yol açtığı gözlemlendi.

6.8. Lamivudine dirençle ilişkili mutasyon saptanan olgularda dizi analizi yöntemi ile HBV DNA pol/rt genindeki diğer değişikliklerin belirlenmesi

Dirençli olguların HBV DNA pol/rt geninde dizi analizi yöntemi ile N76D (3 olgu), R110G (2 olgu), L115Y, S117Y, N123D, G127R, T128N (2 olgu), T128I, N139K, L144C, L145M, T184I, V214E, S219A, F221Y, T225N L229W, L231V,

P237H, N238H, Y245H, K270R değişiklikleri gözlemlendi. Bu mutasyonların lamivudin direnci üzerine etkileri konusunda bilgiye ulaşılamadı.

6.9. Olguların viral genotiplerinin belirlenmesi

30 olgunun serum örneğinde, dizi analizi yöntemi kullanılarak HBV genotipleri değerlendirildi. Olgulara ait diziler ile farklı genotiplere ait Gen Bank dizileri Bioedit 7.0.0 programı kullanılarak hizalandı ve MEGA 4 yazılımı ile filogenetik ağaç oluşturuldu. Olguların aminoasit değişiklikleri, referans dizilerle karşılaştırılarak HBV genotip ve subtipleri belirlendi. Filogenetik analiz sonucu; tüm olgulara ait dizilerin, **Genotip D** dizileriyle birlikte kümelendiği görüldü. Subtip belirleme 122,127 ve 160. pozisyonlardaki aminoasit değişiklikleri incelenerek yapıldı. *ayw1-ayw2* subtiplerinin tanımlanması, 134,143,159,161,168. pozisyonlardaki aminoasit değişikliklerine bağlı olarak değerlendirildi. Olgulardan 7'sinin (%23,3) **ayw3**, 23'ünün (%76,7) **ayw2** subtipi ile infekte olduğu belirlendi.

7. TARTIŞMA

Lamivudin tedavisi alan hastalarda, viral polimeraz geninde mutasyonlar bulunan HBV varyantları saptanmaktadır. Bu varyantların, lamivudine karşı duyarlılıklarında in vitro azalma olmaktadır. En yaygın varyasyonlar, HBV polimerazın YMDD motifinde (rt M204V/I) ve/veya yakınında (rt L180M) bulunmaktadır. Varyantlar, genellikle en erken tedavinin 6 - 8. aylarından itibaren görülmekte, prevalansları tedavi süresi uzadıkça artmaktadır. Varyantlar, yabancıl tip virusla bir arada bulunabildiği gibi, virus popülasyonu içinde baskın olarak da saptanabilmektedir. Söz konusu varyantların saptanabilmesi ve ortaya çıkışlarına ilişkin daha fazla bilgi edinilebilmesi için, serum örneğindeki HBV popülasyonu içinde bulunan düşük miktarlardaki varyant HBV'leri saptayabilen, duyarlı, kantitatif testlere gereksinim duyulmaktadır (98).

Çalışmamızda, lamivudin tedavisi alan olguların izlemi ile elde edilen ve tedavinin farklı basamaklarına ait (tedavi öncesinde, sırasında ve sonrasında) toplam 123 serum örneği değerlendirilmiştir. Örneklerin dizi analizi sonuçları, LiPA ve REA yöntemlerinin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Varyantları saptamada LiPA testi, DA ve REA'dan daha başarılı olmuştur. LiPA testinin kodon 204 için minör viral popülasyonları saptamada, DA'ne göre 4/123 örnekte (%3,25) daha duyarlı olduğu görülmüştür. LiPA testi, REA'ya göre, kodon 180 için 64/123 örnekte (%52), kodon 204 için 63/123 örnekte (%51,2) daha duyarlı bulunmuştur. Lamivudin direnç mutantlarını saptamada LiPA ile DA yöntemlerini karşılaştıran Pas ve arkadaşları da çalışmalarında, LiPA'nın, virus popülasyonunun %10'unu oluşturan varyantları bile saptayabildiğini, DA yönteminin ise, ortamda %50'den fazla bulunan viral popülasyonlara ait dizileri saptayabildiğini göstermişlerdir (118). LiPA ile DA karşılaştırılması yapılan bir diğer çalışmada da 56 örneğin 8'inde minör viral popülasyon, LiPA ile saptanabilmiştir (100). Minör viral türlerin saptanmasında LiPA testinde kullanılan problemlerin spesifik olduğu bildirilmiştir (99).

Çalışmamızda DA ve LiPA sonuçları, kodon 180 için %99,9 (122/123 örnek), kodon 204 için %94,3 (116/123 örnek) oranında birbiriyle uyumlu saptanmıştır. Lok ve arkadaşları, iki test arasındaki uyumu kodon 180 için %97,5; kodon 204 için %95 olarak bildirmişlerdir (132). LiPA testi, genellikle minor popülasyonları yakalamada daha başarılı olmakla birlikte, kodon 180 için bir (9 no'lu olgunun 62 no'lu örneği), kodon 204 için bir (12 no'lu olgunun 213 no'lu örneği) olmak üzere toplam iki

örnekte, karışık viral populasyonlardan birini saptayamamıştır. Bu başarısızlık, LiPA'nın PZT aşamasında mevcut virus populasyonlarının aynı verimlilikle amplifiye olmamasından veya prob hibridizasyonu aşamasında yaşanan bir sorundan kaynaklanabilir. LiPA'da yaşanabilecek hibridizasyon sorunu, 7 no'lu hastanın iki örneğinde saptanmıştır. Bu örneklerde DA ile rtM204I mutasyonu belirlenirken, LiPA ile 204. kodona ait yabancı ve mutant diziyeye özgü problemlerden hiçbirinde hibridizasyon bandı oluşmamıştır. Bu iki örneğin DA sonucu incelendiğinde, 204. kodona ait LiPA problemlerinin hibridizasyonunu önleyebilecek, kodon 201'in son nükleotidinde C T değişikliği saptanmıştır. Üretici firma ile yapılan görüşmede, bu mutasyonun prob hibridizasyonunu önlediği doğrulanmış ve kitin ikinci versiyonunda buna ilişkin yeni problemlerin eklendiği öğrenilmiştir. LiPA ile belirlenemeyen sonuçların prob bağlanma bölgelerindeki varyasyonlardan kaynaklanabildiği klonal analiz çalışmaları ile de gösterilmiştir (133,132).

Çalışmamızda lamivudin direncinden sorumlu viral varyantların (rt M204I/V ve rt L180M) taranmasında, Allen ve arkadaşları tarafından tasarlanan REA yöntemi kullanılmıştır. Referans olarak alınan yayında, REA yönteminin, DA ile karşılaştırıldığında, karışık viral populasyonları saptamada, kodon 180 için %14 (7/50 örnek), kodon 204 için %20 (10/50 örnek) oranında, daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (98). Çalışmamızda ise, REA yönteminin 10^3 kopya/ml'nin altındaki HBV DNA düzeylerinde sonuç veremediği saptanmış ve 62 örneğin (%50.4) sonucu elde edilememiştir. Referans yayında bildirilenden farklı olarak, çalışmamızda, DA yönteminin karışık viral populasyona sahip örnekleri saptamada, REA ile karşılaştırıldığında, kodon 180 için %52.0 (64/123 örnek), kodon 204 için %52.8 (65/123 örnek) oranında daha duyarlı olduğunu gördük. Bu örneklerde REA yöntemi ile ya viral yüke bağlı olarak hiç sonuç alınamamış veya karışık viral populasyonlu örneklerdeki minör tipler saptanamamıştır. REA referans yayını ile farklı sonuç elde etmemizin nedenlerinden biri, kullandığımız DA yönteminde "nested" PZT kullanılması ve bunun da 70 kopya/ml viral yüke kadar sonuç vermesidir. Çalışmamızda REA yönteminin, DA'ne göre kodon 204 için sadece bir örnekte, LiPA'ya göre kodon 180 için 1, kodon 204 için 1 örnekte karışık viral populasyonları tanımlamada daha başarılı olduğu saptanmıştır.

LiPA, minör varyantların saptanmasında DA'ya göre daha duyarlı ve örneklerin hızlı ve rutin taranmalarında kolay uygulanabilir olması nedeniyle antiviral tedavi alan

KHB hastalarının klinik takipleri için uygun olmasına rağmen, DA, yeni varyantların saptanmasında hala altın standart olmaya devam etmektedir.

Lamivudin kullanımına bağlı YMDD motif mutasyonları ve direnç görülme oranları, farklı çalışmalarda farklı düzeylerde bildirilmiştir. Honkoop ve arkadaşları, 52 haftalık lamivudin tedavisi sonunda YMDD mutasyonlarının kümülatif insidansını %39 olarak bildirmiştir (134). Lau ve arkadaşlarının çalışmasında, mutasyon ve direnç oranı birinci yıl sonunda %47' dir (135). Genel olarak bir yıllık lamivudin tedavisinin sonunda mutasyon oranı %14 - 47 arasında bildirilmiştir (136). Direnç oranları, tedavi süresinin uzaması ile artmaktadır. Lai ve arkadaşları, lamivudin tedavisinin birinci yılının sonunda YMDD varyantlarının insidansını %24 olarak saptarken, 2., 3. ve 4.yıl sonunda insidansın %42, %53 ve %70 olduğunu bildirmişlerdir (137). Diğer bir çalışmada, YMDD motif mutasyonları oranı, 1. yıl sonunda %17, 2. yıl sonunda %39, 3. yıl sonunda ise %57 olarak bildirilmiştir (2). Çalışmamızda, YMDD mutantlı olguların oranı birinci yıl sonunda %23.1 (9/39 olgu), 2. yıl sonunda %36.4 (12/33 olgu), 3. yıl sonunda %35.0 (7/20 olgu) idi. Çalışmamızda, tüm olguların izleminin 3. yıla kadar yapılamamış olması nedeniyle, direnç oranlarında tedavi süresi ile paralel bir artış saptanamamıştır.

30 KHB olgusunu içeren çalışma grubumuzda, sadece bir olguda (%3.3) tedavi öncesi serum örneğinde dizi analizi ve LiPA yöntemleri ile YMDD mutanti saptandı. Tedavi öncesi alınan bu örnekte, REA yönteminin sonucu, düşük viral yük nedeniyle değerlendirilemedi. Örnekte, rtM204I mutasyonu, minör popülasyonu oluşturmaktaydı ve baskın yabanıl tip ile birlikteydi. LAM ile tedavi sırasında saptanması beklenen YMDD varyantlarının, LAM tedavisi almamış, asemptomatik veya kronik HBV hastalarında saptanabildiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda YMDD varyantları için bildirilen oranlar değişiklik göstermektedir (Tablo 14).

Tablo 14: Lamivudin tedavisi almamış HBV ile infekte populasyonlarda YMDD varyantlarının saptanmasına ilişkin çalışmaların özeti
(ASC: Asempomatik HBV taşıyıcısı, KHB: Kronik HBV enfeksiyonu)

YAZAR	ÇALIŞMA GRUBU (n)	SAPTAMA YÖNTEMİ	VARYANT ORANI	VARYANTLAR (n)	KAYNAK
Eren F	ASC (25) KHB (17)	LiPA	7/25 (%28) 0/17 (%0)	YMDD+YVDD(6) YMDD+YVDD+YIDD(1) -	(109)
Kobayashi S ve ark.	KHB (46)	mini-dizi analizi	0/46 (%0)	-	(138)
Kirishima T ve ark.	KHB (36)	PZR-PNA, REA	4/36 (%11.1)	YMDD + YIDD (2) YMDD + YVDD (2)	(139)
Heo J ve ark.	KHB (40)	Oligonükleotid çip testi, REA, dizi analizi	3/40 (%7.5)	YMDD + YIDD (3)	(140)
Huang ZM ve ark.	KHB (104)	Mikrokozmetik nükleik asit ve cross-nükleik asit kantitatif saptama	28/104(%26.9)	Yayında belirtilmemiş	(110)
Matsuda M ve ark.	ASC (20) KHB (20)	PZR-ELMA, PZR-REA	0/20 (%0) 0/20 (%0)	- -	(141)
Yan MH ve ark.	KHB (110)	?	19/110(%17.2)	?	(110)
Zhang XH ve ark.	KHB (122)	Genetik çip tekniği, dizi analizi	32/122(%26,2)	YMDD+YVDD(28) YMDD+YIDD(2) YMDD+YVDD+YIDD(2)	(143)
Matsuda M ve ark.	KHB (20) KHB (51)	PZR-ELMA, PZR-REA, PZR-PNA+REA	1/20 (%5.0) 1/51 (%2.0)	YMDD + YIDD (1) YIDD (1)	(142)
Zhang X ve ark.	KHB (5)	Gerçek zamanlı fluorometri PZR, dizi analizi	3/5 (% 60)	YMDD+YIDD (2) YMDD+YVDD(1)	(111)
Akarsu M ve ark.	ASC (71)	LiPA	13/71(%18.3)	YMDD+YVDD+YIDD(6) YMDD+YVDD(2) YVDD(1) YVDD+YIDD(1) YMDD+YIDD(3)	(108)
Kobayashi S ve ark.	ASC (18)	PZR-ELMA, dizi analizi	5/18 (%27.7)	YMDD + YIDD (3) YMDD+YIDD+YVDD(2)	(144)
Leon P ve ark.	ASC (79)	LiPA	3/79 (%3.8)	YMDD+YIDD (1) YMDD+V207I (1) V207I (1)	(145)

Bildirilen oranlar kronik HBV hastalarında %0 – 26,9, asemptomatik HBV taşıyıcılarında %0 – 28 değerleri arasında bulunmaktadır. Çalışmaların sonuçları arasındaki farklılıklar, olgu sayılarına, saptama yöntemlerine, çalışma gruplarının bilinmeyen özelliklerine (ör: infeksiyon süresi, viral yük, genotip ve viral genomdaki diğer aa değişiklikleri vb.) bağlı olarak gözleniyor olabilir. Lamivudin tedavisi sırasında ortaya çıkan mutant virüslerin, viral popülasyonda ilaç kullanılmadan önce de yabancı tip virüslerle birlikte az miktarda bulunan ve ilacın etkisiyle seçilerek artan gruplar olduğuna ilişkin hipotez giderek ağırlık kazanmaktadır. Henüz antiviral tedavi almamış olgulardaki mutant virüslerin varlığı için olasılıklardan biri, viral polimerazın, farklı mutasyonların doğal gelişimine neden olan replikasyon sırasında yapmış olduğu yüksek hata oranıdır. Mutant tip virüsler, yabancı tip virüs gibi geçiş gösterebilirler. Bu nedenle virusun, ilaca dirençli bir kaynaktan kazanılmış olması da mümkündür. Zhang ve arkadaşları, kronik HBV infeksiyonu bulunan 5 olgunun 10 serum örneğini (tedavi öncesine ait 5 örnek, 48 haftalık tedavinin sonrasına ait 5 örnek) klonal analiz ile YMDD mutantlarının varlığı yönünden incelemişler, 2 hastanın tedavi öncesi serumlarında minör türler olarak bulunan YMDD mutantlarının, lamivudin tedavisi sonrasında baskın duruma geçtiklerini ve bunu HBV-DNA / ALT düzeylerindeki artışın takip ettiğini bildirmişlerdir (111). Çalışmamızda, olgunun tedavi öncesi serum örneğinde minör tür olarak bulunan mutantın, lamivudin tedavisinin başlangıç dönemlerinde kaybolduğu, tedavinin 30. ayında yabancı tip ile birlikte minör tür olarak tekrar saptandığı görülmüştür. Otuzikinci ayda ise yabancı tip virusun kaybolarak yerini YIDD mutantına bıraktığı ve ALT'de yükselme ile birlikte viral yükte >1 log₁₀ artış olduğu belirlenmiştir. Bu olgudaki mutant virusun seyri, beklenen seyirden farklı olmuş, yani mevcut YMDD mutantlarının lamivudin baskısı altında seçilerek baskın tür halini alması ve klinik dirence yol açması şeklinde gerçekleşmemiştir. Olgunun tedavi öncesine ait serum örneğinde DA ve LiPA yöntemleri ile saptanmış olan YMDD ve YIDD dizili viral popülasyonların varlığı, klonal analiz ile doğrulanmıştır. Bu amaçla elde edilen altı HBV DNA klonundan birinin YIDD, birinin YVDD, diğerlerinin YMDD dizisi taşıdığı belirlenmiştir. Dizi analizi ve LiPA'da YVDD'nin saptanamamış olması, bu mutantı taşıyan virus popülasyonunun, YIDD popülasyonuna göre daha az olduğunu düşündürmektedir. Tedavinin 9. ayındaki serum örneğinden yapılan klonal analizde ise elde edilen yedi klonun tümünün YMDD dizisi taşıdığı saptanmıştır. Bu durum YIDD mutantının

belirgin olarak azaldığını göstermektedir. Mutant suşun ortamdaki tamamen silindiğini söylemek için, elde edilen klon sayıları yetersiz olabilir. Mutant dizilerin yeniden saptandığı 30. ve 32. ay serum örneklerinden, süre ve maddi olanakların sınırlı olması nedeniyle klonal analiz çalışması yapılamamış ancak çalışmada kullanılan her üç yöntemin de 31. ayda aynı sonucu vermesi güvenilirliği arttırmıştır. Ancak bu suş ile tedavi öncesi saptanan suşun aynı olup olmadığı değerlendirilememiştir. Mutantların seyrinin beklenenden farklı olmasında çeşitli faktörler rol oynamış olabilir. Tedavi kullanımının düzensiz olduğu saptanan bu olguda, ilacın kullanılmadığı dönemlerde yabancıl tip virusun yeniden popülasyona hakim olması seyri etkilemiş olabileceği gibi, tedavi öncesi saptanan YIDD taşıyan suşun, replikasyonla bağdaşmayacak başka mutasyonlar taşıması nedeniyle ilaç kullanımı sırasında baskın hale geçmemesi söz konusu olmuş olabilir. Çalışmaya dahil edilmeyen fenotipik testlerin kullanımı veya tüm genom dizisi eldesi ile izolatlar arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi, bu tür olguların açıklanmasına yardımcı olabilir.

YMDD mutasyonlarının saptanabilir olması, Avrupa kaynaklı çalışmalarda genellikle tedavinin 7 – 11. ayından sonra meydana gelmektedir (128, 102, 146,107). Amerika’da yapılan bir çalışmada, viral direnç oluşmadan önce, tedavinin 6. ayından itibaren düşük düzeylerde mutant suşların saptandığı bildirilmiştir (135). Chayama ve arkadaşları da bir yıllık lamivudin tedavisi sonunda beş Japon KHB hastasında YMDD mutanti saptamışlar, mutasyonların en erken tedavinin 8. ayında gözlemlendiğini rapor etmişlerdir (147). Çalışmamızda YMDD mutanti gelişen olgularda, mutasyonlar ortalama 18,8. ayda belirlenmiştir. Mutasyonlar en erken (bir olguda) tedavinin 3. ayında saptanmıştır. Paik ve arkadaşlarının KHB hastalarında uyguladıkları 12 haftalık kısa süreli lamivudin çalışmasında, tedavi sonunda 28 hastanın 17’sinde YIDD mutanti bulunmuş, 4 hastada tedavinin 2. haftasında, 1 hastada ise 4. haftada mutantların saptandığı bildirilmiştir. Bu değerler, lamivudin tedavisi alan KHB hastalarında saptanmış en erken değerlerdir. Çalışmaların sonuçları arasındaki farklılıklar, HBV genotipi, mutant saptamada kullanılan yöntemlerin duyarlılığı ve kullanılan ilaç dozu gibi değişkenlerden kaynaklanıyor olabilir (107). Genellikle YMDD mutasyonlarının saptanması ile viral direnç gelişimi arasında zaman farkı olmaktadır. Viral direnç, tedavi sırasında istikrarlı bir viral replikasyon supresyonu döneminden sonra serum HBV-DNA düzeyinde meydana gelen en az 1 log₁₀’luk artış olarak tanımlanmaktadır. Tedavi uygun olmadığında veya ilaca dirençli mutantlar ortaya çıktığında saptanmaktadır (126). Mutasyon saptanan hastalarda her zaman viral

direnç gelişmeyebilir (118, 127). Çalışmamızda, hasta grubunun %50'sinde YMDD mutantı saptanırken, YMDD mutantına sahip olguların %80'inde (12/15 olgu) viral direnç geliştiği gözlenmiştir. Bu konuda literatürdeki çalışmaların geniş bir aralık sergilediği görülmektedir. Bir çalışmada mutasyon saptanan hastaların %66,7'sinde viral direnç geliştiği bildirilirken (107); Dienstag ve arkadaşları, 23 KHB olgusunun %43'de YMDD mutasyonu tanımlamalarına karşın, mutasyon bulunan hastaların ancak %30'unda viral direnç saptamışlardır (148).

Hasta izleminde önemli olabilecek bir başka konu da mutantların saptanması, viral direnç ve karaciğerde yıkımı gösteren ALT yükselmesi arasındaki sıra ve zaman ilişkisidir. Çalışmamızda, YMDD mutantlarının saptanmasından ortalama 5 ay sonra viral yükte anlamlı artış olduğu görülmüştür. ALT yükselmesi, genellikle(11 olgu) viral yük artışından sonra gelişmiş ve tedavinin ortalama 26. ayından sonra saptanmıştır. Pas ve arkadaşları YMDD mutantlarını, tedaviye başladıktan ortalama 45 hafta (~11 ay) sonra saptamışlar, varyantların saptanmasından ortalama 31 hafta (~8 ay) sonra, diğer bir ifade ile tedaviye başlandıktan ortalama 76 hafta (~19 ay) sonra da ALT düzeyinde artış olduğunu belirtmişlerdir. ALT yükselmesi her zaman viral yük artışından sonra meydana gelmiştir (118). Ahmed ve arkadaşları, çalışmalarında lamivudin direncinden sorumlu polimeraz geni mutasyonlarını, HBV-DNA düzeylerindeki artıştan 144 gün önce (~5 ay) saptamışlardır (128).

Lamivudin tedavisi ile ilgili bir diğer tartışmalı konu da, YMDD mutantı gelişen olgularda bile viral yükün, tedavi öncesine göre daha düşük olduğu, bu nedenle başka alternatif yok ise tedaviye devam edilmesinin önerilebileceği yönündeki görüşlerdir. YMDD mutantına sahip olgularımızın tedavi sonrası HBV-DNA düzeylerinin, tedavi öncesi viral yükü ile karşılaştırıldığında, logaritmik olarak %20.0'sinde aynı, %73.3'ünde daha düşük, %6.66'sında daha yüksek olduğu saptandı. Genellikle YMDD varyantlarının in-vitro replikasyon yetenekleri, yabanıl tip virusa göre daha düşük olduğu için YMDD mutantlı izolatların ulaştığı HBV DNA düzeyleri çoğunlukla bazal HBV-DNA düzeylerinin altında kalmaktadır (149)

Ancak tedavi sırasında bazı KHB hastasında görülen ALT ve HBV-DNA düzeylerindeki artış, in-vitro koşullarda gösterilen bu replikasyon defektinin, in-vivo koşullarda yeniden sorgulanması gerektiğini düşündürmektedir. İlaç dirençli mutantların ortaya çıkmasından sonra viral yükteki artış, daha önce varolan yabanıl tip virusun, hepatosit popülasyonundan temizlenerek mutantların yayılımı ile gelişebilir şeklinde görüşler vardır (150)

Çalışmamızda, A grubu olgularda lamivudin tedavisi sırasında ilk gözlenen YMDD mutasyonları sıklık sırasıyla, YIDD (6 olgu), YMDD+YIDD (4 olgu), YMDD+YIDD+YVDD (3 olgu), YIDD+YVDD (1 olgu), YVDD (1 olgu) olarak belirlenmiştir. Olgularımızda YIDD tipi mutasyonun baskın olması HBV genotipi ile ilişkili olabilir. Filogenetik analiz, beklendiği gibi, tüm olgularımızın genotip D HBV ile infekte olduğunu göstermiştir. YIDD mutantının, genotip D HBV ile infekte hastalarda anlamlı derecede fazla olduğunu bildirilmiştir (151). Mutasyon saptanan beş olgunun izleminde, mutasyonlardaki ardışık değişiklikler benzer bir patern göstermiştir. Bu olgularda yabancı tip viruslar yerini öncelikle YIDD mutantlarına bırakmış, bir süre sonra YIDD mutantlarından YVDD mutantlarına geçiş gözlenmiştir. Lamivudin tedavisi sırasında HBV polimeraz geninde saptanan mutasyonlardaki ardışık değişiklikler için saptanan bu patern, diğer çalışmalarda da rapor edilmiştir (97, 152). Bir diğer çalışmada ise yabancı tip HBV'nin yerini önce YIDD tipi mutasyona bıraktığı, sonra buna rtL180M mutasyonunun ilave olduğu ve son olarak da bunların yerine YVDD + rtL180M kombinasyonunun geçtiği bildirilmiştir (153). Olgularımızda, kompensatuar rt L180M mutasyonu, YVDD/YIDD mutasyonu ile aynı zamanda veya daha sonra saptanmıştır. Bu mutasyonun in-vitro ilaç direncini arttırmanın yanı sıra replikasyonu da kısmen iyileştirdiği bildirilmiştir (154). YVDD mutasyonunun belirgin olarak bu mutasyonla ilişkili olduğu, olasılıkla ikisinin birlikte daha stabil bir mutant oluşturdukları düşünülmektedir.

Bazı YMDD mutant tipleri ile diğer polimeraz bölgesi mutasyonlarının birliktelikleri dikkat çekicidir. Çalışmamızda rtL80I/V mutasyonu genellikle YIDD ile birlikte saptanmıştır. On iki olguya ait 16 örnekte saptanan 80. kodon mutasyonlarının 13'ünde YIDD, üçünde YIDD + YVDD bulunmaktadır. Bu birlikteliği saptayan başka çalışmalar da olmakla birlikte, nedenine ilişkin bilgi bulunamamıştır (155).

Çalışmamızda tedavi alırken mutasyon saptanan iki olgunun (hasta no: 3 ve 9) izleminde, tedavi düzensizliği olmamakla birlikte yabancı tip virusun tekrar major populasyon olduğu gözlemlendi. Ben-Ari ve arkadaşları karaciğer transplantasyonundan sonra YMDD mutantı saptanmış 8'i genotip D, 2' si genotip C HBV ile infekte 10 hastanın 3'ünde mutant virusun yabancı tipe göre baskın olmasına rağmen, tedavi sırasında yabancı tipin tekrar gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. Lamivudin tedavisi sırasında yabancı tip virusun tekrar baskın duruma geçmesine ilişkin olasılıklardan biri, daha iyi replike olabilen yabancı tip virusun zayıf replikasyon gösteren mutant virusla birlikte bulunması ve zamanla ortama hakim olmasıdır (127).

A ve B domeynlerini kapsayan viral polimeraz proteininin katalitik bölgesi, HBsAg'nin "a determinanti" (124-147 aa) olarak bilinen major nötralizasyon bölgesi ile binişiktir. Lamivudin direncine yol açan pol/rt mutasyonları, S geninde de mutasyonlara yol açabilmektedir. Önemli bir antijenik determinant olan "a" bölgesi mutasyonları, HBsAg'nin anti-HBs'ye affinitesini azaltabilmekte, bu da tanıda problemlere veya aşı / HBIG ile infeksiyonun önlenmesinde başarısızlığa yol açabilmektedir (124,125,104). Lamivudin tedavisine direnç geliştiren olgularımızda rtM204I, rtM204V, rtV173L polimeraz mutasyonlarının, S bölgesinde sırasıyla W196L/S, I195M, E164D mutasyonlarına yol açtığı saptandı. Toressi ve arkadaşları, bağışık insan serumu havuzu kullanarak, bu mutasyonların HBsAg'nin antijenik özelliğini değiştirerek anti-HBs antikorlarına bağlanmasını azalttığını göstermişlerdir. (156).

8. KAYNAKLAR

1. Kıyan M: Hepatit B virusu. Eds: Kılıçturgay K, Badur S. Viral Hepatit. 1. baskı, İstanbul. Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2001;85-120.
2. Leung NW, Lai CL, Chang TT et al. Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001; 33:1527-32.
3. Zoulim F. Detection of hepatitis B virus resistance to antivirals. *J Clin Virol* 2001;21:243-53.
4. Whalley SA, Brown D, Teo CG et al. Monitoring the emergence of hepatitis B virus polymerase gene variants during lamivudine therapy using the Lightcycler. *J Clin Microbiol* 2001;39:1456-9.
5. Horvat RT, Tegtmeier GE: Hepatitis B and D viruses. Eds: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller A, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 8 th edition, Washington DC. ASM, 2003; 1464-94.
6. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:351-66.
7. Robinson WS: Hepadnaviridae: Hepatitis B virus and hepatitis delta virus. Eds: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. *Principles and Practice of Infectious Disease*. 5 th ed, New York. Churchill Livingstone, 2000; 1652-85.
8. Purcell RH. The discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterology* 1993; 104: 955-63.
9. Tennant BC, Mrosovsky N, McLean K, et al. Hepatocellular carcinoma in Richardson's ground squirrels (*Spermophilus richardsonii*): evidence for association with hepatitis B-like virus infection. *Hepatology* 1991; 13: 1215-21.
10. Testut P, Renard CA, Terradillos O, et al. A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol* 1996; 70: 4210-9.
11. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 51-68.
12. Yenen OŞ: Viral hepatitler. Eds: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları*. İstanbul, Nobel Kitapevleri Ltd.Şti,1996; 641-700.

13. Xiaolei H, Margolis HS, Purcell RH, et al. Identification of hepatitis B virus indigenous to chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1661-64.
14. Takahashi K, Brotman B, Usuda S, Mishiro S, et al. Full genome sequence analysis of hepatitis B virus strains recovered from chimpanzees infected in wild: implications for an origin of HBV. *Virology* 2000; 267: 58-64.
15. <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/hepatitis-virus.htm>
16. Serter D: Hepatit virusları ve viral hepatitler. *Virus, Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları*. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri, 1997; 175-206.
17. Locarnini S, McMillan J, Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common mutants. *Semin Liver Dis* 2003;23:5-20.
18. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337:1733-45.
19. Lau JYN, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 1993; 342: 1335-40.
20. Mehdi H, Kaplan MJ, Anlar FY, Yang X, et al. Hepatitis B Virus surface antigen binds to apolipoprotein H. *J Virol* 1994; 68: 2415-2424.
21. Budkowska A, Bedossa P, Groh F, Louise A, et al. Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis B virus: Identification by an anti-idiotypic antibody bearing the internal image of the Pre-S2 domain. *J Virol* 1995; 69: 840-848.
22. Neurath AR, Strick N, Sproul P. Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein. *J Exp Med* 1992; 175: 461-469.
23. Ryu CJ, Cho DY, Gripon P, Kim HS, et al. An 80-kilodalton protein that binds to the pre-S1 domain of hepatitis B virus. *J Virol* 2000; 74: 110-116.
24. Ganem D, Pollack JR, Tavis J. Hepatitis B virus reverse transcriptase and its many roles in hepadnaviral genomic replication. *Infect Agent Dis* 1994; 3: 85-93.
25. Fabrizi F, Lunghi G, Poordad FF, Martin P. Management of hepatitis B after renal transplantation: An update. *J Nephrol* 2002;15:113-122.
26. Moola N, M, Kew M, Abruthnot P. Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *J Viral Hepat* 2002;9:323-31.

27. Santantonio T, Jung MC, Schneider R, et al. Hepatitis B virus genomes that can not synthesize pre-S2 proteins occur frequently and as dominant virus populations in chronic carriers in Italy. *Virology* 1992; 188(2):948-52.
28. Brown SE, Howard CR, Zuckerman AJ, Steward MW. Affinity of antibody responses in man to hepatitis B vaccine determined with synthetic peptides. *Lancet* 1984:184-187.
29. Thomas HC, Foster GR, Sumiya M et al. Mutation of gene for mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet* 1996; 348:1417.
30. Rokuhara A, Tanaka E, Matsumoto E et al. Clinical evaluation of a new enzyme immunoassay for Hepatitis B virus core-related antigen; a marker distinct from viral DNA for monitoring lamivudine treatment. *J Viral Hepat* 2003;10:324-30.
31. Stephanos J, Hadziyannis, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic Hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34: 617-24.
32. Waris G, Siddiqui A. Interaction between STAT-3 and HNF-3 leads to the activation of liver-specific hepatitis B virus enhancer 1 function. *J Virol* 2002; 76: 2721-9.
33. Klein NP, Schneider RJ. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6427-36.
34. Hsia CC, Yuwen H, Tahor E. Hot spot mutations in hepatitis B virus X gene in hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1996; 348: 625-6.
35. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002; 83:1267-80.
36. Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994;198 : 489-503.
37. 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.

38. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-73.
39. Arauz-Ruiz P, Norder H, Vison AKA, Magnius LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small gene. *J Infect Dis* 1997; 176: 851-8.
40. Bozdayi G, Türkyılmaz AR, Idilman R et al. Complete genom sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus isolated from Turkish patients with chronic HBV infection. *J Med Virol* 2005;76:476-81.
41. Özcan A. Hepatit B virüsünde prekor ve kor promoter mutasyonlarının araştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi. Danışman Öğretim Üyesi: A.Sayiner. İzmir 2004.
42. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118: 554-9.
43. Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, et al. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Gastroenterology* 2001;1206: 1564-5.
44. Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999; 6: 299-304.
45. Thakur V, Guptan RC, Kazim SN, Malhotra V, et al. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:165-70.
46. Fung SK, LokA. Hepatitis B virus genotypes: Do they play a role in yhe outcome of HBV infection? *Hepatology* 2004;40:790-92.
47. Erhardt A, Reineke U, Blondin D, Gerlich WH, et al. Mutations of the core promoter and response to interferon treatment in chronic replicative hepatitis B. *Hepatology* 2000;31:716-25.
48. Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, et al. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000;33:998-1002.

49. Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Tsubota A, et al. Viral genotypes and response to interferon in patients with acute prolonged hepatitis B virus infection of adulthood in Japan. *J Med Virol* 2002;68:522-8.
50. Zollner B, Petersen J, Schroter M, Laufs R, et al. 20-fold increase risk of Lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw. *Lancet* 2001;24; 357:934-5.
51. Kao JH, Liu CJ, Chen DS. Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. *J Hepatol* 2002;36:303-4.
52. Petzold DR, Tautz P, Wolf F et al. Infection chains and evolution rates of hepatitis B virus in cardiac transplant recipients infected nosocomially. *J Med Virol*,1999;58:1-10.
53. Cooreman MP, Leroux-Roels G, Paulij WP. Vaccine- and hepatitis B Immune Globuline-Induced escape mutations of hepatitis B virus surface Antigen. *J Biomed Sci* 2001;8:237-47.
54. Shizuma T, Hasegawa K, Ishikawa K, et al. Molecular analysis of antigenicity of a vaccine escape mutant of hepatitis B virus. *J Gastroenterol* 2003;38:244-53.
55. Mathet VL, Feld M, Espinola L, et al. Hepatitis B virus S gene mutants in a patient with chronic active hepatitis with circulating Anti-Hbs Antibodies. *J Med Virol* 2003;69:18-26.
56. François G, Kew M, Van Damme P, et al. Mutant hepatitis B viruses: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implications? *Vaccine* 2001;19:3799-815.
57. Zanetti AR, Tanzi E, Manzillo G, et al. Hepatitis B variants in Europe. *Lancet* 1988; 1132-3.
58. Chen H, Fang D, Li F et al. A novel hepatitis B virus mutant with A-to-G at nt551 in the surface antigen gene. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 304-308.
59. He C, Fumio N, Itoga S et al. Prevalance of vaccine-induced escape mutants of hepatitis B virus in the adult population in China: A prospective study in 176 restaurant employees. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1373-77.

60. Lu M, Lorentz T. De novo infection in a renal transplant recipient caused by novel mutants of hepatitis B virus despite the presence of protective Anti-Hepatitis B surface antibody. *J Infect Dis* 2003;187:1323-6.
61. Carman W. Molecular variants of hepatitis B virus. *Clinics Lab Med* 1996;16: 907-28
62. Kramwis A, Kew MC, Bukofzer S, et al. Hepatitis B virus precore mutants in serum and liver of southern African blacks with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1998;28:132-41.
63. Kurosaki M, Enomoto N, Asahina Y, Sakuma I, et al. Mutations in the core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1996; 49:115-23.
64. Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, et al. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1999;179: 775-82.
65. Tassopoulos NC, Volpes R, Pastore G et al. Efficacy of Lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. *Hepatology* 1999; 29: 889-96.
66. Cho SW, Hahm K, Kim JH. Reversion from precore/core promoter mutants to wild-type hepatitis B virus during the course of lamivudine therapy. *Hepatology* 2000; 32: 1163-9.
67. Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A, Papadimitropoulos V, et al. Course of virologic breakthroughs under long-term lamivudine in HBeAg-negative precore mutant HBV liver disease. *Hepatology* 2002;36:219-26.
68. Bozkaya H: Hepatit B virus mutasyonlarının klinik ve tedavi açısından önemleri. Eds: Ökten A, Çakaloğlu Y. Hepatit B Ulusal Uzlaşma Toplantı Metinleri. 1.baskı. İstanbul, 2003; 29-42.
69. Bozdayı AM, Uzunalimoğlu Ö, Türkyılmaz AR et al. YSDD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J Viral Hepat* 2003;10:256-65.
70. Thibault V, Benhamou Y, Seguret C et al. Hepatitis B virus mutations associated with resistance to lamivudine in patients coinfecting with HBV and human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1999;37:3013-16.

71. Asahina Y, Enomoto N, Nagayama K et al. Hepatitis B virus mutations associated with lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res* 1999;15:145-56.
72. Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, et al. Nomenclature for antiviral resistant human hepatitis B mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001; 33: 751-757.
73. Locarnini S, Mason WS. Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance. *J Hepatol* 2006; 44: 422-31.
74. Şentürk H: HBe Ag pozitif kronik hepatit B'nin lamivudin ile tedavisi. Eds: Ökten A, Çakaloğlu Y. Hepatit B Ulusal Uzlaşma Toplantı Metinleri. 1. baskı. İstanbul, 2003; 177-81.
75. Dan Y, Wai C, Lee Y et al. Outcome of lamivudine-resistant hepatitis B virus is generally benign except in cirrhotics. *World J Gastroenterol* 2005;11:4344-50.
76. Locarnini S, Qi X, Arterburn S et al. Incidence and predictors of emergence of adefovir resistant HBV during four years of adefovir dipivoxil (ADV) therapy for patients with chronic hepatitis B (CHB). *J Hepatol* 2005; 42: A17.
77. Marcellin P, Asselah T. Resistance to adefovir: A new challenge in the treatment of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2005; 43: 920-23.
78. Brunelle MN, Jacquard AC, Pichoud C, et al. Susceptibility to antivirals of a human HBV strain with mutations with conferring resistance to both lamivudine and adefovir. *Hepatology* 2005; 41:1391-98.
79. Fung SK, Andreone P, Han SP et al. Adefovir-resistant hepatitis B can be associated with viral rebound and hepatic decompensation. *J Hepatol* 2005;43:937-45.
80. Akarca US: HBe Ag negatif kronik B hepatiti tedavisinde adefovir dipivoxil ve diğer antiviraller. Eds: Ökten A, Çakaloğlu Y. Hepatit B Ulusal Uzlaşma Toplantı Metinleri. 1. baskı. İstanbul, 2003; 205-220.
81. Delaney WE, Yang H, Miller MD et al. Combinations of adefovir with nucleoside analogs produce additive antiviral effects against hepatitis B virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3702-3710.

82. Tenney DJ, Levine SM, Rose E 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.
83. Uchida T, Saitoh T, Shinzawa H. Mutations of the X region of hepatitis B virus and their clinical implications. *Pathol Int* 1997; 47:183-93.
84. Taşyaran M: Epidemiyoloji. Eds: Kılıçturgay K, Badur S. *Viral Hepatit*. 1. baskı. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2003;121-128.
85. EASL Jury. EASL international consensus conference on hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 38: 533-40.
86. Mıstık R, Balık İ. Türkiye’de viral hepatitlerin epidemiyolojik analizi. Eds: Kılıçturgay K, Badur S. *Viral Hepatit*. 1.baskı. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2001;10-55.
87. Van der Eijk AA, de Man RA, Niesters HG et al. Hepatitis B virus (HBV) DNA levels and the management of HBV-infected health care workers. *J Viral Hepat* 2006 ;132-4.
88. Chisari F, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol*, 1995; 13:29-60.
89. Çınar K: Hepatit B virusunun immunopatogenezi. Eds: Ökten A, Çakaloğlu Y. *Hepatit B Ulusal Uzlaşma Toplantı Metinleri*. 1.baskı. İstanbul, 2003; 57-64.
90. Ferrari C, Misalce G, Boni C et al. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B: Immunopathogenesis of Hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39: 36-42.
91. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:351-66.
92. Hilleman MR. Critical overview and outlook: pathogenesis, prevention, and treatment of hepatitis and hepatocarcinoma caused by hepatitis B virus. *Vaccine* 2003; 21: 4626-49.
93. Kerr JR. Modern methods and their utility in clinical virology. *Infect Dis Rev* 2000;2:2-4.
94. Niesters HM. Clinical virology in real time. *J Clin Virol* 2002;25:3-12.
95. Pas SD, Niesters HM. Detection of HBV DNA using real time analysis. *J Clin Virol* 2002; 25:93-94.

96. Sablon E, Shapiro F. Advances in molecular diagnosis of HBV infection and drug resistance. *Int J Med Sci* 2005;2:8-16.
97. Gutfreund KS, Williams M, George R, et al. Genotypic mutations of the hepatitis B virus polymerase associated with lamivudine resistance. *J Hepatol* 2000; 33: 469-75.
98. Allen MI, Gauthier J, DesLauriers M, et al. Two sensitive PCR-based methods for detection of hepatitis B virus variants associated with reduced susceptibility to lamivudine. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3338-47.
99. Stuyver L, Van Geyt C, Gent SD, et al. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 702-7.
100. Aberle SW, Kletzmayr J, Watschinger B, et al. Comparison of sequence analysis and the INNO-LiPA HBV DR line probe assay for detection of lamivudine resistant hepatitis B virus strains in patients under various clinical conditions. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1972-74
101. Zhang M, Gong Y, Osiowy C, et al. Rapid detection of hepatitis B virus mutations using Real-Time PCR and melting curve analysis. *Hepatology* 2002;36:723-28.
102. Cane PA, Cook P, Ratcliffe D, et al. Use of Real-Time PCR and fluorimetry to detect lamivudine resistance associated mutations in hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1600-8.
103. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2001;34:1225-41.
104. Lu HY, Zheng Z, Xu XY, Zhang NL. Mutations in surface and polymerase gene of chronic hepatitis B patients with coexisting HbsAg and anti-HBs. *World J Gastroenterol* 2006; July 14;12(26):4219-422
105. Locarnini S, Omata M. Molecular virology of hepatitis B virus and the development of antiviral drug resistance. *Liver Int* 2006; 26:1 1-22.
106. Durantel D, Brunelle MN, Gros E, Durantel SC. Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing. *J Clin Virol* 2005; 34: 34-43

107. Paik YH, Chung HY, Ryu WS, Lee KS. Emergence of YMDD motif mutant of hepatitis B virus during short term lamivudine therapy in South Korea. *J Hepatol* 2001; 35: 92-98
108. Akarsu M, Sengonul A, Tankurt E, Sayiner AA. YMDD motif variants in inactive Hepatitis B carriers detected by INNO-LiPA HBV DR ASSAY. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 12:1769-1771
109. Eren F. Lamivudin benzeri antiviral tedavisi almamış asemptomatik hepatit B taşıyıcısı ve kronik B hepatitli hastalarda YMDD motif mutasyonları saptanması ve genotip tayini yapılması. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gastroenteroloji Enstitüsü Viral Hepatitler Programı Yüksek Lisans Tezi. Danışman öğretim üyesi: Prof. Dr. Cem KALAYCI. İstanbul, 2003.
110. Huang ZM, Huang QW, Qin YQ, et al. YMDD mutations in patients with chronic hepatitis B virus untreated with antiviral medicines. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 867-870
111. Zhang X, Liu C, Gong Q, Zhang DZ, et al. Evolution of wild type and mutants of the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase during Lamivudine therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18:1353-1357
112. Rosenberg PM, Dienstag JL. Therapy with nucleoside analogues for hepatitis B virus infection. *Clin Liver Dis* 1999;3:349-361
113. Dienstag JL, Perillo RP, Schiff ER, Bartholomew M et.al. A preliminary trial for lamivudine for chronic hepatitis infection. *N Engl J Med* 1995; 33: 1657-1661
114. Liaw YF, Leung NWY, Chang TT, Guan R, et.al. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 119:172-180
115. Schalm SW, Heathcore J, Costa J, Mas A, et al. Influence of hepatitis B virus genotype on the long term outcome of chronic hepatitis B in Western patents. *Gastroenterology* 2002;123:1848-1856
116. Perillo RP, Lai CL, Liaw YF, Dienstag JL, et al. Predictors of HbeAg loss after treatment for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002;36:186-194
117. Hussain M, Lok ASF. Mutations in the hepatitis B virus polymerase gene associated with antiviral treatment for hepatitis B. *J Viral Hepat* 1999;6:183-194

118. Pas SD, de Man RA, Fries E, et al. The dynamics in the YMDD motif of the hepatitis B virus polymerase gene during and after lamivudine treatment as determined by reverse hybridisation. *J Clin Virol* 2002; 25: 63-71.
119. Villeneuve JP, Durantel D, Durantel S, Westland C. Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient. *J Hepatol* 2003; 39: 1085-1089
120. <http://www.innogenetics.com/infectiousdiseases.html?id=9>
121. Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Molecular basis of Hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol* 1992; 73: 3141-3145
122. Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S. HBV drug resistance: Mechanisms, detection and interpretation. *J Hepatol* 2006; 44:593-606
123. Locarnini S. Molecular virology and the development of resistant mutants: Implications of therapy. *Semin Liver Dis* 2005; 25 :9-19
124. Locarnini S. Hepatitis B virus surface antigen and polymerase gene variants: potential virological and clinical significance. *Hepatology* 1998; 27: 294-297
125. Torresi J. The virological and clinical significans in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Clin Virol* 2002; 25: 97-106
126. Leung N. Viral breakthrough durin lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *Intervirolgy* 2003; 46: 344-349
127. Ben-Ari Z, Daudin N, Klein A, Sulkes J, et al. Genotypic and phenotypic resistance: Longitudinal and sequential analysis of heğpatitis B virus polymerase mutations in patients with lamivudine resistance after liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 151-159
128. Ahmed SNS, Tavan C, Pichoud C, Berby F, et al. Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000; 32: 1078-1088
129. Akuta 2003, Suzuki F, Kobayashi M, Matsuda M. Virological and biochemical relapse according to YMDD motif mutant type during long term lamivudinde monotherapy. *J Med Virol* 2003; 71:504-510

130. Enomoto M, Tamori A, Kohmoto Mmt, Morikawa H. Mutational patterns of hepatitis B virus genome and clinical outcomes after emergence of drug resistant variants during lamivudine therapy: Analyses of the polymerase gene and full length sequences. *J Med Virol* 2007; 79:1664-1670
131. http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ta_man.pdf
132. Lok ASF, Zoulim F, Locarnini S, Mangia A. Monitoring drug resistance in chronic hepatitis B virus (HBV)-infected patients during lamivudine therapy: Evaluation of performance of INNO-LiPA HBV DR Assay. *J Clin Microbiol* 2002; Oct: 3729-3734
133. Sertöz RY, Erensoy S, Pas S, Akarca US et al. Comparison of sequence analysis and INNO-LiPA HBV DR Line Probe Assay in patients with chronic hepatitis B. *J Chemother* 2005;17:514-520
134. Honkoop P, Niesters HGM, Man RAM, Osterhaus ADME, et al. Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1997; 26: 1393-1395
135. Lau DTY, Khokhar MF, Doo E, Ghany MG, et al. Long term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology* 2000; 32: 828-834
136. Liaw YF. Impact of YMDD mutations during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Chem and Chemother* 2001;12 : 67-71
137. Lai CL, Dienstag JL, Schiff E, Leung NWY, et al. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 687-696
138. Kobayashi S, Shimada K, Suzuki H, et al. Development of a new method for detecting a mutation in the gene encoding hepatitis B virus reverse transcriptase active site (YMDD motif). *Hepatology* 2000; 17:31-42 (Abstract)
139. Kirishima T, Okanoue T, Daimon Y, Hoh Y et al. Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. *J Hepatol* 2002; 37: 259-265
140. Heo J, Cho M, Kim HH, Shin YM, et al. Detection of YMDD motif mutants by oligonucleotide chips in lamivudine untreated patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Korean Med Sci* 2004;19:541-546

141. Matsuda M, Suzuki F, Suzuki Y, et al. Low rate of YMDD motif mutations in polymerase gene of hepatitis B virus in chronically infected patients not treated with lamivudine. *J Gastroenterol* 2004; 39 :34-40
142. Matsuda M, Suzuki F, Suzuki Y, Tsuboto A et al. YMDD mutants in patients with chronic hepatitis B before treatment are not selected by lamivudine. *J Med Virol* 2004; 74: 361-366
143. Zhang XH, Zhang YX, Sun LR, Wen Q et al. Study of gene chips in the detection of YMDD mutations in the region of HBV polymerase. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2003; 83: 459-462 (Abstract)
144. Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 2001;34:584-586
145. Leon P, Pozo F, Echevarria JM. Detection of hepatitis B virus bvariants resistant to lamivudine and famciclovir among randomly selected chronic carriers from Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22:133-137
146. Mutimer D, Pillay D, Cook P et al. Selection of multiresistant hepatitis B virus during sequential nucleoside analogue therapy. *J Infect Dis* 2000; 181: 713-716
147. Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, et al. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 1998; 27: 1711-1716
148. Dienstag JL, Schiff E, Mitchell M, et al. Extended lamivudine retreatment for chronic hepatitis B: Maintenance of viral suppression after discontinuation of therapy. *Hepatology* 1999; 30: 10822-1087
149. Liu KZ, Wei H, Zumbika E, et al. Clinical features of chronic hepatitis B patients with YMDD mutation after lamivudine therapy. *J Zhejiang Univ SCIENCE B* 2005; 6(12):1182-1187
150. Zhou T, Saputelli J, Aldrich CE, et al. Emergence of drug resistant population of woodchuck hepatitis virus in woodchucks treated with the antiviral nucleoside lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; Aug: 1947-1954

151. Zollner B, Petersen J, Stöckl EP, et al. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 2004; 39:42-50
152. Niesters HG, Honkoop P, Haagsma EB, et al. Identification of more than one mutation in the hepatitis B virus polymerase gene arising during prolonged lamivudine treatment. *J Infect Dis* 1998; 5:1382-1385 (Abstract)
153. Natsuizaka M, Hige S, Ono Y et al. Long term follow-up of chronic hepatitis B after the emergence of mutations in the hepatitis B virus polymerase region. *J Viral Hepatol* 2005 ; 12: 154-159 (Abstract)
154. Ono SK, Kato N, Shiratori Y et al. The polymerase L528M mutations cooperates with nucleotide binding site mutations increasing hepatitis B virus replication and drug resistance. *J Clin Invest* 2001;107: 449-455
155. Ogata N, Fujii K, Takigawa S, Nomoto M. Novel patterns of amino acid mutations in the hepatitis B virus polymerase in association with resistance to lamivudine therapy in Japanese patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1999; 59: 270-276
156. Torresi J, Silveira LE, Deliyannis G, 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: 305-313