

**S.B ŞİŞLİ EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
GASTROENTEROLOJİ ÜNİTESİ**

EĞİTİM SORUMLUSU: Doç.Dr. Canan ALATAŞ ALKİM

**NAİVE KRONİK HEPATİT B TANILI
HASTALARDA LAMİVUDİN DİRENCİ**

GASTROENTEROLOJİ

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Dr.ENGİN ALTINKAYA

İSTANBUL-Ocak 2012

İçindekiler Tablosu

TEŞEKKÜR.....	III
KISALTMALAR	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	V
ÖZET.....	VI
GENEL BİLGİLER.....	1
TARİHÇE	1
EPİDEMİYOLOJİ.....	1
HEPATİT B VİRUSUNUN MOLEKÜLER VİROLOJİSİ.....	2
VİRİON YAPISI VE GENOMİK ORGANİZASYONU.....	2
HBV GENOTİPLERİ VE SEROTİPLERİ	3
VİRAL REPLİKASYON VE HBV YAŞAM DÖNGÜSÜ	4
HBV GENOM MUTASYONLARI.....	5
PATOGENEZ.....	9
KRONİK HEPATİT B'DE KLİNİK	10
HBV ENFEKSİYONUNUN TANISI	12
SEROLOJİK TANI YÖNTEMLERİ.....	12
MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ.....	13
KRONİK HEPATİT B NİN GÜNCEL TEDAVİSİ	13
TEDAVİDE VİRAL DİRENÇ.....	15
DİRENÇ İNSİDANSI VE PREVALANSI	15
DİRENÇ MEKANİZMASI	16
NUKLEOZİD ANALOGLARININ POLİMERAZ MUTASYONLARI	17
DİRENCİN KLİNİK ÖZELLİKLERİ	18
TANIMLAR.....	18
PRİMER YANITSIZLIK	18
KİSMİ YANIT	18
VİRAL REBAUND	19
İLAÇ DİRENCİNDE UYGULANACAK TEDAVİ.....	19
MATERYAL VE METOD.....	21
ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLME VE DIŞLANMA KRİTERLERİ.....	21
HBV DNA VİRAL YÜK TESTİ.....	21
HBV İLAÇ DİRENÇ TESTİ.....	21
İSTATİSTİKSEL YÖNTEM	22
BULGULAR.....	23
TARTIŞMA.....	26
KAYNAKÇA	29

İçindekiler Tablosu

HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanması sırasında değerli görüş ve tecrübeleri ile çalışmalarımı yönlendirerek yardımlarını esirgemeyen ve her konudaki desteklerini ve güvenlerini yanımda bulduğum Doç. Dr. Canan ALATAŞ ALKİM'a, eğitimim sürecinde değerli bilgi ve görüşlerinden yararlandığım Prof. Dr. H. Mehmet SÖKMEN'e, yardımları ve dostlukları için Dr. Ali Rıza KÖKSAL, Dr. Osman ÖZDOĞAN, Dr. Sait BUĞDACI, Dr. Salih BOĞA, Dr. Mehmet BAYRAM ve Dr. Funda ŞİMŞEK arkadaşlarıma, desteği ile bana her zaman güç veren eşim Dr. Işık ALTINKAYA ve günün tüm stresini üzerimden atamada bana yardımcı olan çocuklarım Berkay ve Akif'e teşekkür ederim.

KISALTMALAR

AVD: adefovir dipivoksil

KHB: kronik hepatit B

ETV: entekavir

HBV: hepatit B virüsü

LdT: telbivudin

LMV: lamivudin

NA: nükleoz(t)id analogları

TDF: tenofovir

HBsAg: Hepatit B yüzey antijeni

Anti-HBs: Hepatit B yüzey antijenine karşı antikor

ALT : Alanin aminotransferaz

AST : Aspartat aminotransferaz

cccDNA: “covalently closed circular DNA” kovalent kapalı sirküler DNA

DA: Dizi analizi yöntemi

LiPA: “Line probe assay”, strip hibridizasyon yöntemi

YMDD: Tirozin-metionin-aspartat-aspartat

RT-PCR: Real Time Polimeraz Chain Reaction

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 HBV'NİN GENOMİK ORGANİZASYONU VE SENTEZLENEN RNA'LARI.....	3
Şekil 2: HEPATİT B REPLİKASYON DÖNGÜSÜ.....	6
Şekil 3 ANTİVİRAL İLAÇ DİRENÇ MUTASYONLARI.....	9
Şekil 4 HBV İLAÇ DİRENÇLİ MUTASYONLARIN SELEKSİYON VE OLUŞUM MEKANİZMASI.	17
Şekil 5 ORAL ANTİVİRAL AJANLARDA DİRENÇ DURUMLARI.....	17

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1 HBV ENFEKSİYONU SEROLJİK ANTİKOR VE ANTİJEN DURUMLARI	12
Tablo 2 KRONİK HEPATİT B GÜNCEL TEDAVİDE KULLANILAN İLAÇLAR.....	15
Tablo 3 CİNSİYET VE YAŞ DAĞILIM TABLOSU	23
Tablo 4 HASTALARDA SAPTANAN MUTASYON TİPLERİ.....	23
Tablo 5 MUTASYON OLAN VE OLMAYAN HASTALARDA HBV DNA DÜZEYİ	24
Tablo 6 MUTASYON OLAN VE OLMAYAN HASTALARDA ALT DÜZEYİ.....	24
Tablo 7 MUTASYON OLAN VE OLMAYAN HASTALARDA HAI VE FİBROZ SKORU.....	25
Tablo 8 HBeAg NEGATİF VE POZİTİF HASTALARIN SONUÇLARI.....	25
Tablo 9 MUTASYON OLAN VE OLMAYAN HASTALARIN SONUÇLARI.....	25

ÖZET

AMAÇ

Kronik hepatit B, bu gün dünyada 400 milyon kişiyi ilgilendiren önemli bir sağlık problemi ve en yaygın enfeksiyon hastalıklarından biridir. Lamivudin, uzun yıllardır kronik hepatit B hastalarının tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Lamivudin direnci sadece tedavi sırasında gelişmemekte ayrıca tedavi almamış hastalarda da doğal genom çeşitliliği olarak bulunabilmektedir. Naive hepatit B hastalarında lamivudin direnç oranı toplumlar arasında farklılık göstermektedir. Şu anda Türk toplumunda bu oranı net belirleyecek yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, polikliniğimizde takip edilen tedavi almamış kronik hepatit B hastalarında diğer merkezlerde yapılan çalışmalar ile birlikte Türk popülasyonunda YMDD motif mutantlarının oranını belirlemektir.

MATERYAL VE METOD

Çalışmaya daha önce kronik hepatit B ye yönelik herhangi bir tedavi almamış 71 kronik hepatit B li hasta dahil edildi. Şu anda tedavi almayan ancak daha önce interferon veya oral antiviral tedavi almış ve ara vermiş olan hastalar tedavi süresine bakılmaksızın çalışma dışı bırakıldı. Hastalardan alınan serum örneklerinde HBV DNA, RT-PCR yöntemi ile kantitatif olarak saptandı. Lamivudin motif mutantlarını (rtM204I, M204V, M204S, L180M, L80I, L80V, V173L) saptamak için dizi analizi ve strip ile revers hibridizasyon yöntemi kullanıldı. Hastaların tümüne karaciğer biyopsisi yapıldı. Alınan kan serum örneklerinde karaciğer enzimleri, HBeAg ve anti-HBe düzeyleri kontrol edildi.

BULGULAR

Çalışmaya katılan 71 hastanın %65 i erkek (46/71); %35 i kadındı (25/71). Yaş ortalamaları 37 ± 8 yıldır. Hastalar'da saptanan mutasyon oranı %11.3 olup toplam 8 kişide saptandı (8/71). Saptanan bu mutasyonların 4 ü YIDD (rtM204I) ve diğer 4 ü YVDD (rtM204V) mutasyonuydu. Mutasyon saptanan hastaların 5 i erkek 3 ü kadındı. Mutasyon saptanan ve saptanmayan hastaların HBV DNA ları mutasyon saptanmayan hasta grubunda hafif fazla olmakla birlikte birbiriyle

karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.27$). Tüm hastaların %68 inde HBeAg negatif (48/71), %32 sinde (23/71) pozitif di. HBeAg negatif olan hastalarda mutasyon görülme sıklığı %8.3 (4/48) olup, HBeAg pozitif olan hastalarda görülen %17 (4/23) mutasyon oranından azdı($p=0.01$). Mutasyon saptanan ve saptanmayan hastaların demografik özellikleri, ALT düzeyleri, HAI ve fibroz skorları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı($p=0.29$).

SONUÇ

Lamivudin, uzun yıllardır kronik hepatit B hastalarının tedavisinde kullanılan güvenilir ve yan etki az olan bir ilaçtır. Lamivudinin kullanım süresine paralel olarak artan ilaç direnci ve bu direnç sonrasında oluşan dekompanseasyon ilaç direncinin önemini ortaya koymaktadır. Lamivudin direnci sadece tedaviden sonra gelişmemekte, ayrıca tedavi almamış hastalarda da görülmektedir. Bizim çalışmamızda tedavi almamış hepatit B hastalarında mutasyon %11.3 olup bu mutasyonların 4 tanesi rtM204I diğer 4 ü rtM204V olarak saptandı. HBeAg pozitif olan hastalarda mutasyon görülme sıklığı %17 olup HBeAg negatif hastalardan fazlaydı.

YMDD motif mutanların doğal genom çeşitliliğinin toplumlar arasındaki prevalansın yüksek olduğu toplumlarda lamivudin tedavisi öncesinde direnç bakılması sonradan oluşacak komplikasyonları önleyebilir. Bu nedenle tüm popülasyonların kendi direnç prevalansını belirlemesi kronik hepatit B virüsü hastalarında tedaviyi buna göre planlaması ilerde oluşacak komplikasyonları önleyebilir ve tedavinin etkinliğini artırabilir.

GENEL BİLGİLER

TARİHÇE

HBV ilk defa 1965 yılında Blumberg ve arkadaşları tarafından "Au-Ag Avusturalya Antijeni" adı verilen bir serum proteini olarak rapor edilmiş, 1970 yılında tüm virionun elektron mikroskopi görüntüleri saptanarak, HBV'nun esas enfeksiyöz partikülü olan "Dane Partikülleri" adını almıştır. Kırk iki nm büyüklüğündeki Dane partikülleri dışında 22 nm'lik sferik ve 22 x 100-200 nm büyüklüğünde filamentöz partiküller de elektron mikroskopunda tarif edilmiş, izleyen yıllarda çeşitli çalışmalar ile virusun genomik yapısı ve proteinleri karakterize edilmiştir. HBV, Hepadnaviridae virus ailesinde sınıflandırılan, ancak diğer aile üyelerinden farklı olarak sadece insan ve şempanzelerin karaciğerlerinde enfeksiyon oluşturan, genom organizasyonu, doku tropizmi ve replikasyon stratejisi açısından ailenin prototip özelliklerine sahip bir virüstür (4).

EPİDEMİYOLOJİ

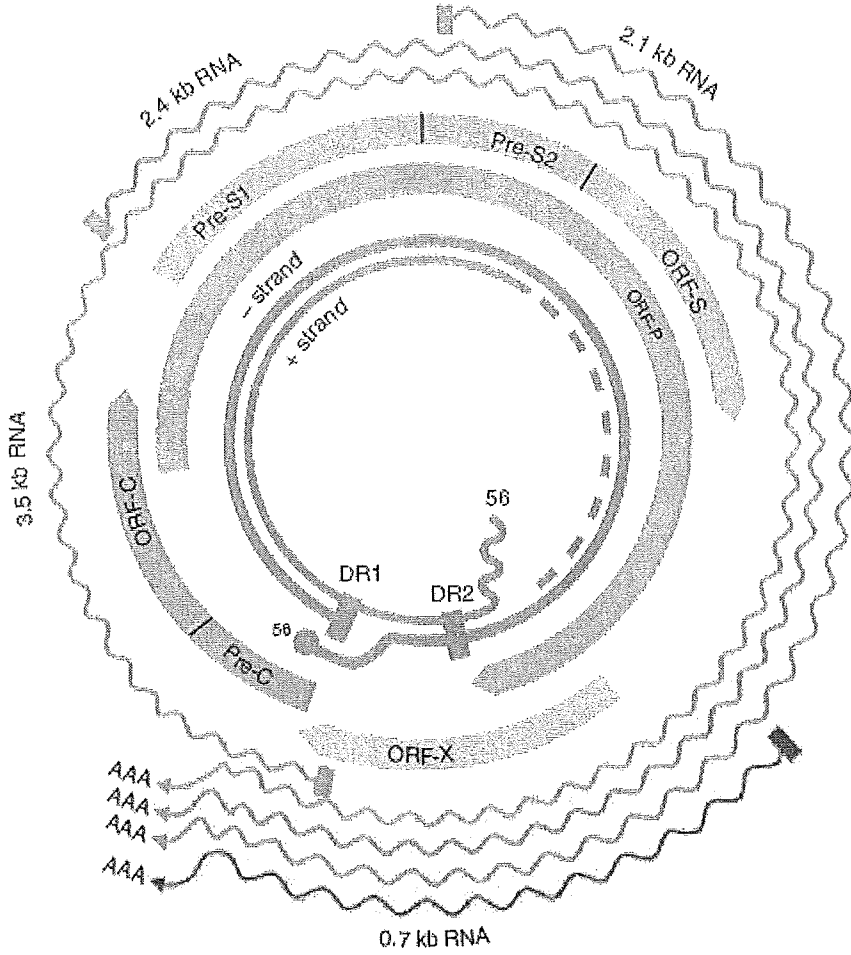
Dünyada yaklaşık 2 milyar insan HBV ile karşılaşmış olup seropozitifdir. Dört yüz milyon milyon kişinin kronik HBV enfeksiyonlu, bunların yaklaşık %7-30'unun da HBV varyantları ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye'de 3.5 milyon insan HBV ile enfekte. Bunlardan sadece 400 bini tedavi almakta, geri kalan büyük miktardaki popülasyon ise kendisinin HBV ile enfekte olduğundan habersiz yaşamaktadır. Dünya nüfusunun yaklaşık % 5 (%0,1-20)'i inaktif taşıyıcıdır. İnaktif taşıyıcılar, çoğu kez HBV'ye bağlı herhangi bir rahatsızlık geliştirmeden normal yaşamlarını sürerken, çok az hastada KHB gelişmekte; az bir oranda hastada da HBsAg kaybolmaktadır (5). HBV'nin bulaşmasında taşıyıcıların yanı sıra, akut ve kronik enfeksiyonlu bireylerin kan ve vücut sıvıları önemli rol oynar (6). İnsan vücut sıvılarından kan, semen ve vajinal sekresyonlarda önemli oranda HBV bulunurken (HBsAg ve HBV DNA pozitifliği) ter, gözyaşı, tükürük, süt ve diğer vücut sıvılarında da virüs tespit edilmiş olup, bu sıvılar da potansiyel olarak enfeksiyöz kabul edilmektedir (7). -20 °C'de uzun süre saklanabilir ve 60 °C'de 4 saat yaşayabilir. 100 °C'de ve sodyum hipokloritle muamele ile 10 dakikada inaktive olur. HBV

enfeksiyonunun başlıca bulaşma yolları parenteral, cinsel, horizontal ve perinatal-vertikal dir.

HEPATİT B VİRUSUNUN MOLEKÜLER VİROLOJİSİ.

VİRİON YAPISI VE GENOMİK ORGANİZASYONU

HBV küçük, zarflı bir DNA virusudur. Viral genom yaklaşık 3200 nükleotidden oluşan, oldukça küçük ve aşağı yukarı % 70 çift, % 30 tek iplikli çembersel DNA'dan oluşur. Bu genom ikozahedral bir kapsid içerisinde bulunur ve bu kapsid dışında 3 farklı yüzey antijenini taşıyan lipid yapıları zarf yer alır. Zarflı bir virus olmasına rağmen eter, düşük pH, ısı, dondurma ve çözmeye oldukça dirençlidir, bu özellikleri ile kişiden kişiye geçişteki etkinlik ve dezenfektan direnci sağlanır (8). HBV, bir DNA virusu olmasına karşın "revers transkriptaz" enzimi kodlar ve bu enzim sayesinde RNA aracısı üzerinden replike olur. İnfekte hücre çekirdeğinde bir minikromozom şeklinde bulunur. Kovalent bağlı çembersel DNA adı verilen (cccDNA), replikasyon ve transkripsiyon esnasında aracı molekül özelliği taşıyan bir DNA zinciri üzerinden meydana gelen, karmaşık bir replikasyon stratejisine sahiptir. HBV genomu dört açık okuma çerçevesi oluşturacak şekilde organize olmuştur (P, C, X ve S). Bunlardan en büyüğü olan P viral polimerazı kodlar. Zarf yapılarına ait kısım da P içerisinde bulunur. Özyapı (C;core) ve X açık okuma çerçeveleri de zarfı oluşturan kısım ile bazı bölgelerde üst üste binmiş şekilde bulunur. cccDNA yapısı tüm viral transkriptler için kaynak oluşturur ve virusa ait 3.5, 2.4, 2.1 ve 0.7 kb'lik mRNA'lar cccDNA kalıp alınarak sentezlenir. Viral RNA'ların ekspresyonu sırasıyla enhancer II / bazal kor, büyük yüzey antijeni (L) ve majör yüzey antijeni (S) ve enhancer I / X geni promotorları tarafından kontrol edilir(9). Şekil 1'de HBV genomunun organizasyonu ve sentezlenen RNA'lar görülmektedir.



Şekil 1 HBV NİN GENOMİK ORGANİZASYONU VE SENTEZLENEN RNA LARI

HBV GENOTİPLERİ VE SEROTİPLERİ

HBV'nun genotiplerini S geninde % 4, diğer tüm genom dizisinde de % 8 oranında görülen varyantlar olarak tanımlanır. Bu genotipler sırası ile A'dan H harfine kadar 8 farklı tip olarak isimlendirilmişlerdir. Genotiplerin dünyadaki tahmin edilen prevalansı genotip A için % 35; genotip B için % 22; genotip C için % 31; genotip D için % 10 ve geriye kalanlar için % 2 civarındadır. Türkiye'de ise D genotipi baskındır. HBV, HBs antijeninin yapısal farklılıklarına göre ise serotiplere ayrılmıştır. Bu serotipler 9 adet olup her biri ortak "a" determinantı taşımaktadırlar. Virusun coğrafi dağılımı ile genotip arasında uyumluluk görülmektedir. Farklı genotipler ile ko-enfeksiyonun mümkün olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Genotipler arasında rekombinasyon olasılığı da mümkündür (10). Türkiye'de

yapılan bir çalışmada akut hepatit B etkenlerinin tümünün genotip D olduğu tesbit edilmiştir(3).

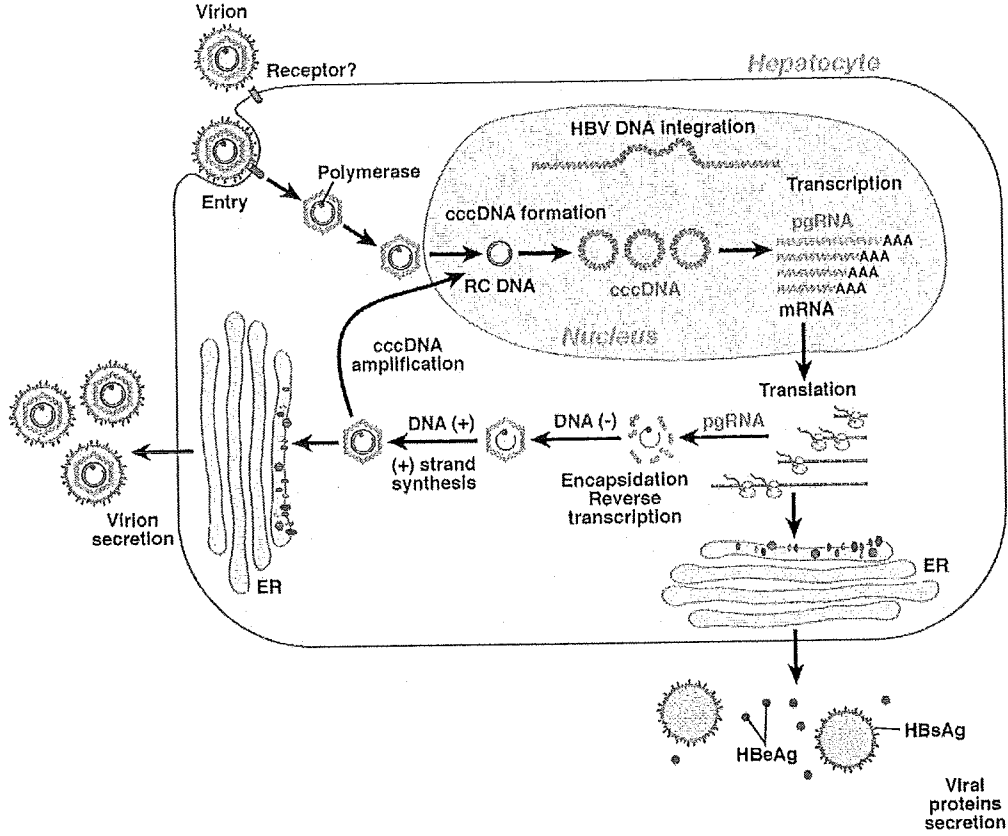
VİRAL REPLİKASYON VE HBV YAŞAM DÖNGÜSÜ

HBV'nun insan karaciğer hücrelerine tutunma ve giriş için kullandığı yüzey proteinleri henüz bilinmemektedir. Ancak LHBs Ag'nin amino terminalinde bulunan pre-S1 bölgesinin hedef hücreye tutunmada en önemli göreve sahip epitoplari içerdiği saptanmıştır. Ayrıca HBV zarf proteinlerini bağlayan çeşitli hücrese l ligandlar da tesbit edilmiştir. Viral alt tiplere göre 109 ya da 120 aminoasit büyüklüğünde olan pre-S1 bölgesinde tutunma aktivitesinden sorumlu kısım 21-47. aminoasitler olarak tanımlanmış, tutunma için bu bölgenin var olmasının yeterli ve gerekli olduğu anlaşılmıştır. Daha sonra yapılan mutageniz çalışmalarında LHBs antijeninin bu epitopu içerisinde yer alarak hücreye tutunmada kritik rol oynayan QLDPAF dizisi tanımlanmıştır. Bu dizi başka birçok virus, bakteri ve mikroorganizmanın yapısında olup aynı amaçla kullanılmaktadır. HBV'nun doku organ özgülüğünün belirlenmesinde ise geri kalan pre-S1 kısımlarının etkili olduğu bilinmektedir. X proteininde de pre-S1'e benzer bir epitopun bulunması ve bu bölgenin de benzer şekilde QLDPAR dizisi içermesi, X proteininin de tutunmada rol aldığını akla getirmektedir. Ancak in-vitro çalışmalarda virusun karaciğer hücresine tutunmasında tüm yüzey proteinlerinin aynı derecede aktivite gösterdiği de görülmüştür. Tutunma gerçekleşikten sonra virus zarfı ve hücre membranı arasında füzyon meydana gelir ve nükleokapsid sitoplazmaya salınır. Sitoplazmada enzimatik yollarla kapsid parçalanır ve viral genomik DNA ve polimeraz çekirdeğe taşınır (11). HBV virionları genellikle 2 tip DNA taşır. Bunlardan biri daha baskın olan negatif iplik , diğeri ise kısmen tamamlanmış olan pozitif iplikli çembersel DNA (cccDNA) genomudur. Kendi kendine hazırlık mekanizması ile oluşmuş az miktarda lineer DNA da virion içerisinde bulunabilir. Replikasyon döngüsünün başlaması ile bu 2 form DNA da cccDNA'ya dönüştürülür. Genom replikasyonunun ilk ve en önemli aşaması burasıdır. Karaciğer hücresinde bu olay, hepatosite virüs inokülasyonundan sonraki ilk 24 saatte olmaktadır. Negatif DNA ipliğine kovalent olarak bağlanan revers transkriptaz yerinden ayrılarak pozitif iplikcik tamamlanmakta, daha sonra bu 2 zincirin ligasyon reaksiyonu ile birbirine bağlanması ile cccDNA oluşmaktadır. Bu aşamalarda hücrese l DNA tamir enzimleri ile viral revers transkriptaz enziminin birlikte rol aldığına, ayrıca virüs özyapısının çekirdeğe taşınmasında, özyapı ve revers transkriptaz proteinlerinin etkili olduğuna işaret eden veriler bulunmaktadır. cccDNA, HBV'nun hepatositlerde kalışında

etkili olan moleküldür ve antiviral tedavi sonrasında izlenen viral reaktivasyonlardan sorumludur. Nükleer membrandan viral DNA'nın çekirdeğe ulaşması sonrasında virusa ait transkriptazlar ve hücrel RNA polimerazlar tarafından cccDNA oluşumu başlatılmaktadır. Viral RNA'lar olan 3,5 kb RNA'dan nükleokapsid proteini ya da HBcAg, HBe antijeni ve viral polimeraz; 2,4 ve 2,1 RNA'dan zarf proteinleri; 0,7 kb RNA'dan da X proteini sentezlenir. Bu esnada hücrel transkripsiyon faktörleri de rol oynar. 3,5 kb RNA ek olarak viral genomik DNA için kalıp olan pre-genomik RNA olarak da işleme alınır. Viral genomik DNA'nın sentezi için revers transkriptaz pre-genomik RNA'nın 5' ucuna bağlanır ve bu kompleks nükleokapsid içine paketlenir; böylece nükleokapsid içinde revers transkripsiyon ve viral DNA'nın sentezi başlar. Burada DNA sentezini viral revers transkriptaz başlatır. Negatif iplikli DNA oluşuktan sonra revers transkriptaz enzimi Ribonükleaz (RNaz) H aktivitesi ile pre-genomik RNA'yı parçalar ve pozitif ipliğin sentezine başlar. Nükleokapsid partikülleri, kısmi çift iplikli DNA molekülü oluştuğunda endoplazmik retikulum içerisinde tomurcuklanarak zarf yapılarını kazanmalarına imkan sağlayacak olgunlaşma sürecine girerler. Oluşan nükleokapsidlerin bir kısmı hücre çekirdeğine geri dönerek cccDNA kopya havuzunu artırmak için görev alırlar. Özyapı proteinlerinin LHBs Ag amino terminali kısmına bağlanmaları partiküllerin endoplazmik retikulumdan tomurcuklanmasına neden olur, üç zarf proteinini de içeren virionlar endoplazmik retikulumdan golgi kompleksine taşınır. Bu esnada zarf proteinlerinin glikozilasyonu tamamlanır ve olgun virion kan dolaşımına salınır. Şekil 2'de HBV'nun yaşam siklusu ve replikasyonu şematik olarak gösterilmektedir (11).

HBV GENOM MUTASYONLARI

İnsan immün yetersizlik virusu ve hepatit C virusu gibi, HBV da yüksek düzeyde virion üretimi ve yıkımı ile karakterizedir. İlaçlar ya da immün sistem tarafından replikasyon baskılanmadığı takdirde, günde yaklaşık 10^{11} virion meydana geldiği tahmin edilmektedir. Revers transkriptaz enziminin düzeltici fonksiyonu olmaması, yüksek virion üretimi ile bir araya geldiğinde replikasyonda yüksek düzeyde hata oluşmasına neden olmaktadır. HBV polimerazının yıllık hata oranının nükleotd başına 1,4-5/10.000 olduğu hesaplanmıştır. Bu oran retroviruslarla eşit, ancak diğer DNA viruslarından 104 kat yüksek gibi görülmektedir. Mutasyon olduğu durumlarda infekte kişilerde genetik olarak birbirine yakın ancak birbirinden farklı olan ve farklı özellikler taşıyan varyantların bir kombinasyonu var olmaktadır. Konaktaki vahşi virustan daha avantajlı bir özellik oluşur ise mutant virus baskın hale gelmektedir.



Şekil 2: HEPATİT B REPLİKASYON DÖNGÜSÜ

BAZAL KOR PROMOTER/PREKOR VE KOR BÖLGELERİNDE İZLENEN MUTASYONLAR

Düşük miktarda ya da hiç olmayan HBeAg ekspresyonu ile ilişkilendirilen 2 önemli mutasyon tanımlanmıştır. Bunlardan ilki, prekor bölgesinde 1896. nükleotidde triptofan kodlayan 28. kodon olan TGG kodonunda sondaki guaninin adenine değişimi ile TGA stop kodonunun oluşmasıdır. Bu stop kodonu HBeAg ekspresyonunu durdurmaktadır. Buna rağmen HBV kor antijen üretimi ve HBV replikasyonu devam etmektedir. 1896. nükleotidde aynı bölgede 1858. pozisyonda bulunan nükleotidin baz çifti oluşturdukları, bu yapının da virusun replikasyonunda görev aldığı bilinmektedir. HBV'nun B, D, E, G ve bazı C genotiplerinde 1858. nükleotid timidin şeklindedir ve mutasyon sonucu oluşan stop kodonu A-T baz çifti oluşturarak fonksiyonel sekonder yapıyı stabilize etmektedir. A, F ve bazı C genotiplerinde ise bu pozisyonda timidin yerine sitozin bulunmakta bu nedenle prekor stop kodonu mutasyonu bu genotiplerde nadiren izlenmektedir (12).

Prekor mutant HBV en çok Akdeniz Avrupası ve Asya'da bulunur. Prevelansı tam belirgin değildir. Ancak Asya ve Akdeniz Avrupası'nda % 40-80 arasında tahmin

edilmektedir. Genotip A bölgelerinden daha az rapor edilmektedir. Türkiye’de de sık görülmektedir (13).

Diğer bir mutasyon grubu da bazal kor promotör bölgesini etkilemekte ve prekor ve kor RNA’larının transkripsiyonunda azalma şeklinde ortaya çıkmaktadır. A1762T ve G1764A şeklinde oluşan bu mutasyonlar ikisi birlikte olduğunda HBe antijeni sentezinde azalmaya ve viral yükte artışa neden olmaktadır. Diğerinin aksine bu mutasyon tipi genotip A ile infekte kişilerde daha sık ortaya çıkmaktadır. Bazal kor promotör bölgesinde oluşan mutasyonlar karaciğere özgül transkripsiyon faktörlerinin bağlanması azalmasına dolayısıyla daha az prekor ve kor transkriptinin ve kor proteininin oluşmasına neden olurlar. Ancak pregenomik RNA transkripsiyonunu ya da polimeraz / kor proteinlerinin translasyonunu etkilemezler. Kor geninde izlenen mutasyonlar ve prekor stop kodonu mutasyonlarının varlığı, HBe antijeni sentezi ve karaciğer hastalığının aktivitesi ile ilişkilidir (14).

X BÖLGESİ MUTASYONLARI

Bazal kor promotör bölgesinin X geni ile çakışmasından dolayı A1762T ve G1764A kor promotör mutasyonları X geninde de değişikliklere sebep olur. Bazal kor promotör bölgesinde izlenen tüm delesyon ve insersiyonlar X geninde çerçeve kayması oluşturarak dallı ve kısa X proteinlerinin sentezlenmesine sebep olmaktadır. Oluşan mutant X proteinleri HBx antijeninin transaktivasyon aktivitesini göstermemektedirler.

ZARF BÖLGESİ MUTASYONLARI

HBV genomunun en yüksek düzeyde heterojenlik izlenen bölgesi pre-S bölgesidir. Pre-S2 proteinlerini sentezleyemeyen viruslar özellikle asemptomatik taşıyıcılarda baskın popülasyonlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Polimeraz proteininin bağlayıcı boşluk bırakıcı bölgesiyle çakışan pre-S2 bölgesi nedeniyle, bölgede oluşan mutasyonlar enzim aktivitesinde önemli değişikliklere neden olmaktadır. Günümüzde uygulanan birçok Hepatit B aşısı HBs antijenini taşımakta, proteinin 99-170. pozisyonlarında yerleşen majör hidrofobik bölgeye karşı oluşan immün yanıt bağısıklığı sağlamaktadır. Yüzey antijeninin 144. ve 145. pozisyonlarında meydana gelen mutasyonlar aşı başarısızlığı ile ilişkilendirilmektedir.

POLİMERAZ BÖLGESİ MUTASYONLARI

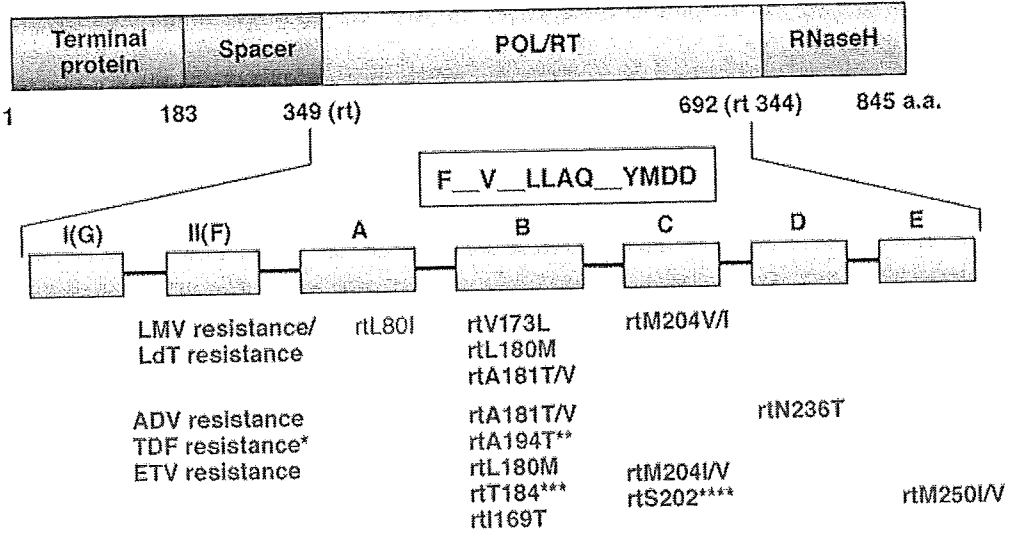
Kronik hepatit B tedavisinde nükleotid/nükleozit analoglarının kullanılmaya başlamasından sonra polimeraz bölgesinin önemi anlaşılmıştır. Bu bölgede mutasyon olan viruslar, tedavi sonucunda diğerlerinin arasından seçilip, ilaç direncinin oluşmasına sebep olmuştur. Sonuç olarak; ilaç tedavisine direnç gösteren bu etkenlerde, polimeraz bölgesinde mutasyon olduğu ortaya koyulmuştur(15).

LAMİVUDİN DİRENCİNE NEDEN OLAN MUTASYONLAR

HBV polimerazının primer katalitik bölgesi “revers transkriptaz” enzimidir. Bu enzim A, B, C ve D domainleri içerir. C domaininin rt203-rt206. kodonlarını oluşturan tirozin(Y), metiyonin(M), aspartat(D), aspartat(D) motifinde oluşan mutasyonlar lamivudin direnci ile bağlantılı mutasyonlar olarak bilinmektedir. 204. pozisyondaki metionin aminoasitinin başka bir aminoasit ile değişimine sebep olan mutasyonlar ilacın da etkili olamamasına yol açmaktadırlar(2,10,12,13). Başlangıçta lamivudin direncine yol açan 2 mutasyon bildirilmişti. Bu mutasyonlara revers transkriptazın B domainininin 180. kodonundaki L180M mutasyonları da eşlik ettiği görülmüş ve 3 grup mutasyon tanımlanmıştır.

- a) 1. grup mutasyonlar : M204V ve L180M mutasyonlarının birlikteliği
- b) 2. grup mutasyonlar : M204I mutasyonu
- c) 3. grup mutasyonlar : M204I ve L180M mutasyonlarının birlikteliği

Bu gruplardan 1. grup mutasyonların daha sık olduğu, 2. grup mutasyonların ise daha erken görülmekte olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir(16). Bu mutasyonlara her geçen gün yeni mutasyonlar eklenmektedir. İn vitro ortamda yapılan bir çalışmada YMDD'nin 7 değişik motifte mutasyonu olduğu ve bunların özellikleri karakterize edilmiştir (17). Bu motifler YIDD, YVDD, YADD, YLDD, YKDD, YRDD ve YTDD olarak gösterilmiştir. Bu oluşan mutant tiplerden YADD, YKDD ve YTDD motiflerinin HBsAg sekresyonu yapamadıkları yani oluşan mutasyonun enfektif olmayan bir virusa yol açtığı gösterilmiştir(18). Yine bu mutant tiplerden YKDD, YRDD ve YTDD motiflerine lamivudinin uygulanabilir olmadığı gösterilmiş, YADD ve YLDD'ye lamivudinin replikasyonu inhibe edici etki ettiği görülmüş, YIDD ve YVDD motiflerinin ise lamivudine dirençli olduğu tespit edilmiştir(19). Diğer ilaç mutasyonları şekil 3 de gösterilmiştir.



*rtA181T/V and/or rtN236T cause reduced sensitivity
**ATL association with rtL180M+rtM204V (to be confirmed)

S/A/I/L/G/C/M *C/G/I

Şekil 3 ANTİVİRAL İLAÇ DİRENÇ MUTASYONLARI

PATOGENEZ

Virüsün replikasyonu predominant olarak karaciğerde olmakla beraber lenfositlerde, dalakta ve pankreasta da olabilir. Kronik hepatit B de bağışıklık sistemi, virüsle enfekte karaciğer hücrelerini ortadan kaldırmaları temel mekanizmadır. HBV sitopatik olmadığı için kronik zedelenmenin konağa ait faktörlerle ilişkisi olması gerekir. Ancak, T ve B lenfositleri ile konağa ait diğer etkenlerin önemi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Hepatit B, diğer hepatit virüslerinin aksine nonsitopatojenik bir virüstdür ve immün mekanizmalarla hasar yaptığı düşünülmektedir. Akut enfeksiyon sürecindeki ilk adım, hepatositlerin HBV ile enfeksiyonudur ve bu enfeksiyon sonucu hücre yüzeylerinde viral antijenler belirir. Bu viral antijenlerin en önemlileri viral nükleokapsid antijenleri; HBcAg ve HBeAg'dir(20). Bu antijenlerin class I major histokompatibilite (MHC) proteinleri ile kombinasyonu hücreyi sitotoksik Thücrelerinin lizisi için hedef haline getirir. Konağın HBV ye karşı gösterdiği hücrel immün yanıt karaciğer hasarına neden olmaktadır. CD8+ sitotoksik T lenfositleri aracılığı ile direk hücre ölümü meydana gelir. Kişilerin immün yanıtları farklı olduğundan bazıları virüsten başarıyla temizlenirken bazılarında ise bu olmaz(21). Hem hücre hasarını önlemek hem de virüsün yok edilmesini sağlamak için işlevsel bir immün sistem gereklidir. Karaciğer hasarının şiddeti ve ağırlığı immün yanıtın şiddeti ile doğru orantılıdır. Enfekte yenidoğanların immün sistemleri olgunlaşmamış olduğundan % 95'inde enfeksiyon

asemptomatik taşıyıcılık şeklinde gelişirken daha büyük çocuklarda bu oran % 30'lara gerilemektedir. Enfeksiyonun seyrini vücudun virüse karşı immün yanıtı belirlemektedir. İmmün sistem aracılığı ile akut ve kronik nekroinflamatuvar karaciğer hastalığına neden olur. HBV enfeksiyonunda bazı ekstrahepatik organlarda immün mekanizmalar ile hasar gelişebilir. Bazı hastalarda HBsAg ihtiva eden dolaşan immünkompleksler olabilir; HBV enfeksiyonları sırasındaki poliartrit, glomerülonefrit, mikst tip kriyoglobülinemi ve Guillian-Barre sendromu ile immünkompleksler arasında bir ilişki bulunmuştur(22)

KRONİK HEPATİT B'DE KLİNİK

HBV ile enfeksiyon sonrası, 6 aydan uzun süren HBsAg pozitifliği kronik hepatit B'ye işaret eder. Bu durum, karaciğerde viral replikasyonun devam ettiği, hem karaciğer hem de kanda titreleri farklı olmak kaydı ile viremi olduğu anlamına gelmektedir. Karaciğerde hepatosit ölümüne eşlik eden inflamatuvar infiltratların varlığı, kronik viral hepatit için karakteristiktir. HBV enfeksiyonunun kronikleşme olasılığı, enfeksiyonun bulaşma yolu ve bulaşma yaşına göre değişkenlik gösterir. Yüksek endemik alanlarda enfekte anneden yenidoğana perinatal bulaş ve erken çocukluk döneminde HBsAg pozitif aile üyelerine temas sonucu horizontal enfeksiyon HBV bulaşındaki ana yolları oluşturur. Enfeksiyon yenidoğan ve süt çocukluğu döneminde kazanıldığında % 95 civarında kronikleşme görülürken, ilk 6 yaş içerisinde kazanıldığında ise kronikleşme oranı % 30 civarına inmektedir. Erişkin dönemde enfekte olunması durumunda kronikleşme riski % 5-10 civarında görülmektedir(23).

Kronik HBV enfeksiyonu oluştuğunda 3 faz bulunmaktadır :

- 1) İmmün tolerans fazı
- 2) İmmün klirens fazı
- 3) İnaktif faz

İmmün tolerans fazında virusla enfekte hepatositlere karşı yeterli immün cevap oluşmadığından, virus yüksek miktarda çoğalmakta ancak hepatositlerde hasar oluşmadığından transaminaz yüksekliği saptanmamaktadır. Bu dönemde HBeAg pozitif olarak saptanır (24).

İmmun klirens döneminde ise aktif hepatit bulunur. Serum transaminaz düzeyleri artmıştır hatta bir komplikasyon olarak hepatik dekompanseasyon meydana gelebilir. Buradaki hepatit gelişimi konağın HBV'ne karşı immün cevabının sonucudur. Transaminaz düzeyi ne kadar yüksek ise immün cevabın şiddeti ve hepatosit hasarı da o kadar yüksektir. Bu olayın devamında anti-HBe oluşumu ile HBeAg negatifleşmesi ve HBV-DNA negatifleşmesi görülebilir. Buna "HBeAg serokonversiyonu" denir. HBeAg serokonversiyonu olması % 85 klinik remisyon anlamına gelir. Burada inaktif faz oluşur(24). İmmun klirens döneminde prekor mutasyonu olur ise HBeAg üretilmez. Ancak virus replikasyonu devam eder ve HBV-DNA artar. Aminotransferaz düzeyleri de yükselir ise HBeAg negatif kronik hepatit B söz konusu olur.

Kronik viral hepatitli hastaların büyük çoğunluğu asemptomatiktir, bu nedenle hastalar genellikle infekte olduklarının farkında değildirler. Bazı hastalarda halsizlik, yorgunluk, bulantı, üst abdominal ağrı, kas ve eklem ağrıları gibi nonspesifik şikayetler oluşabilir. Bununla birlikte anksiyete başta olmak üzere bir takım psikiyatrik semptomlar, endişe hali, düşüncelerini yoğunlaştırmada güçlük, kas gerginliği, uyku bozuklukları ve depresyon görülebilir. Bu bulguların hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkilediği, mental ve genel sağlık skorlarında normal insanlara göre daha düşük skorlara sahip oldukları gösterilmiştir (24).

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

Kronik hepatit B'li olgularda transaminaz düzeyleri yüksek ve viral replikasyon göstergeleri pozitif saptanıyor ise hastalık ilerliyor anlamına gelir. Bu ilerlemenin en önemli komplikasyonları siroz, portal hipertansiyon, asit, özefagus varis kanaması, hepatorenal sendrom ve hepatoselüler karsinom olarak sıralanabilir. İlerlemekte olan hastaların % 15-20'sinde 5 yıl içerisinde siroz gelişimi, sirozlu hastaların da % 20'sinde hepatoselüler karsinoma saptanır.

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

Kronik hepatit B hastalarının %1-10 kadarında yıllık spontan HBeAg / AntiHBe serokonversiyonu görülür ve genellikle karaciğer hastalığında alevlenme ile birlikte. HBsAg kaybı görülme olasılığı ise yıllık % 1-2 civarındadır.(24)

HBV ENFEKSİYONUNUN TANISI

SEROLOJİK TANI YÖNTEMLERİ

HBV'nun serolojik tanısı, virus tarafından kodlanan antijen ve bu antijenlere karşı konak savunma mekanizması tarafından oluşturulmuş antikorların saptanmasına dayanır. HBsAg'ye karşı anti-HBs, HBeAg'ye karşı anti-HBe ve serumda serbestçe dolaşmayan HBcAg'ye karşı anti-HBc saptayabildiğimiz belirteçlerdir (22). Bütün serolojik göstergeler negatif olmasına karşılık, tek başına anti-HBc IgG pozitifliği şu durumlarda saptanabilir

- Hepatit B enfeksiyonu iyileşmiş ancak serum anti-HBs düzeyi saptanamayacak kadar azalmış olan kişiler.
- HBsAg düzeyi saptanamayacak kadar düşük olan kronik enfeksiyonlu kişiler.
- Uzamış pencere dönemi.
- Yalancı pozitiflik.
- Pasif olarak anti-HBc IgG kazanılması(25).

Tablo 1'de hastalığın dönemlerine göre saptanabilen antijen ve antikorlar belirtilmektedir.

HBsAg	Anti HBs	Anti HBc	HBeAg	Anti HBe	Yorum
+	-	IgM	+	-	Akut HBV
+	-	IgG	+	-	Kronik HBV Bulaştırıcılık yüksek replikasyon aktif
+	-	IgG	-	+	Geç akut veya kronik HBV bulaştırıcılık düşük replikasyon inaktif
-	-	IgM	+/-	+/-	Akut HBV enfeksiyonu pencere dönemi
+	-	IgG	-	+/-	HBsAg taşıyıcı inaktif hepatit
-	+	IgG	-	+/-	İyileşmiş HBV enfeksiyonu doğal immünite
-	+	-	-	-	Akut immunizasyon aşılama

Tablo 1 HBV ENFEKSİYONU SEROLOJİK ANTİKOR VE ANTİJEN DURUMLARI

MOLEKÜLER TANIM YÖNTEMLERİ

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

- a) Serolojik tanının yetersiz kaldığı ve moleküler yöntemlerle HBV-DNA’sının araştırıldığı durumlar:
- b) Tedavi etkinliğinin izlenmesi.
- c) Mutant virusun tanısı.
- d) Antiviral ilaç direncinin saptanması(26).

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

- HBsAg negatif HBV enfeksiyonu
- HBeAg negatif / anti-HBe pozitif HBV enfeksiyonu
- Anti-HBc pozitif HBV enfeksiyonlarının durumlarında kullanılır (27).

KRONİK HEPATİT B NİN GÜNCEL TEDAVİSİ

Kronik HBV enfeksiyonlu hastanın ilk değerlendirilmesinde kapsamlı bir fizik muayene yapılmalı ve hastalık öyküsü irdelenmelidir. Özellikle koinfeksiyon açısından risk faktörleri, alkol kullanımı, ailesel HBV enfeksiyonu ve karaciğer kanseri hikayesi sorgulanmalıdır. Karaciğer hastalığının değerlendirilmesi için karaciğer fonksiyon testleri, HBV replikasyon belirteçleri ve risk tarif edenlerde HIV, HDV ve HCV koinfeksiyonu

araştırılması için gerekli laboratuvar testleri istenmelidir. Eğer geçirilmemiş ise hepatit A için aşı yapılmalıdır.

İlk değerlendirmeden sonra bazı hasta gruplarında tedaviye başlamadan izlemek gerekebilir. Bu hastalar; HBeAg pozitif, HBV-DNA'sı 20.000 IU/mL'den fazla ve ALT düzeyi normal olan grup ve inaktif HBsAg taşıyıcıları grubu olarak iki şekilde sınıflandırılabilir. Her iki gruptaki hastalarda da hepatoselüler karsinom için tarama yapılması gereklidir (20,21). Birinci gruptaki hastalar her 3-6 ayda bir ALT düzeyleri bakılarak izlenirler. Eğer ardışık 2 ALT seviyesi normalin üst limitinden 1-2 kat yüksek, yaşı da 40'ın üzerinde ise karaciğer biyopsisi yapılır. Biyopside orta / şiddetli inflamasyon ve belirgin fibroz gösteriyor ise tedavi başlanması için değerlendirilir. Ardışık 2 ALT düzeyi normalin üst limitinin 2 katından daha yüksek olan hastalar serokonversiyon açısından değerlendirildikten sonrad direkt biyopsi yapılarak tedavi başlanır.

İnaktif HBsAg taşıyıcıları ise ilk yıl her üç ayda bir ALT düzeyleri bakılarak takip edilir. İlk yıl ALT normal seviyelerde seyretti ise takip aralıkları 6-12 aya çıkarılabilir. Eğer ALT düzeyi normalin üst sınırından 1-2 kat fazla görülür ise diğer karaciğer hastalığı nedenleri araştırılır ve HBV-DNA düzeyi tekrar bakılır. HBV-DNA düzeyi 2000 IU/mL'nin üzerinde ve ALT düzeyleri aynı seviyelerde devam eder ise karaciğer biyopsisi için değerlendirilir. Biyopside belirgin fibroz veya orta / şiddetli inflamasyon görülür ise tedavi başlanması için değerlendirilir.

Kronik hepatit B tedavisinin hedefleri; HBV replikasyonunu durdurmak veya belirgin oranda azaltmak, siroz, karaciğer yetersizliği ve hepatoselüler karsinoma gelişimini önlemektir. HBV-DNA'nın azalması ya da negatifleşmesi birincil hedef olarak görülmektedir. Bunun yanı sıra ALT seviyesinin normale dönmesi ve histolojik iyileşme sağlanması diğer hedefler arasındadır. Eğer HBeAg pozitif ise HBeAg'nin negatifleşmesi ve anti-HBe serokonversiyonu diğer bir hedef olarak sayılabilir. Özellikle interferon dışı antiviral tedavilerin sonlandırılma kararında HBeAg'nin negatifleşmesi önemli bir noktadır. HBsAg negatifleşmesi son derece nadirdir ve bir hedef olarak gösterilemez. Kronik hepatit B'nin tedavisi planlanırken tedavi öncesi bazı laboratuvar verilerine dikkat etmek gerekir. Çünkü tedavi öncesi hastalığın klinik dönemine göre kişinin ne şekilde tedavi edileceği planlanmaktadır. Tablo 2'de kronik hepatit B enfeksiyonunun önerilen güncel tedavisi özetlenmektedir (28).

	IFN alfa	LAMUVİDİN	ADEFOVİR	ENTECAVİR	TELVUVIDİN	TENOFOVİR
Endikasyon						
HBeAg+, normal ALT	Endike değil	Endike değil	Endike değil	Endike değil	Endike değil	Endike değil
HBeAg+, kronik hepatit	Endike	Endike	Endike	Endike	Endike	Endike
HBeAg-, kronik hepatit	Endike	Endike	Endike	Endike	Endike	Endike
Tedavinin süresi						
HBeAg+, kronik hepatit	12 ay	≥1	≥1	≥1	≥1	≥1
HBeAg-, kronik hepatit	1 yıl	>1	>1	>1	>1	>1
Kullanımı	Subkutan	oral	oral	oral	oral	oral
Yan etki	fazla	nadir	nefrotoksik	nadir	nadir	nefrotoksik
Direnç	yok	1 yıl %20 5 yıl %70	1 yıl yok 5 yıl %29	5 yıl %1	2 yıl %25	5 yıl yok

Tablo 2 KRONİK HEPATİT B GÜNCEL TEDAVİDE KULLANILAN İLAÇLAR

TEDAVİDE VİRAL DİRENÇ

DİRENÇ İNSİDANSI VE PREVALANSI

LMV direnci, tedavinin seyri boyunca ilerleyici bir şekilde artar. Öyle ki, hastaların %14-32'si tedaviden 1 yıl sonra; %80'inden fazlası ise 48 ay sonra ilaca direnç kazanır. LdT dirençli HBV'nin görülme oranı, LMV'den düşük olmakla birlikte, yine de önemli bir orana sahiptir. LdT HBeAg pozitif olan hastalarda kullanıldığında 1 yıl sonra %4.4'ü ve 2 yıl sonra %21'inde genotipik direnç gelişmiştir. Aynı hasta grubunda HBeAg negatif olan hastalarda bu oran 1 yıl sonra %2.7 ve 2 yıl sonra %8.6 olarak bulunmuştur(29,30).

ADV dirençli virüslerin seleksiyon oranı daha düşük olmakla birlikte, 2 yıllık tedavi sonrasında HBeAg negatif KHB hastalarının yalnızca %2'si direnç kazanır. Ancak 4-5 yıllık ADV monoterapisi sonrasında, hastaların %30'unda direnç görülür (31). LMV dirençli

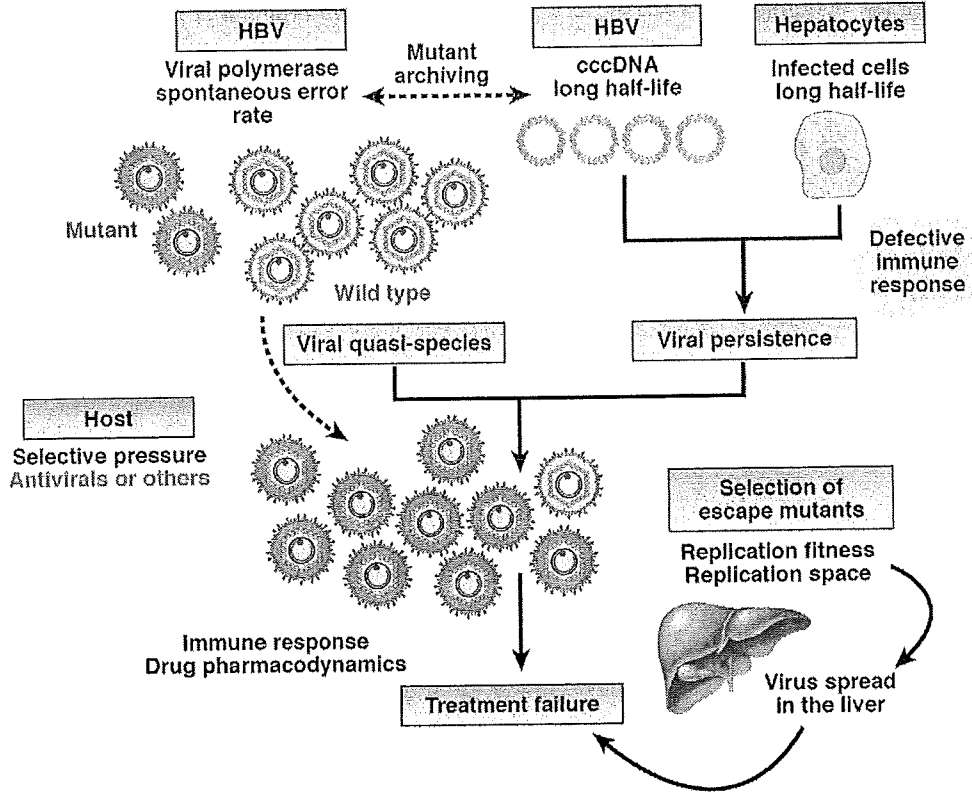
hastalara ADV verildiğinde, 12 aylık tedavi sonrasında hastaların %20'sinde genotip analizleri ile primer ADV direnci saptanmıştır(32). Son yıllarda yapılan bir çalışmada 72. haftaya kadar TDF ve emtrisitabin kombinasyonu verilmiş ve 96. haftaya kadar tenofovir tek başına verilen hastaların direnç kazanmadıklarını ortaya konmuştur (34).

ETV ile yapılan çalışmalar da, daha önce tedavi verilmemiş hastalarda 1 yıllık tedavi sonrasında (%0.1) çok düşük bir genotipik direnç oranı elde edildiğini ortaya koymuştur. Bu oran tedavinin 2. yılında %0.4; 3. yılında %1.2; 4. yılında %1.2; 5. yılında %1.2 ve 6. yılında %1.2 olarak bulunmuştur(35). Buna karşın, daha önce LMV ile tedavi edilen hastalarda kümülatif genotipik direnç oranı 1. yılda %6; 2. yılda %14; 3. yılda %32 ve 6. yılda %60 olarak bulunmuştur(36).

DİRENÇ MEKANİZMASI

Enfekte hücrelerdeki HBV klirensinin başlıca belirleyicisi, kovalent olarak kapalı dairesel DNA (cccDNA) adı verilen bir replikatif viral DNA türüdür (37,38). Kronik HBV enfeksiyonu sırasında, enfekte hücrelerde uzun yarılanma ömrü ile hepatosit nükleuslarında cccDNA bulunur(39). NA antiviral tedavisinin ilk cccDNA oluşumunu önleyemediğini gösteren ve tedavi sırasında karşılaşılan inatçı vireminin yeni hücreleri enfekte edebileceğini öne süren çalışmalar mevcuttur(40,41). HBV cccDNA, viral genom replikasyonunun reaktivasyonu için bir depo görevi görür ve antiviral tedavisinin sona ermesinden sonra viral enfeksiyonların tekrarlamasına veya immünosupresyon sonrası KHB'ye yol açar. Ayrıca, hepadnavirüslü dağ sıçanı modeli üzerinde yapılan bir çalışmada, ilaç direnci mutasyonların cccDNA'da kaydedildiği ve bu sayede çapraz direnç gösteren ilaçlar ile bu mutasyonların hızlı bir şekilde hedef alınabileceği öne sürülmüştür(42). Bu nedenle, cccDNA'nın stabilitesi ve yeniden doldurulması, mevcut antiviral ajanlar ile KHB enfeksiyonunun eradike edilmesinin önünde büyük bir engel teşkil etmektedir(43).

Antiviral tedavi sırasında ilaç dirençli mutasyon seleksiyonunda rol oynayan farklı mekanizmalar mevcuttur(44). Selektif NA tedavi baskılamasının olması durumunda, genetik açıdan farklı karma bir yapının replikasyon üstünlüğü oluşur. Yeni oluşmuş veya mevcut mutasyon, bir varyanta selektif üstünlük sağlıyorsa, karaciğere yayılmaya daha yatkın ve daha hızlı hareket eden yeni bir virüs nesli meydana gelir. Bu sayede mutasyonların sayısı artar ve kullanılan antiviral ilaca rağmen, karaciğerdeki dominant suş olur(45,46). Şekil 4.



Şekil 4 HBV İLAÇ DİRENÇLİ MUTASYONLARIN SELEKSİYON VE OLUŞUM MEKANİZMASI.

NUKLEOZİD ANALOGLARININ POLİMERAZ MUTASYONLARI

	L180M	A181V/T	T184G/S	S202I	M204V/I	N236T	M250V
LAM	+	+	+		+		
LdT	+				+		
ADV		+				+	
TDF		+			+	+	
ETV	+		+	+	+		+

Şekil 5 ORAL ANTİVİRAL AJANLARDA DİRENÇ DURUMLARI

DİRENCİN KLİNİK ÖZELLİKLERİ

TANIMLAR

KHB nedeniyle NA tedavisi verilen hastalar, tedavi sırasında virolojik yanıt ve atak açısından; tedaviden sonra ise yanıt süresi ve viral relaps açısından yakından izlenmelidir. Serum HBV DNA, tedavi sırasında her 3 ayda bir kontrol edilmelidir (51). Antiviral KHB tedavisinin başarısız olması, spesifik mekanizmalara dayanan farklı yönleri işaret edebilir. Bu nedenle, tedavinin belirlenmesi açısından birtakım klinik özellikler taşır. Ayrıca, Primer yanıtızsızlık ve kısmi virolojik yanıt ve antiviral ilaç direncine bağlı virolojik atak arasındaki farkı ayırt etmek önemlidir.

PRİMER YANITSIZLIK

Tüm hepatit B tedavi seçenekleri için 12 haftalık tedavi sonrasında viral yükte 1.0 log₁₀ IU/mL'lik düşüşün sağlanamaması, primer yanıtızsızlık olarak tanımlanır (52,53). Primer yanıtızsızlığın nedeni, hastanın tedaviye uyum sağlayamaması veya ilacın antiviral etkinlik sergileyememesi olabilir. Konak farmakolojik etkisi ve/veya hasta uyumunun sağlanması ile suboptimal yanıt elde edildiği gösterilmiştir. Bu nedenle, 12. hafta, tedavinin etkinliğinin belirlenmesinde ve hastanın tedaviye gösterdiği uyumun değerlendirilmesinde önemlidir.

KİSMİ YANIT

Kısmi yanıt, viral yükün belirli bir eşik değerine düşürülememesidir. Eşik değeri, karaciğer histolojisinin iyileşmesi ve minimum direnç riski olarak tanımlanır(54). Güncel Avrupa Karaciğer Çalışmaları Derneği Klinik Uygulama Kılavuzu, tedavi sırasında saptanamayan bir HBV DNA düzeyi elde edilmesini önermektedir. Bu nedenle kılavuzda kısmi yanıt, tedavi sırasında yapılan gerçek zamanlı PCR tahlilinde saptanabilir HBV DNA düzeyi olarak tanımlanmıştır (55).

Tedavinin 24. haftasında saptanan viral yük, LdT veya LMV ile tedavi edilen hastalarda ilaç direncinin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir(56). Başlangıç HBeAg düzeylerinden bağımsız olarak, tedavinin 24. haftasında daha düşük viral yüke sahip olan hastalarla kıyaslandığında, viral yükün >1000 kopya/mL (~200 IU/mL) olduğu hastalarda, tedavinin 2. yılında daha yüksek bir direnç oranı gözlemlenmiştir(57). lamivudin ve telbivudinin 24 haftasında HBV DNA pozitifse tedavi değiştirilmelidir.

Diğer nükleozid analoglarına kıyasla (LMV, ETV, LdT veya TDF), ADV'nin de daha yavaş etki ile viremi düzeylerini baskıladığı bulunmuştur. Ayrıca, 192 hafta süreyle ADV ile tedavi edilen HBeAg negatif hastalarda ve 48 haftalık tedavi sonrasında HBV DNA düzeyleri >1000 kopya/mL (~200 IU/mL) olan hastalarda, 192. haftada ADV direnci gelişme riskinin yüksek olduğu da gösterilmiştir. Bu nedenle, ADV tedavisinde direnci öngörmek için zaman dilimi olarak 48. hafta kullanılabilir(58,59).

1 yıllık ETV ve TDF tedavisi sonrasında saptanamayan HBV DNA oranı, sırasıyla HBeAg pozitif hastalarda %67 ve %74; HBeAg negatif hastalarda ise %90 ve %91 oranındadır(60,61). Her iki antiviral ilaç kullanımı ile viral supresyon oranı zaman içerisinde artacağından, tedavinin belirlenme zamanı 1-2 yıl kadardır. özellikle tedavinin başında viral yük oranı çok yüksek olan ve PCR testi ile saptanamayan HBV DNA düzeyine erişmek için daha fazla zaman gerekebilir. Viral yük saptanamayan düzeye eriştikten sonra direnç riskini en aza indirmek için, düşük viremi/plato düzeyleri korunmalıdır.(62).

VİRAL REBAUND

Virolojik atak, HBV tedavisi alan tedaviye uyumlu hastada, sağlanan en düşük virolojik yükte iki kez doğrulanmış en az $>1.0\text{-log}_{10}$ IU/mL'lik artış olarak tanımlanır. Virolojik atak, genellikle ilaca karşı dirençli viral suşların meydana gelmesine bağlı olarak gelişir. İlacın mutasyon profiline göre, viral yük artışı yavaş olabilir; bu da rebound tanısını güçleştirmektedir. Genotipik direnç (viral yükte artış) oluşuktan sonra eğer gerekli önlemler alınmaz ise bunu ALT düzeylerinin artması (biyokimyasal atak) ve karaciğer hastalığının progresyonu (klinik atak) takip eder.

İLAÇ DİRENCİNDE UYGULANACAK TEDAVİ

- LMV direnci: Tedaviye TDF ilave edilir (TDF kullanılmıyorsa, ADV tercih edilir).
- ADV direnci: rtN236T substitüsyonu mevcutsa, tedaviye LMV, ETV veya LdT ilave edilir. rtA181V/T substitüsyonu mevcutsa, tedaviye ETV ilave edilmesi önerilir.
- LdT direnci: Tedaviye TDF ilave edilmesi önerilir (TDF kullanılmıyorsa, ADV tercih edilir).
- ETV direnci: Tedaviye TDF ilave edilmesi önerilir.
- TDF direnci: Bugüne kadar TDF'ye karşı bildirilen bir primer direnç mevcut değildir. Çapraz direnç profilini belirlemek için referans niteliğinde olan bir

laboratuarda genotipleme ve fenotipleme yapılması önerilir. Elde edilen profile göre, tedaviye entekavir, LdT, LMV veya emtrisitabin de ilave edilebilir.

Bazı kombinasyonların uzun süreli güvenliliğine ilişkin yeterli verinin mevcut olmadığı ve ilave tedaviler ile her zaman yeterli viral inhibisyonunun sağlanamadığı gerçeği de unutulmamalıdır.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada karaciğer biyopsisi, biyokimyasal ve moleküler testlerle kronik hepatit B tanısı konulmuş ve antiviral tedavi almamış 18 yaş üzeri 2010 ve 2011 tarihleri arasında gastroenteroloji polikliniğine gelen 71 hastanın sonuçları prospektif olarak değerlendirilmiştir. Tüm hastaların serum kan örneklerinde AST, ALT, Hbe Ag, anti Hbe, HBV DNA bakıldı. HBV DNA ölçülebilir düzeyde olan naive hastalarda tedavi öncesinde lamuvidin direnç profili çalışıldı. Karaciğer biyopsi örneklerinde ISHAK skorlama sitemine göre HAİ ile fibroz skorları belirlendi.

ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLME VE DIŞLANMA KRİTERLERİ.

- Hepatit b yüzey antijeni pozitif ancak anti HCV, delta ve anti HIV testleri negatif saptananlar,
- Hbe Ag negatif, transaminazları hafif yüksek ve HBV DNA 2000 Ü/İ üzerinde bulunanlar,
- Hbe Ag pozitif, transaminazlar iki kat kadar yüksek ve HBV DNA 20000 Ü/İ üzerinde kriterlerini sağlayan hastalar çalışmaya dahil edildi.
- Şu anda tedavi almıyor olsa bile daha önce interferon veya oral antiviral tedavi almış olan hastalar almış oldukları tedavi süresine bakılmaksızın çalışma dışı bırakıldı.

HBV DNA VİRAL YÜK TESTİ.

Serum ya da plazma numunesi ile viral DNA izolasyonu sonrası, Real Time Polimeraz Chain Reaction(RT-PCR) yöntemi ile kantitatif HBV DNA viral yükü saptandı. Bu işlem sırasında kullanılan cihazlar DNA izolasyonu için Cobas Ampliprep Otomatize DNA İzolasyon Cihazı ya da manuel izolasyon kiti olan High Pure Viral Nukleic Acid Kit kullanıldı. RT-PCR aşamasında Cobas Taqman 48 cihazında kantitatif HBV DNA viral yükü saptandı. (Roche Diagnostics,USA sis.)

HBV İLAÇ DİRENÇ TESTİ.

Virus popülasyonunda yüksek oranda bulunan mutasyonların ve yeni mutant şuşların saptanması için ilk aşamada dizi Analizi yöntemi kullanılarak serum ya da plazma numunesi

ile viral DNA izolasyonu sonrası ,thermal cyclers'da gerçekleştirilen iki aşamalı outer ve nested pcr döngüsü işlemi sonucunda dizi analizi için yeterli miktarda PCR ürünü elde edildi. Ürün thermal cyclers'da Hepatit B virüsüne özgü Forward ve Revers primerleriyle, dizi (cycle sequencing) için PCR işlemine tabi tutuldu. Oluşan ürünler dizi analizi cihazında analiz edildi. Sonrasında Hepatit B virüsüne ait 169, 173, 180, 181, 184, 194, 202, 204, 233, 236 ve 250 numaralı kodonlardaki mutasyonlar değerlendirildi. Bu aşamada kullanılan Cihazlar; PCR işlemleri için; GeneAmpPCR 9700 Thermal Cycler Cihazı, dizi analizi için ;Applied Systems HITACHI 3130 Genetik Analizörü kullanıldı.

Virus popülasyonunda bilinen ancak dizi analizinin saptayamayacağı, minör oranda mutasyonların saptanması için ikinci aşamada strip ile revers hibridizasyon yöntemi (İnno Lipa,BELÇİKA) kullanılarak serum ya da plasma numunesi ile viral DNA izolasyonu sonrası, elde edilen DNA thermal cycler cihazında multiplex PCR(yöntem) işlemine tabi tutuldu. Elde edilen PCR ürünlerinde revers hibridizasyon yöntemi ile HBV polimeraz geninin 80, 173, 180/181, 204, 236 numaralı kodonları tarandı ve Hepatit B virüsüne ait mutasyonlar değerlendirildi. Bu işlem sırasında kullanılan cihazlar PCR aşaması için; GeneAmpPCR 9700 Thermal Cycler Cihazı Hibridizasyon aşaması için; Tecan ProfiBlot 48 Cihazı kullanıldı.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Mutasyon saptanan ve saptanmayan hastaların viral yük değerleri ortalama, orta, minimum ve maksimum değerler kullanılarak saptandı. Viral yük değerleri ve diğer parametreler açısından mutasyon saptanan ve saptanmayan ile HBeAg pozitif ve negatif hastalar student t testi ve nonparametrik Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. $P \leq 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. SPSS versiyon 17 yazılımı ile istatistiksel analiz yapıldı.

BULGULAR

Çalışmaya kronik hepatit B tanısı olan ve daha önce hepatite yönelik herhangi bir ilaç tedavisi almayan toplam 71 hasta dahil edildi. Bu hastaların %35'i kadın (25/71) %65'i erkek (46/71) di. Hastaların ortalama yaşı 38 ± 8.2 (24-61) olarak bulundu. Dağılımı tablo 3 de görüldüğü gibi.

CINSİYET	Ortalama yaş	Toplam sayı	Std. Deviation	Minimum	Maksimum	Toplam sayı yüzdesi
KADIN	43	25	10,3	26	61	35,2%
ERKEK	34	46	5,2	24	43	64,8%
Total	37	71	8,5	24	61	100,0%

Tablo 3 CINSİYET VE YAŞ DAĞILIM TABLOSU

MUTASYON ANALİZİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

71 hastanın 8'inde YMDD mutasyonu görüldü (%11.3). Mutasyon saptanan hastaların 4 ünde YIDD (rtM204I), diğer 4 ünde YVDD (rtM204V) mutasyonu vardı. HBeAg pozitif hastaların 3 ü YVDD 1 i YIDD, HBeAg negatif hastaların 3 ü YIDD ve 1 i YVDD olarak saptandı. Aşağıda bu 8 hastanın mutasyonları ile HBe Ag ve HBV DNA durumları özetlenmiştir.

Cinsiyet	HBeAg	HBV DNA	Saptanan mutasyon
ERKEK	Pozitif	105×10^3 U/I	YVDD (rtM204V)
ERKEK	Negatif	97×10^3 U/I	YIDD (rtM204I)
ERKEK	Pozitif	122×10^3 U/I	YVDD (rtM204V)
ERKEK	Negatif	987×10^2 U/I	YIDD (rtM204I)
ERKEK	Pozitif	105×10^3 U/I	YIDD (rtM204I)
KADIN	Negatif	78×10^3 U/I	YIDD (rtM204I)
KADIN	Pozitif	132×10^3 U/I	YVDD (rtM204V)
KADIN	Negatif	68×10^3 U/I	YVDD (rtM204V)

Tablo 4 HASTALARDA SAPTANAN MUTASYON TİPLERİ

Toplam çalışmaya katılan hastaların %32 (23/71) sinde HBeAg pozitif, %68 (48/71) inde HBeAg negatif olarak belirlendi. Buna karşılık mutasyon görülen hastaların %50 sinde HBeAg pozitif diğer %50 sinde HBeAg negatifti. Tüm hasta popülasyonu değerlendirildiğinde HBeAg pozitif hastalarda mutasyon görülme oranı %17 (4/23) iken, HBeAg negatif (anti HBeAg pozitif) hastalarda mutasyon görülme oranı %8.3 (4/48) olarak saptandı. Her iki grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü(p=0.01).

Mutasyon görülmeyen hastaların ortalama HBV DNA viral yükü 117×10^3 U/I, mutasyon görülen hastaların HBV DNA viral yükü 100×10^3 U/I olarak saptandı. Mutasyon saptanan ve saptanmayan hastalar HBV DNA viral yükü açısından karşılaştırıldığında mutasyon saptanmayan hastaların viral yükü bir miktar fazla olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı(p=0.27).

HBVDNA		
Mutasyon	Ortalama HBV DNA	Hasta sayısı
YOK	117.372 U/I	63
VAR	100.900 U/I	8
Total	115.516 U/I	71

Tablo 5 MUTASYON OLAN VE OLMAYAN HASTALARDA HBV DNA DÜZEYİ

Mutasyon görülmeyen hastaların ortalama ALT değerleri 68 ± 23 U/L, mutasyon görülen hastaların ortalama ALT değerleri 65 ± 27 U/L olarak saptandı. Mutasyon görülen ve görülmeyen hasta grupları ALT değerleri açısından karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı(p=0.4)

ALT			
Mutasyon	Hasta sayısı	Ortalama	Std. Deviation
YOK	63	68,6	23,9
VAR	8	65,7	28,4
Total	71	68,3	24,3

Tablo 6 MUTASYON OLAN VE OLMAYAN HASTALARDA ALT DÜZEYİ

Mutasyon görülen hastalarda Ishak skoruna göre karaciğer biyopsisinde HAI ortalama 6.9, fibroz skoru ortalama 2, mutasyon görülmeyen hastalarda aynı şekilde Ishak skoruna göre karaciğer biyopsisinde HAI ortalama 7.1, fibroz skoru 2 olarak saptandı.

Mutasyon görülen ve görülmeyen hastaların karaciğer biyopsisinde HAI ve fibroz skoru yönünden istatistiksel açıdan bir farklılık yoktu.(p=0.29)

Mutasyon	Ortalama HAI	Ortalama fibroz skoru
YOK	6,9	2,4
VAR	7,1	2,3
Total	6,9	2,4

Tablo 7 MUTASYON OLAN VE OLMAYAN HASTALARDA HAI VE FİBROZ SKORU

TÜM HASTA GRUBUNUN VİROLOJİK ANALİZİ

HBeAg pozitif hastalarda ALT ortalama 98 U/L, HBV DNA 321×10^3 U/I, HAI 7,9, fibroz skoru 2 olarak saptandı. HBeAg negatif hastalarda ALT ortalama 55 U/L, HBV DNA 170×10^2 U/I, HAI 7,1 ve fibroz skoru 2,6 olarak saptandı. HBeAg negatif ve pozitif hastalar bu parametreler açısından karşılaştırıldığında HAI ve fibroz skoru yönünden istatistiksel bir farklılık saptanmazken ($p > 0.05$), HBV DNA ve ALT yönünden bakıldığında HBeAg pozitif hastalarda HBV DNA ve ALT değeri yüksek olup bu gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptandı ($p < 0.05$).

Mutasyonun varlığı, yokluğu ile hastaların HBeAg pozitif negatiflik durumuna göre elde edilen ALT, HAI, fibroz, HBV DNA düzeyleri aşağıdaki tablolarda toplu şekilde özetlenmiştir.

HBeAg	HAI	FIBROZ	ALT	HBVDNA
NEGATİF(n:48)	6,5	2,6	55,6 U/L	17033 U/I
POZİTİF (n:23)	7,9	1,9	94,8 U/L	321046 U/I
Total (n:71)	6,9	2,4	68,3 U/L	115516 U/I

Tablo 8 HBeAg NEGATİF VE POZİTİF HASTALARDA PRAMETRE DEĞERLERİ

Mutasyon	HAI	Fibroz	ALT	HBV DNA
YOK	6,9	2,4	68,6 U/L	117.372 U/I
VAR	7,1	2,3	65,7 U/L	100.900 U/I
Total	6,9	2,4	68,3 U/L	115.516 U/I

Tablo 9 MUTASYON OLAN VE OLMAYAN HASTALARDA PARAMETRE DEĞERLERİ

TARTIŞMA

Kronik hepatit B, bugün dünyada önemli bir sağlık problemi ve en yaygın infeksiyon hastalıklarından biridir. Dünya nüfusunun üçte biri hepatit B virusu ile enfektedir ve bunların % 5'i kronik hastadır. Bu kronik hastaların yaklaşık dörtte biri, ölümcül karaciğer hastalıkları olan karaciğer sirozu ve karaciğer kanserine ilerlemektedir. Yılda 1 milyon kişi hepatit B virüsü nedeniyle ölmektedir. Bu sebeplerden dolayı hepatit B virusunun tedavisi önemlidir. Lamivudin, uzun yıllardır kronik hepatit B hastalarının tedavisinde kullanılan güvenilir ve yan etki profili iyi olan bir revers transkriptaz inhibitörüdür. Lamivudinin kullanım süresi uzadıkça lamivudine karşı olan ilaç direnci artmaktadır. Artan ilaç direnci hastanın dekompanseasyonuna ve hatta fatal bir seyre kadar giden kliniğe sebep olduğundan oldukça önemli bir problemdir. Lamivudine direnç, HBV'nin domain B'de 180. kodonda lösinin metiyonin ile yer değiştirmesi (rtL180M) ve polimeraz geninin revers transkriptaz (rt) bölgesinde domain C'de 204. kodonda metiyonin, valinin veya izolösinin ile yer değiştirmesi ile (rtM204V veya rtM204I) YMDD motifinde görülen amino asit değişiklikleri sonucunda ortaya çıkar(63-66). Son yıllarda yapılan çalışmalar(1,2,3) lamivudin ile tedavi edilmeyen kronik hepatit B hastalarında lamivudin tedavisi sırasında ilaç direncinden sorumlu olan YMDD motif mutanların doğal genom çeşitliliği olarak meydana geldiğini göstermiştir. Ancak doğal oluşan mutasyonların toplumlardaki prevalans, önemi, kliniğe ve hasta tedavisine nasıl yansyacağı tam olarak belirlenememiştir.

Farklı coğrafik bölge ve toplumlarda naive hepatit B hastalarında bakılan YMDD mutasyon oranı popülasyonlar arasında %7.5 - %29.5 aralığında değişmektedir. Bu mutasyonların çoğunlukla genotip C ve karma genotiplerde meydana geldiği ve mutasyon tiplerinin rtM204I ve rtM204V olduğu bildirilmiştir (1,2,3,67,68). Bu çalışmalarda mutasyon prevalansı arasındaki bu farklılığın HBV ile enfekte popülasyonun genotipi ile ilişkili olduğu ve genotip C de görüldüğü öne sürülmüştür. Bizim toplumumuzda naive hastalarda YMDD mutasyonunu saptamak için Tunçbilek ve ark. yaptığı çalışmada (69) tüm hastalar genotip D olup mutasyon oranı %7.1 ve mutasyon tipi rtM204I ve rtM204V şeklinde saptanmış. Bu sonuçlar daha önceki çalışmalardan farklı olarak naive hepatit B hastasında YMDD mutasyonunun sadece genotip C de değil bizim gibi genotip D nin baskın olduğu toplumlardada belirlendiğini ortaya koymuştur. Biz çalışmamızda Türk toplumunun büyük bir oranı (%90 ların üzerinde) genotip D olarak kabul edildiğinden(70) genotip çalışması yapılmadı. Çalışmamıza alınan naive kronik hepatit B li hastalarda YMDD mutasyonunu

%11.3 olarak saptadık. Bu sonuç bizden önce yapılan çalışmalarda türk toplumunda saptanan yüzde oranından daha fazla olup bulaş için alınan tedbirlere rağmen bu oranda bir artış saptadık (69). Ancak gerek bizim gerekse daha önce yapılan çalışmalardaki hasta sayısı yeterli olmadığından Türk toplumundaki naive hepatit B li hastalarda YMDD mutasyon prevelans oranının daha sağlıklı bir şekilde değerlendirilmesi için bu tür çalışmaların çok merkezli ve daha çok hasta üzerinde yapılması gerekir.

HBV DNA seviyelerinin YMDD mutasyonları insidansı ile pozitif bir ilişkisi olmadığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (69-71). Bizim çalışmamızda da mutasyon saptanan ve saptanmayan hastalar HBV DNA viral yükü açısından karşılaştırıldığında mutasyon saptanan hastaların HBV DNA viral yükleri saptanmayan hastalardan düşük olmakla birlikte bu iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.27$). Bu bulgumuz literatür ile uyumlu olup HBV DNA seviyelerinin YMDD mutasyonları insidansı ile pozitif bir ilişkisi olmadığı sonucunu desteklemektedir.

Naive kronik hepatit B li hastalarda lamivudin direnci mutasyonları ile ilgili diğer faktör HBe antijeninin pozitif veya negatif olmasıdır. Tunçbilek ve ark. yaptığı çalışmada (69) hastaların HBeAg ve anti HBeAg durumları ile YMDD mutasyon oranları arasında bir ilişki saptanmamış olup naive hastalardaki mutasyonun bu faktörlerden bağımsız olduğu belirtilmiştir. Kobayashi ve ark(73). naive kronik hepatit b tanısı olan hastalarda yaptıkları çalışmada HBeAg pozitif olan grupta %29.7 gibi yüksek bir oranda YMDD mutasyonu saptamış olup bu veriler ışığında HBe pozitif hastalarda YMDD mutasyonunun daha sık rastlandığı belirtilmiştir. Ye ve ark(74). yaptığı çalışmada YMDD mutasyonun anti HBe pozitif hastalarda daha sık görüldüğü belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda tüm hasta grubunda saptanan %11.3 mutasyon oranı analiz edildiğinde HBeAg pozitif hastalarda mutasyon oranı %17 iken anti HBe pozitif hastalarda bu oran %8.1 olarak saptanmıştır. Bizim sonuçlarımızda HBe pozitif hastalarda YMDD mutasyon oranının fazla olduğuna savunan literatür bilgisini destekler niteliktedir.

Mutasyon saptanan ve saptanmayan hastalar bulaş açısından alınan anamnezlerinde bir farklılık saptanmadı ve genelde bulaş aile içi, operasyon sonrası ve gebelik sırasında yapılan tetkiklerde tesadüfen saptanmış hastalardan oluşmaktaydı.

Türkiyedeki mutasyon oranı dikkate alındığında bu çalışmalardaki hasta sayısı artırılarak tedavi öncesinde yapılacak mutasyon analiz testinin cost effectivite açısından değerlendirilmesi önemli gibi gözükmektedir.

Hastalardan yapılan karaciğer biyopsi örneklerinin patolojik değerlendirilmesi sonrasında elde edilen HAI ve fibroz skor sonuçları mutasyon saptanan ve saptanmayan hastalarda karşılaştırıldığında bu veriler açısından iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı saptandı($p=0.29$). Bizim elde ettiğimiz bu sonuçlar HAI ve fibroz skoru ile mutasyon arasında bir ilişki olmadığını desteklemektedir.

Hastaların ALT değerlerine bakıldığında mutasyon saptanan ve saptanmayan hastaların sonuçları karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı($p=0.4$). Ancak hasta ALT değerleri HBeAg pozitif ve negatif hastalar arasında karşılaştırıldığında HBeAg pozitif olan hastalarda ALT değeri daha fazla olup istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardı($p<0.05$). Bizim çalışmamızdan elde edilen sonuç hastaların ALT düzeyleri ile mutasyon görülme sıklığı arasında bir bağlantı saptanmamıştır.

Sonuç olarak lamivudin, uzun yıllardır kronik hepatit B hastalarının tedavisinde kullanılan güvenilir ve yan etki profili iyi olan bir ilaç olmasına rağmen lamivudinin kullanım süresine paralel olarak artan ilaç direnci ve sonrasında oluşan klinik sonuçlar halen önemli bir problem olarak devam etmektedir. Bunun yanında daha önce hiç tedavi görmemiş hastalarda da bu direncin görülmesi ayrı bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Naive hastalarda görülen bu mutasyon toplumlar arasında farklı prevalanslarda ortaya çıkmaktadır. Bu prevalansın yüksek olduğu toplumlarda lamivudinin tedavisi öncesinde direnç bakılması sonradan oluşacak komplikasyonları önleyebilir. Bu nedenle tüm popülasyonların kendi direnç prevalansını belirlemesi kronik hepatit B virüsü hastalarında tedaviyi buna göre planlaması ileride oluşacak komplikasyonları önleyebilir ve tedavinin etkinliğini artırabilir. Tedavi almamış hepatit B hastalarında görülen YMDD mutasyonlarının klinik önemi tam olarak belirlenmemiş olup bunun için ileri ve daha büyük hasta popülasyonu içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA:

1. Kirishima T, Okanoue T, Daimon Y, Itoh Y, Nakamura H, Morita A, Toyama T, Minami M. 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.
2. Heo J, Cho M, Kim HH, Shin YM, Jang HJ, Park HK, Kim CM, Kim GH, Kang DH, Song GA, Yang US. Detection of YMDD motif mutants by oligonucleotide chips in lamivudine-untreated patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Korean Med Sci.* 2004 ;19:541-5.
3. Matsuda M, Suzuki F, Suzuki Y, Tsubota A, Akuta N, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, et al. YMDD mutants in patients with chronic hepatitis B before treatment are not selected by lamivudine. *J Med Virol.* 2004; 74: 361-366.
4. Ustaçelebi Ş, Ergünay K. Hepatit B virusunun moleküler virolojisi. Ed: Tabak F, Balık, İ. Tekeli Viral hepatit 2007; s. 10-90
5. Birengel S, Tekeli E: Kronik Hepatit B'de Epidemiyolojik, Virolojik, Fizyopatolojik ve Klinik Özellikler, Tanımlamalar İn: Köksal İ, Leblebicioğlu H (Eds) Kronik Viral Hepatitlerin Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, 2003 Ankara:11-21.
6. Aydın K. Akut Viral Hepatitlerde Epidemiyoloji. İn: Köksal İ. (Eds). Viral Hepatitlerde Yenilikler. Karadeniz Teknik Üniversitesi Matbaası, Trabzon 1998:43-57.
7. Taşyaran M.A. HBV Enfeksiyonu Epidemiyolojisi. İn: Tekeli E. Balık İ (Eds). Viral Hepatit 2003:121-128.
8. Leblebicioğlu H. Hepatit B Virus Mikrobiyolojisi, Patogenez, Epidemiyoloji, Klinik, Tedavi ve Korunma. İn: Usluer G (Eds). A'dan Z'ye Akut Viral Hepatitler. Modern Tıp Seminerleri. Güneş Kitabevi, Ankara 2002:16-23.
9. Hoofnagle JH, Doo E, Liang TJ, Fleischer R, Lok AS. Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop Hepatology. 2007 Apr;45(4):1056-75.
10. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007 feb;45; 507-539.
11. Sleisenger and Fordtran's gastroenterology hepatology ninth edition 2010; (1289-1310).
12. Tacke F, Gehrke C, Luedde T, Heim A, Manns MP, Trautwein C. Basal core promoter and precore mutations in the hepatitis B virus genome enhance replication efficacy of Lamivudine-resistant mutants. *J Virol.* 2004 Aug;78(16):8524-35.
13. Tassopoulos NC, Volpes R, Pastore G, Heathcote J, Buti M, Goldin RD, Hawley S, Barber J, Condreay L, Gray DF. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Lamivudine Precore Mutant Study Group. *Hepatology.* 1999 Mar;29(3):889-96.
14. Gish RG, Locarnini S. Genotyping and genomic sequencing in clinical practice. *Clin Liver Dis.* 2007 Nov;11(4):761-95,
15. Pas SD, de Man RA, Fries E, Osterhaus AD, Niesters HG. The dynamics of mutations 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 Jul;25(1):63-71.
16. Punia P, Cane P, Teo CG, Saunders N. Quantitation of hepatitis B lamivudine resistant mutants by real-time amplification refractory mutation system PCR. *J Hepatol.* 2004 Jun;40(6):986-92.
17. Nafa S, Ahmed S, Tavan D, Pichoud C, Berby F, Stuyver L, Johnson M, Merle P, Abidi H, Trépo C, Zoulim F. Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2000 Nov;32(5):1078-88.
18. Paik YH, Chung HY, Ryu WS, Lee KS, Lee JS, Kim JH, Lee CK, Chon CY, Moon YM, Han KH. Emergence of YMDD motif mutant of hepatitis B virus during short-term lamivudine therapy in South Korea. *J Hepatol.* 2001 Jul;35(1):92-8.
19. Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Masaki T, Lan KH, Carrilho FJ, Omata M. YMDD motif in hepatitis B virus DNA polymerase influences on replication and lamivudine resistance: A study by in vitro full-length viral DNA transfection. *Hepatology.* 1999 Mar;29(3):939-45.

20. Wu J-C, Chen T-Z, Huang Y-S. Natural history of Hepatitis D Viral Superinfection: Significance of Viremia Detected by Polymerase Chain Reaction. *Gastroenterology* 1995; 796-802.
21. Dienstag JL, Isselbacher KJ. Acute viral hepatitis. In Braunwald E, Hauser SL, Fauci AS, Longo DL, Kasper DL, Jameson JL (eds.). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15th ed, Vol, Macgraw Hill, Newyork; 1721-1737, 2001
22. Uzunalimoglu Ö. Viral hepatitlerde ekstrahepatik manifestasyonlar. Edt: Kılıçturgay K, Badur S. *Viral hepatit 2001. Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını*; 298-302., 2001.
23. Taşyaran MA. Hepatit B virüs enfeksiyonunda klinik. Ed: Tabak F, Balık İ, Tekeli E. *Viral hepatit 2003*; 180-190
24. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007 Feb;45(2):507-39. Erratum in: *Hepatology*. 2007 Jun;45(6):1347.
25. Servoss JC, Friedman LS. Serologic and molecular diagnosis of hepatitis B virus. *Infect Dis Clin North Am*. 2006 Mar;20(1):47-61. PubMed PMID: 16527648.
26. Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, Simon C, So TM, Gerken G, de Man RA, Niesters HG, Zondervan P, Hansen B, Schalm SW; HBV 99-01 Study Group; Rotterdam Foundation for Liver Research. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet*. 2005 Jan 8-14;365(9454):123-9.
27. Xu XW, Chen YG. Current therapy with nucleoside/nucleotide analogs for patients with chronic hepatitis B. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2006 Aug;5(3):350-9.
28. Lok AS, McMahon BJ; Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Chronic hepatitis B: update of recommendations. *Hepatology*. 2004 Mar;39(3):857-61.
29. C.L. Lai, E. Gane and Y.F. Liaw et al., Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B, *N Engl J Med* 357 (2007), pp. 2576–2588.
30. Y.F. Liaw, E. Gane and N. Leung et al., 2-Year GLOBE trial results: telbivudine is superior to lamivudine in patients with chronic hepatitis B, *Gastroenterology* 136 (2009), pp. 486–495.
31. P. Marcellin, T.T. Chang and S.G. Lim et al., Long-term efficacy and safety of adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B, *Hepatology* 48 (2008), pp. 750–758.
32. Y.S. Lee, D.J. Suh and Y.S. Lim et al., Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy, *Hepatology* 43 (2006), pp. 1385–1391.
33. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases San Francisco, CA (October 31–November 04, 2008), *Hepatology* (2008).
34. P. Marcellin, E.J. Heathcote and M. Buti et al., Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B, *N Engl J Med* 359 (2008), pp. 2442–2455.
35. D.J. Tenney, R.E. Rose and C.J. Baldick et al., Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naive patients is rare through 5 years of therapy, *Hepatology* 49 (2009), pp. 1503–1514.
36. D.J. Tenney, K.A. Pokornowski and R.E. Rose et al., Entecavir maintains a high genetic barrier to HBV resistance through 6 years in naive patients, *J Hepatol* 50 (2009), p. S10 Abstract 20.
37. F. Zoulim, New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA, *J Hepatol* 42 (2005), pp. 302–308.
38. F. Zoulim, Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection, *Antiviral Res* 64 (2004), pp. 1–15.
39. C. Seeger and W.S. Mason, Hepatitis B virus biology, *Microbiol Mol Biol Rev* 64 (2000), pp. 51–68.
40. J. Kock, T.F. Baumert and W.E.t. Delaney et al., Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the initiation of hepatitis B virus infection in primary tupaia hepatocytes, *Hepatology* 38 (2003), pp. 1410–1418.

41. J. Delmas, O. Schorr and C. Jamard et al., Inhibitory effect of adefovir on viral DNA synthesis and covalently closed circular DNA formation in duck hepatitis B virus-infected hepatocytes in vivo and in vitro, *Antimicrob Agents Chemother* 46 (2002), pp. 42.
42. T. Zhou, J. Saputelli and C.E. Aldrich et al., Emergence of drug-resistant populations of woodchuck hepatitis virus in woodchucks treated with the antiviral nucleoside lamivudine, *Antimicrob Agents Chemother* 43 (1999), pp. 1947–1954.
43. M. Lutgehetmann, T. Volzt and A. Quaas et al., Sequential combination therapy leads to biochemical and histological improvement despite low ongoing intrahepatic hepatitis B virus replication, *Antivir Ther* 13 (2008), pp. 57–66.
44. J.M. Pawlotsky, The concept of hepatitis B virus mutant escape, *J Clin Virol* 34 (Suppl 1) (2005), pp. S125–S129.
45. S. Villet, C. Pichoud and J.P. Villeneuve et al., Selection of a multiple drug-resistant hepatitis B virus strain in a liver-transplanted patient, *Gastroenterology* 131 (2006), pp. 1253–1261.
46. C. Pallier, C. Rodriguez and R. Brillet et al., Complex dynamics of hepatitis B virus resistance to adefovir, *Hepatology* 49 (2009), pp. 50–59.
47. Liaw YF. The current management of HBV drug resistance. *J Clin Virol* 34: 2005; 456-67.
48. Suzuki F, Suzuki Y, Tsubota A, Akuta N, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Mutations of polymerase, precore and core promoter gene in hepatitis B virus during 5-year lamivudine therapy. *J Hepatol*. 2002 Dec;37(6):824-30.
49. Yuen MF, Sablon E, Hui CK, Yuan HJ, Decraemer H, Lai CL. Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy. *Hepatology*. 2001 Oct;34(4 Pt 1):785-91.
50. Pallier C, Castéra L, Soulier A, Hézode C, Nordmann P, Dhumeaux D, Pawlotsky JM. Dynamics of hepatitis B virus resistance to lamivudine. *J Virol*. 2006 Jan;80(2):643-53.
51. C. Fournier and F. Zoulim, Antiviral therapy of chronic hepatitis B: prevention of drug resistance, *Clin Liver Dis* 11 (2007), pp. 869–892.
52. S. Locarnini, A. Hatzakis and J. Heathcote et al., Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B, *Antivir Ther* 9 (2004), pp. 679–693.
53. J.M. Pawlotsky, G. Dusheiko and A. Hatzakis et al., Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach, *Gastroenterology* 134 (2008), pp. 405–415.
54. F. Zoulim and R. Perrillo, Hepatitis B: reflections on the current approach to antiviral therapy, *J Hepatol* 48 (Suppl 1) (2008), pp. S2–S19.
55. European Association for the Study of the Liver, EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B, *J Hepatol* 50 (2009), pp. 227–242.
56. Ryu SH, Chung YH, Choi MH, Kim JA, Shin JW, Jang MK, Park NH, Lee HC, Lee YS, Suh DJ. Long-term additional lamivudine therapy enhances durability of lamivudine-induced HBeAg loss: a prospective study. *J Hepatol*. 2003 Oct;39(4):614-9.
57. Seta T, Yokosuka O, Imazeki F, Tagawa M, Saisho H. Emergence of YMDD motif mutants of hepatitis B virus during lamivudine treatment of immunocompetent type B hepatitis patients. *J Med Virol*. 2000 Jan;60(1):8-16.
58. Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Matsuda M, Sato J, Takagi K, Tsubota A, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Virological and biochemical relapse according to YMDD motif mutant type during long-term lamivudine monotherapy. *J Med Virol*. 2003 Dec;71(4):504-10.
59. Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C, Brown N, Woessner M, Boehme R, Condeay L. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis*. 2003 Mar; 687-96.

60. T.T. Chang, R.G. Gish and R. de Man et al., A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B, *N Engl J Med* 354 (2006), pp. 1001–1010.
61. C.L. Lai, D. Shouval and A.S. Lok et al., Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B, *N Engl J Med* 354 (2006), pp. 1011–1020.
62. E.B. Keeffe, S. Zeuzem and R.S. Koff et al., Report of an international workshop: roadmap for management of patients receiving oral therapy for chronic hepatitis B, *Clin Gastroenterol Hepatol* 5 (2007), pp. 890–897.
63. Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Hashimoto M, Miyano Y, et al. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and retakeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 1998; 17:11-27.
64. Allen MI, Gauthier J, DesLauriers M, Bourne EJ, Carrick KM, Baldanti F, et al. Two sensitive PCR-based methods for detection of hepatitis B virus variants associated with reduced susceptibility to lamivudine. *J Clin Microbiol* 1999 oct; 37:3338–47, 37.
65. Kirishima T, Okanoue T, Daimon Y, Itoh Y, Nakamura H, Morita A, 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; 37:259–65.
66. Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 2001; 34: 584–6.
67. Huang ZM, Huang QW, Qin YQ, et al. Clinical characteristics and distribution of hepatitis B virus genotypes in Guangxi Zhuang population. *World J Gastroenterol* 2005; 11; 6525-9.
68. Heo J, Cho M, Kim HH, Shin YM, Jang HJ, Park HK, Kim CM, Kim GH, Kang DH, Song GA, Yang US. Detection of YMDD motif mutants by oligonucleotide chips in lamivudine-untreated patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Korean Med Sci.* 2004; 19: 541–45.
69. Tunçbilek S, Köse S, Elaldi A, Akman S. Lamivudine resistance in untreated chronic hepatitis B patients in Turkey. *Turk J Gastroenterol.* 2008; 19; 99–103.
70. Mutation and genotype analysis of hepatitis B virus on acute and chronic *Journal of Cell and Molecular Biology* 5: 33-42, 2006.
71. Lee C-Z, Lee H-S, Huang G-T, et al. Detection of YMDD mutation using mutant-specific primers in chronic hepatitis B patients before and after lamivudine treatment. *World J Gastroenterol* 2006; 12; 5301-5.
72. Desmet VJ, Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis [*Hepatology* 1981; 1; 43-51.
73. Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 2001; 34; 584-6.
74. Ye XG, Wang RL, Guo HB. Detection and analysis of YMDD mutate genes in patients of chronic hepatitis B before being treated. *Zhonghua Jianyan Yixue Zazhi* 2002; 25; 248-51.