

Nükleozid/Nükleotid Analogu Tedavisi Alan Kronik Hepatit B Hastalarında HBV *pol/S* Geni Mutasyonları

HBV *pol/S* Gene Mutations in Chronic Hepatitis B Patients Receiving Nucleoside/Nucleotide Analogues Treatment

Sevin KIRDAR¹, Mehmet Hadi YAŞA², Murat SAYAN^{3,4}, Neriman AYDIN¹

¹ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

¹ Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Aydın, Turkey.

² Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Aydın.

² Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Gastroenterology, Aydın, Turkey.

³ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, PCR Ünitesi, Kocaeli.

³ Kocaeli University Medical Faculty Hospital, Central Laboratory, PCR Unit, Kocaeli, Turkey.

⁴ Yakın Doğu Üniversitesi, Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi, Lefkoşa, KKTC.

⁴ Near East University, Experimental Health Sciences Research Center, Nicosia, TRNC.

Makale Atfı: Kırdar S, Yaşa MH, Sayan M, Aydın N. Nükleozid/nükleotid analogu tedavisi alan kronik hepatit B hastalarında HBV *pol/S* geni mutasyonları. Mikrobiyol Bul 2019;53(2):144-155.

ÖZ

Kronik hepatit B (KHB), dünyada 240 milyondan fazla kişinin etkilendiği önemli bir halk sağlığı problemidir. KHB tedavisinde amaç, hastalığın siroz ve/veya karaciğer kanseri gelişimine neden olmasının durdurulmasıdır. Tedavide interferonlar [standart ve peginterferon (Peg-IFN)] ve nükleozid/nükleotid analogları (NA) yaygın olarak kullanılmaktadır. Uzun süreli NA kullanımı sonucunda ilaca dirençli mutasyonlar ortaya çıkabilmekte ve bu durum tedavi başarısızlığına neden olabilmektedir. KHB hastalarında polimeraz (*pol*) geninde gelişen primer ilaç direnç mutasyonlarının yanı sıra kompensatuvar-onarıcı mutasyonlar da bildirilmektedir. HBV genomunda *pol* geni zarf (*S*) geni ile örtüşmektedir. *pol* geninde meydana gelen NA direnç mutasyonları beraberinde *S* geni ile örtüşmesi sonucunda ürünü olan HBsAg'de değişikliklere neden olmaktadır. HBV *pol/S* geni örtüşmesine bağlı olarak gelişen mutasyonlar için "ilaca bağlı gelişen potansiyel aşı kaçışı mutasyonu" (ADAPVEM; Antiviral Drug-Associated Potential Vaccine-Escape Mutant) kavramı kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada, KHB hastalarında, nükleozid analogu tedavilerinde, klinik ve epidemiyolojik önemdeki HBV *pol/S* geni mutasyonlarının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya KHB tanısı ile takip edilen, bir yıl ve/veya daha uzun süre antiviral tedavi alan 100 hasta dahil edilmiştir. Serum örneklerindeki HBV DNA düzeyleri ticari eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) kiti ile *pol/S* gen mutasyonları ise doğrudan dizi analizi ile belirlenmiştir. Çalışma grubunda, 16 hasta HBV DNA düzeylerinin düşük (< 200 IU/ml) olması nedeniyle değerlendirme dışı bırakılmıştır. HBV *pol* geni dizi analizi yapılan 84 hastanın 53 (%63)'ü erkek, 31 (%36.9)'i kadın ve yaş ortalaması 47 ± 14.9 (yaş aralığı: 20-67) yıl olarak belirlenmiştir. Hastaların 38 (%45.2)'inde ilaç direnciyle ilişkili bir ya da birden fazla primer/kompensatuvar mutasyonlar (rtI169S, rtL180M, rtT184L, rtA194V, rtM204I/rtL91I, rtQ149K, rtQ215H/S, rtN238D) tanımlanmıştır. KHB hastalarında *pol/S* geni örtüşmesine bağlı olarak gelişen mutasyonların

İletişim (Correspondence): Dr. Sevin Kırdar, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 256 444 1256, **E-posta (E-mail):** sevin.kirdar@gmail.com

dağılımı; 27 (%31.3) hastada immün kaçak mutasyonu (sI110L, sT127P, sS114A, sT123A), 9 (%10.5) hastada HBIg kaçacağı (sP120R, sT123N, sE164D, sY134F, sQ129H, sT118A, sP127K), 7 (%8.3) hastada HBsAg aşı kaçacağı mutasyonları (sT126I, sP120S, sG145A, sS193L) ve 1 (%1.1) hastada sT131I tanı kaçacağı HBsAg mutasyonu olarak belirlenmiştir. Ayrıca 13 (%15.4) hastada ADAPVEM saptanmıştır. Bu çalışma ile KHB'li hastalarda yaygın olarak kullanılan lamivudin ve diğer NA tedavileri sırasında ADAPVEM oluşturma potansiyeli olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle KHB'li hastaların NA ile tedavilerinde antiviral ilaç direncinin ve ADAPVEM'lerin araştırılması ve tedavinin yeniden planlanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Hepatit B virüsü; hepatit; antiviral; direnç; mutasyon.

ABSTRACT

Chronic hepatitis B (CHB) is an important public health problem affecting over 240 million people all around the world. The aim of the treatment in chronic hepatitis B is to prevent progression to cirrhosis and liver cancer. Interferons (standard and peginterferon) (Peg-IFN) and nucleoside/nucleotide analogues (NAs) are widely used in the treatment of CHB. The use of long-term therapy can however result in drug resistant mutations, which can lead to treatment failure. In patients with chronic hepatitis B, in addition to primary drug resistance mutations in the *pol* gene, compensatory mutations were reported. The genom of HBV polymerase (*pol*) gene overlaps with the envelope (*S*) gene. Nucleoside/nucleotide analogue (NA) resistance mutations in the *pol* gene of HBV, either from selection of primary or secondary resistance mutations, typically result in changes in HBsAg. Recent studies have conferred a new acronym for these HBV *pol/S* gene overlap mutants; ADAPVEMs, for antiviral drug-associated potential vaccine-escape mutants. The aim of this study was to investigate clinically and epidemiologically significant HBV *pol/S* gene mutations in NA treated CHB patients. In the study, a total of 100 patients who received nucleoside/nucleotide analogue therapy for one year or more were included. The levels of HBV DNA from serum samples were detected by the commercial real-time PCR assay and the mutations of *pol/S* genes by direct sequencing. Sixteen samples with low HBV DNA levels (> 200 IU/ml) could not be interpreted by sequencing due to insufficient amplification. Of the remaining 84 patients that could be sequenced HBV *pol* gene of HBV, 53 (63.09%) were males and 31 (36.91%) were women and the mean age was 47 ± 14.99 years (range: 20-67). Primary/secondary drug mutations (rtM204I/V, rtI169S, rtL180M, rtT184L, rtA194V, rtM204I/rtL91I, rtQ149K, rtQ215H/S, rtN238D) were detected in 38 (45.2%) of the patients. Because of the HBV *pol/S* gene overlapping, in 27 patients immun-selected amino acid substitutions (sI110L, sT127P, sS114A, sT123A), in nine patients HBIg selected escape mutants (sP120R, sT123N, sE164D, sY134F, sQ129H, sT118A, sP127K), in seven patients vaccine escape mutants (sT126I, sP120S, sG145A, sS193L) and in one patient misdiagnosis of HBsAg (sT131I) were detected. In addition, antiviral drug-associated potential vaccine-escape mutants were detected in 13 (15.4%) patients. In patients with chronic HBV, NAs including commonly used lamivudine were observed to have the potential for ADAPVEM to emerge during treatment. It was concluded that after determination of antiviral drug resistance and ADAPVEMs replanning of treatment should be done in the NA treatment of patients with CHB.

Keywords: Hepatitis B virus; hepatitis; antiviral; resistance; mutation.

GİRİŞ

Kronik hepatit B (KHB) tedavisinde interferonlar (interferon alfa ve peginterferon alfa) ve nükleozid/nükleotid analogları (NA) yaygın olarak kullanılmaktadır¹. NA; L-nükleozidler [lamivudin (LAM), telbuvudin (LdT)], deoksiguanozin analogu [entekavir (ETV)] ve asiklikfosfonatlar [adefovir (ADV) ve tenofovir (TDF)] olmak üzere üç grupta toplanmaktadır. Bu ilaçlar ile kısa süreli tedavilerde viral replikasyon baskılanmakta ve karaciğer fonksiyon testleri normale dönmektedir². Uzun süreli NA kullanımı sonucunda ilaca dirençli mutasyonlar ortaya çıkabilmekte bu da tedavi başarısızlığına neden olabilmektedir³. Antiviral ilaç direncinin gelişimi, virüsün replikasyon oranı, tedavide kullanılan

antiviral ilacın gücü, ilaca dirençli virüsün replikasyon yeteneği ve ilacın genetik bariyeri gibi faktörler ile ilişkili bulunmaktadır. Lamivudin ve adefovir (ADV) gibi birinci kuşak antiviral ilaçların düşük genetik bariyerli ve tedavi gücünün zayıf olması ile uzun süreli tedavilerde antiviral yanıt azlığına ve polimeraz (*pol*) geninde direnç mutasyonlarının gelişimine neden olmaktadır⁴.

Hepatit B virüsü (HBV) replikasyonu sırasında pregenomik RNA ara basamağını kullanması nedeniyle, diğer DNA virüslerine oranla daha fazla mutasyona rastlanabilmektedir. Bu ters transkripsiyon işlemi tamir mekanizmasının olmaması ve virüsün yüksek replikasyon kapasitesi ($> 10^{12}$ virion/gün) nedeniyle yüksek oranda mutasyon görülebilmektedir⁵. Bu mutasyonlardan bir grubu *pol* enzimini kodlayan P bölgesinde oluşabilmektedir. HBV genomundaki *pol* enzimini kodlayan P bölgesi yedi (A, B, C, D, E, F ve G) alt bölgeden oluşmaktadır. NA ile ilişkili mutasyonlar başlıca A, B, C ve D alt bölgelerinde gelişmekte ve klinik önemi bakımından iki grupta sınıflandırılmaktadır: birinci grup: Primer ilaç direnç mutasyonları (rtI169T, rtA181T/V, rtT184A/C/F/G/I/L/M/S, rtA194T, rtS202C/G/I, rtM204I/V/S, rtI233V, rtN236T, rtM250I/L/V), ikinci grup: Kompensatuvar (onarıcı) mutasyonlar (rtL80I/V, rtI91L, rtV173L, rtL180M, rtQ215P/S, rtN238D/S/T)^{6,7}.

HBV genomunda görülen mutasyonlardan NA ilaç direnci mutasyonları ile birlikte görülebilen bir diğer grup yüzey (*S*) geni mutasyonlarıdır. *S* geni mutasyonları ile ortaya çıkan HBsAg proteininde aminoasit değişiklikleri, *pol* ve *S* genlerinin üst üste çakışır pozisyonda olmasına bağlı gelişebilmektedir. Bu durum NA tedavileri sırasında görülebilmekte ve HBV'ye karşı aşılanmış kişilerde oluşan antikorlarla yakalanamayan HBV suşları ortaya çıkmaktadır. İmmün kaçak suşlar olarak tanımlanan bu suşlarda, *S* geninin "a" determinantı olarak bilinen majör nötralizasyon kangalı ve çevresinde meydana gelen mutasyonlar bu durumdan sorumlu tutulmaktadır^{5,8}. Bu durum hepatit B aşılmasına yanıtın azalmasına, HBsAg tanı testlerinde yalancı negatifliklere, hepatit B immüno globulini (HBIG) ile korumada yetersizliğe yol açabilmektedir^{9,10}. HBV *pol/S* geni çakışmasına bağlı olarak gelişen bu mutasyonlar için antiviral ilaç ilişkili potansiyel aşı kaçacağı mutasyonu (Antiviral Drug-Associated Potential Vaccine Escape Mutant-ADAPVEM) kavramı kullanılmaya başlanmıştır^{5,10}.

Hepatit B enfeksiyonlarının kronik seyretmesi ve uzun süreli tedavi uygulanması nedeniyle tedavi sırasında mutasyon gelişebilmekte ve tedavide başarısızlığa yol açabilmektedir. Bu mutasyonlar içinde bazıları klinik ve epidemiyolojik yönden önemli kabul edilirken bazı mutasyonlar ile ilgili tam bir görüş birliği bulunmamaktadır⁷. Bu çalışmada, KHB hastalarında NA tedavilerinde, klinik ve epidemiyolojik önemdeki HBV *pol/S* geni mutasyonlarının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 29.09.2011 ve 11.02.2019, Karar No: 2011/104 ve 53043469-050.04.04).

Çalışma Grubu

Bu çalışma kesitsel tanımlayıcı araştırma olarak planlandı. Çalışmaya, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Ünitesinde Mayıs 2010-Haziran 2014 tarihleri arasında KHB tanısı ile takip edilen, bir yıl ve/veya daha uzun süre antiviral tedavi alan 100 hasta dahil edildi. Hastaların HBV viral yük ve karaciğer enzim düzeylerinin rutin kontrolü için Gastroenteroloji Ünitesine başvurduktan sonra bilgilendirilmiş onamları ve ardından kan örnekleri alındı. Hasta serumları ayrıldıktan sonra çalışma başlayana kadar -20°C'de saklandı. Hastaların HBsAg, HBeAg ve anti-HBe düzeyleri kemilüminesan immünolojik yöntem (Architect®HBsAg, HBeAg ve anti-HBeAbbott, Illinois, ABD) ile çalışıldı. Serum örneklerinden HBV DNA düzeyleri, gerçek zamanlı PCR (COBAS®AmpliPrep/COBAS®TaqMan®HBV Test, v2.0, Roche, Branchburg, NJ, ABD) yöntemi ile belirlendi. HBV DNA, serum örneklerinden 200 µl kullanılarak "High Pure Viral Nucleic Acid" (RocheDiagnostic, Penzberg, Almanya) kiti ile üretici firma önerileri doğrultusunda izole edildi.

Dizi Analizi

HBV *pol* geni bölgesi Sanger dideoksi dizileme yöntemi ile tanımlandı. HBV *pol* geni amplifikasyonu için DNA polimerazın revers transkriptaz (RT) kangalı (80.-250. aminoasitler arası) özgül (F: 5'-TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT T-3') (R: 5'-CGT TGA CAG ACT TTC CAA TCA AT-3') primerleri kullanıldı. Uygulanacak PCR koşulları; 95°C'de 15 dk, 45 döngü 95°C'de 45 sn, 56°C'de 45 sn ve 72°C'de 45 sn olarak belirlendi. Beklenen PCR ürün büyüklüğü yaklaşık 742 baz çifti (bp) olarak tanımlandı. PCR ürün saflaştırmada "High Pure PCR Product Purification" (Roche Diagnostics GmbH, Almanya) kiti kullanıldı. Dizileme işlemi, ABI PRISM 310 platformunda "DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing" (Amersham Pharmacia Biotech Inc, ABD) kiti kullanılarak yapıldı. Sanger dizileme için PCR protokolünde 35 döngü 95°C'de 20 sn, 50°C'de 25 sn ve finalde 60°C'de 2 dk uygulandı. Dizileme elektroferogramları "Vector NTI v5.2" (InforMax, Invitrogen, Life Science Software, ABD) programında elde edildi. Diziler, "Geno2pheno Drug Resistance" programında (Center of Advanced European Studies and Research, Almanya) HBV genotip/subgenotip, primer/kompansatuvar NA direnci mutasyonları ve HBV *pol/S* geni çakışma mutasyonları (HBsAg proteini; 111.-227. aminoasitler arası) açısından analiz edildi⁵.

Tanımlayıcı istatistik parametrelerinin (ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum) analizi için SPSS 18 (SPSS Inc, ABD) programı kullanıldı. Sayısal olmayan verilerin analizi için ki-kare testi kullandı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ değeri kabul edildi.

BULGULAR

Bu çalışmaya toplam 100 KHB hastası dahil edilmiş ancak 16 hasta HBV DNA düzeylerinin düşük (< 200 IU/ml) olması nedeniyle değerlendirme dışı bırakılmıştır. Çalışmaya alınan 84 hastanın 53 (%63)'ü erkek, 31 (%37)'i kadın olup, yaş ortalaması 47 ± 14.9 (yaş aralığı: 20-67) yıl olarak belirlenmiştir. Hastaların tümünde HBsAg pozitif,

%88.1'inde HBeAg negatif ve anti-HBe pozitif, %11.9'unda HBeAg pozitif ve anti-HBe negatif olarak bulunmuştur. Dizi analizi ile hastaların tümünde HBV'nin D genotipi belirlenmiştir. Çalışmaya alınan toplam 84 örneğin HBV DNA düzeylerinin ortalaması 2.61×10^7 ($10-1.4 \times 10^9$) IU/ml olarak belirlenmiştir. Hastaların demografik ve klinik verileri Tablo I'de gösterilmiştir.

Çalışmada yer alan hastaların kullandığı antiviral ilaçlar ile bu ilaçlara gelişen mutasyon oranları Tablo II'de gösterilmiştir. Kullanılan antiviral ilaca karşı gelişen mutasyon oranlarına göre mutasyon saptanan hastalar ile mutasyon saptanmayan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p= 0.037$). İlaç direnci mutasyonu saptanan KHB hastalarında yaş arttıkça mutasyon saptama oranı istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($r= 0.220$; $p= 0.019$). Mutasyon gelişimi ile cinsiyet arasında ilişki olup olmadığı değerlendirildiğinde; erkek hastaların %47.3'ünde, kadın hastaların %48.3'ünde ilaç direnç mutasyonu belirlenmiştir. Kadın ve erkek cinsi arasında mutasyon varlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($df= 1$; $p= 0.930$).

Tablo I. Kronik Hepatit B Hastalarının Demografik ve Klinik Veri Dağılımı

Özellik	Sayı	%
Cinsiyet (E/K)	53/31	63.1/36.9
HBsAg pozitifliği	100	100
HBeAg pozitifliği	10	11.9
Anti-HBe pozitifliği	74	88.1
HBV Genotip D	84	100
Antiviral ilaç direnç mutasyonu	38	45.2

E: Erkek, K: Kadın, HBV: Hepatit B virüsü.

Tablo II. Kronik Hepatit B Hastalarında Kullanılan Antiviral İlaçlara Göre Tanımlanan İlaç Mutasyonları

Antiviral ilaç	Kronik HBV hastası (n= 84)		Mutasyon (n= 38)	
	Sayı	%	Sayı	%
Lamivudin	34	40.4	19	50
Tenofovir	22	26.3	7	18.4
Entekavir	10	12	5	13.1
Lamivudin, Tenofovir	11	13	5	13.1
Lamivudin, Entekavir	2	2.3	1	2
Entekavir, Tenofovir	2	2.3	-	-
Tenofovir, Entekavir	1	1.2	1	2
Adefovir, Lamivudin	1	1.2	-	-
Adefovir, Tenofovir	1	1.2	-	-

HBV: Hepatit B virüsü.

Kronik HBV hastalarının 38 (%45.2)'inde ilaç direnciyle ilişkili bir ya da birden fazla primer/kompensatuvar mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu hastalardan yalnız LAM kullanan 19 hastada %36.8 oranında primer ve %63.1 oranında kompensatuvar mutasyon ile LAM ve ETV kullanan beş hastada primer mutasyon, LAM ve TDF kullanan bir hastada kompensatuvar mutasyon bulunmuştur. LAM'a karşı gelişen direnç mutasyonlarından rtM204I; dört hastada tek başına primer mutasyon, dört hastada da rtQ215H, rtL91I ve rtL180M kompensatuvar mutasyonları tekli ya da ikili olarak saptanmıştır. Hastalardan üçünde rtM204V + rtL180M ve bir hastada da rtM204V + rtL180M + rtV173L primer/kompensatuvar mutasyonları birlikte belirlenmiştir (Tablo II). Tenovofir kullanan 22 KHB hastasının yedisinde mutasyon belirlenmiştir. Bu mutasyonlar içinde hastalardan yalnız birinde primer mutasyon (rtT181, rtL180M), diğer altı hastada kompensatuvar mutasyonlar (rtQ149K, rtS117T, rtL91I, Q215S, rtL229M) bulunmuştur. ETV kullanan 10 kronik HBV hastasından beşinde mutasyon bulunmuş, bu mutasyonlar iki hastada primer (rtI169S, rtT184L ve rtL180M, rtT181), üç hastada ise kompensatuvar mutasyon (rtQ149K, rtA194V) olarak belirlenmiştir. Kronik HBV hastalarında kompensatuvar mutasyonlarından rtQ215H/P/S, rtQ149K, rt238D, rtL91I, rtS117T ve rtL229M mutasyonları 22 hastadan 16'sında tek başına, altı hastada ikili olarak saptanmıştır (Tablo III).

KHB hastalarında *pol/S* geni çakışmasına bağlı olarak gelişen HBsAg mutasyonlarının dağılımı; 27 (%31.3) hastada immün kaçak mutasyonu (sI110L, sT127P, sS114A, sT123A), 9 (%10.5) hastada HBIg kaçacağı (sP120R, sT123N, sE164D, sY134F, sQ129H, sT118A, sP127K), 7 (%8.3) hastada aşı kaçacağı mutasyonları (sT126I, sP120S, sG145A, sS193L, sS143L) ve 1 (%1.1) hastada sT131I tanı kaçacağı mutasyonu olarak belirlenmiştir. Ayrıca, 13 (%15.4) hastada potansiyel aşı kaçacağı mutasyonları (ADAPVEM) bulunmuştur. HBV *pol* geninde tanımlanan primer/kompensatuvar, *S* ve ADAPVEM mutasyonları Tablo III'te gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, NA ile tedavisi yapılan 84 KHB hastasında, klinik ve epidemiyolojik önemdeki HBV *pol/S* geni mutasyonları belirlenmiştir. Çalışmaya alınan örneklerden 38 (%45.2)'inde *pol* geninde tanımlanan primer/kompensatuvar mutasyonlar ile 7 (%8.3) örnekte *pol/S* geni örtüşmesine bağlı HBsAg aşı kaçak mutasyonları saptanmıştır. HBV genomunun organizasyonunda *pol* ve *S* genlerinin üst üste örtüşmesi nedeniyle NA ile tedavide gelişen ilaç direnci mutasyonları HBsAg'nin yapı ve fonksiyonlarını etkileyebilmektedir^{9,10}. Bu nedenle KHB'li hastalarda, NA tedavilerinde, *pol* geninin yanı sıra *S* geninin de analiz edilmesi yararlı olabilir. Bu çalışmada NA kullanılan kronik HBV hastalarında primer/kompensatuvar mutasyonların bulunması, tedavi sırasında mutasyonların geliştiğini göstermektedir ve hastalarda bu mutasyonların bulunması tedavi protokolünün değiştirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Çalışmada yer alan hastaların kullandığı antiviral ilaçlar ile bu ilaçlara gelişen mutasyonlar Tablo II'de gösterilmiştir. Kullanılan antiviral ilaca karşı gelişen mutasyon oranlarına göre mutasyon saptanan hastalar ile mutasyon saptanmayan hastalar arasındaki fark ista-

Tablo III. Kronik Hepatit B Hastalarında Antiviral Kullanımına Göre HBV *pol/S* Geninde Tanımlanan Primer/Kompansatuvar, ADAPVEM Mutasyonları

Antiviral	Mutasyon tipi	<i>pol</i> geni mutasyonları	<i>S</i> geni mutasyonu	ADAPVEM	
LAM	Primer	rtM204I	sQ129H ^a	W196L (LAM ve LdTADAPVEM'i)	
		rtM204I, rtL91I, rtQ215S		W196L (LAM ve LdTADAPVEM'i)	
		rtM204I, rtL91I	sG145A ^a	W196L (LAM ve LdTADAPVEM'i)	
		rtM204I, rtL180M		W196L (LAM ve LdTADAPVEM'i)	
		rtL180M, rtM204V, rtV173L	sI195M ^a		
		rtL180M, rt M204V		W196L (LAM ve LdTADAPVEM'i)	
		rtA181S		W172C (LAM, LdT ve ADV ADAPVEM'i)	
	Kompansatuvar	rtN238H			
		rtV214A			
		rtQ149K			
		rtQ215P			
		rtQ149K			
		rtL91I			
		rtQ215H			
rtQ215H	sS193L ^a				
rtQ149K, rtQ215P					
rtN238D, rtL229M					
rtQ215H, rtL229M					
rtQ215H, rtN238D					
LAM + ETV	Primer	rtM204I		W196L (LAM ve LdTADAPVEM'i)	
		rtM204I		W196L (LAM ve LdTADAPVEM'i)	
		rtL180M, rtM204V	sE164D ^b , sQ129P ^b	I195M (LAM ve LdT ADAPVEM'i)	
		rtM204I, rtQ215H		W196L (LAM ve LdTADAPVEM'i)	
		rtL180M, rtA181V, rtQ215H		L173F (LAM ve ADV ADAPVEM'i), S193L (ETV ile ilişkili ADAPVEM)	

Tablo III. Kronik Hepatit B Hastalarında Antiviral Kullanımına Göre HBV *pol/S* Geninde Tanımlanan Primer/Kompensatuvar, ADAPVEM Mutasyonları (devamı)

Antiviral	Mutasyon tipi	<i>pol</i> geni mutasyonları	<i>S</i> geni mutasyonu	ADAPVEM
LAM+TDF		rtQ215H		
TDF	Primer	rtL180M, rtT181		
	Kompensatuvar	rtQ149K, rtS117T		
		rtL91I		
		rtS117T	sP120R ^b	
		rtQ149K		
TDF-ETV		rtS117T		
		rtL91I, Q215S,		
		rtL229M	sS143La, sS193La	
ETV	Primer	rt I169S, rtT184L	sI123N ^b ,	
		rtT181, rtL180M	s142S ^b	
	Kompensatuvar	rtQ149K		
		rtA194V	S193L ^a	
		rtQ149K		

LAM: Lamivudin, TDV: Tenovofir, ETV: Entekavir, a: Aşı kaçacağı HBsAg mutasyonu, b: HBIg kaçacağı mutasyonu.

tistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.037$). Çalışmada ilaç direnci mutasyonu saptanan KHB hastalarında yaş arttıkça mutasyon saptanma oranının artması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Benzer çalışmalar incelendiğinde, ilaç direnci mutasyonlarının yaş ile pozitif korelasyon gösterdiğini bildiren bir çalışmaya rastlanmamış, buna karşın ilaç direnci mutasyonlar ile yaş arasında korelasyon olmadığı bir çok araştırma bildirilmiştir^{7,11}. Ayrıca diğer çalışmalarda olduğu gibi, bu çalışmada da mutasyon gelişimi ile cinsiyet arasında ilişki olmadığı belirlenmiştir^{7,11,12}.

KHB hastalarında *pol* geninde gelişen primer ilaç direnci mutasyonlarının (rtI169T, rtA181T/V, rtT184A/C/F/G/I/L/M/S, rtA194T, rtS202C/G/I, rtM204I/V, rtN236T, rtI233V ve rtM250I/L/V) yanı sıra kompensatuvar-onarıcı mutasyonlar (rtL80I/V, rtI91L, rtV173L, rtL180M, rtQ215P/S, rtN238D/S/T) da bildirilmektedir^{5,6,13,14,16,17}. Çalışmamızda NA ilaç kullanan hastalarda primer ve kompensatuvar-onarıcı mutasyonlar 10 bölgede bulunmuştur (rtL91, rtI169, rtQ149, rtV173, rtL180, rtT184, rtA194, rtM204, rtQ215 ve rtN238). Bu mutasyonlar tekli primer (rtM204I, rtI169S, rtT184L, rtA181S), primer ve kompensatuvar birlikte mutasyonlar (rtM204I/rtL91I, rtM204V + rtL180M/rtV173L) ve tekli kompensatuvar-onarıcı mutasyonlar (rtQ149K, rtQ215H/S, rtN238D, rtA194V, rtV214A, rtS117T ve rtL229M) şeklinde belirlenmiştir.

LAM kullanan hastalarda bu ilaca karşı gelişen direnci mutasyonlarından rtM204I, dört hastada tek başına primer mutasyon, dört hastada rtQ215H, rtL91I ve rtL180M kompen-

satuvur mutasyonları ile tekli ya da ikili birlikte, bir hastada rtM204V + rtL180M + rtV173L ve üç hastada rtM204V + rtL180M primer/kompensatuvar mutasyonu belirlenmiştir (Tablo III). Lamivudin tedavisi alan KHB'li hastalarda rtM204V/I + L180M mutasyonlarının birlikte gelişmesi halinde ETV kullanmamış hastalarda ETV'ye karşı da direnç gelişebileceği bildirilmektedir¹³. Bu çalışmada da benzer olarak dört hastada rtM204V/I ya da rtM204V/I + L180M mutasyonlarının birlikte görülmesi, bu hastalarda ETV'ye karşı çapraz direnç gelişimine ve tedavide başarısızlığa neden olabileceğini düşündürmektedir.

Entekavir kullanan KHB hastalarında, tedavinin başlangıcında rtM204V/I mutasyonu ve bu mutasyon tipinin seçilmesine bağlı gelişen rtT184, rtS202 veya rtM250 mutasyonları ile ETV'ye karşı direnç ortaya çıkmaktadır¹⁸. Çalışmamızda bir hastada parsiyel ETV direnci (rtT184L + rtI169S) saptanmıştır. Fenotipik olarak sınırlı duyarlılığı gösteren parsiyel mutasyonlar primer ve kompensatuvar mutasyonlar birlikte görülebilmektedir¹⁹.

Kronik HBV tedavisinde kullanılan ADV tedavisi sırasında ortaya çıkan rtA181T/V/S ve rtN236T mutasyonları gibi primer ADV direnç mutasyonlarının yanı sıra rtL80V/I, rtV84M, rtS85A, rtV214A, rtQ215S, rtP237H ve rtN238T/D gibi kompensatuvar mutasyonlar da görülebilmektedir^{13,14}. Çalışmamızda KHB tedavisi için NA kullanan 84 hastadan yalnız iki hasta ADV kullanmış ve bu hastalarda mutasyon tespit edilmemiştir. LAM kullanan bir hastada rtA181S, LAM ve ETV kullanan bir hastada rtA181V + rtL180M ve ETV kullanan bir hastada rtA194V mutasyonları belirlenmiştir. HBV rtA181S mutasyonunun ADV direnci ile ilişkili olduğu ve aynı viral genomda LAM'a dirençli bir mutasyon ile bir araya geldiği zaman çoklu ilaç direnci olabileceği birkaç çalışmada bildirilmiştir¹⁶. Bu çalışmada da benzer olarak iki hastada rtA181S primer ve rtA181T + rtL180M primer/kompensatuvar mutasyonları birlikte belirlenmiştir. Bu mutasyonların çoklu ilaç direncine yol açabileceği düşünülmektedir. ETV kullanan bir hastada saptanan rtA194T mutasyonu varlığının TDF'ye karşı dirence neden olabileceği ayrıca ADV direnci ile ilişkili rtA181T ve rtN236T mutasyonların da TDF'ye karşı duyarlılığı azaltabileceği in vitro çalışmalarda gösterilmiştir²⁰.

Çalışmamızda HBV kompensatuvar mutasyonlarından rtQ215H/P/S, rtQ149K, rt238D, rtL91I, rtS117T ve rtL229M mutasyonları 22 hastadan 16'sında tek başına, altı hastada ikili olarak belirlenmiştir. Bu kompensatuvar mutasyonlar, hem LAM ve/veya ADV tedavisi alan hem de NA tedavisi almayan KHB hastalarında sık olarak saptanmaktadır¹⁹⁻²³. Son yıllarda LAM tedavisi sırasında rtS117 ve rtL229 gibi yeni kompensatuvar mutasyonlar da bildirilmektedir^{21,22}. Çalışmamızda LAM kullanan iki hastada ve TDF kullanan bir hastada rtL229M ve TDF kullanan üç hastada rtS117T/G kompensatuvar mutasyonları belirlenmiştir. Kompensatuvar mutasyonların bir kısmı antiviral ilaç kullanılsa bile diğer NA'ları ile çapraz dirence ya da çoklu ilaç direncine neden olarak tedavi başarısızlığına yol açabildiği bildirilmektedir²³. Bu tip kompensatuvar mutasyonları ülkemizde bildiren çalışmalar bulunmaktadır^{6,17,23-25}. HBV'nin çembersel yapısındaki genomunda (*S*) geni ile *pol* geninin üst üste örtüşmesi, *pol* genindeki primer ya da kompensatuvar mutasyonların yanı sıra HBsAg ile ilişkili aminoasit değişikliklerine de neden olabilmektedir. Son yıllarda HBV *pol/S* geni örtüşmesi sonucu gelişen bu mutasyonlar için ADAPVEM kavramı kullanılmaya baş-

lanmıştır⁵. Ayrıca kullanılan antivirallere bağlı olarak gelişen rtM204I/sI195M ve rtM204V/sW196S *pol/S* gen varyantı kombinasyonlarının HBsAg antijenitesini düşürdüğü bildirilmektedir^{5,9}. Aşı kaçığı mutasyonları olarak da tanımlanan bu mutasyonlar tanıda HBsAg yalancı negatifliklere yol açabilmektedir. Çalışmamızda hastalarda (*S*) geni ile *pol* geninin üst üste örtüşmesi sonucunda HBsAg mutasyonları (sT126I, sP120S, sG145A, sS193L, sP120R, sT123N, sE164D, sY134F, sQ129H, sT118A, sP127K, sI110L, sT127P, sS114A, sT123A, sT131I) belirlenmiş, kronik HBV sekiz hastada *pol* gen mutasyonları ile birlikte saptanmıştır. Bu *S* geni mutasyonları; KHB hastalarının %31.3'ünde immün kaçak, %1.5 oranında HBlg kaçığı, %8.3 tanı kaçığı mutasyonu olarak dağılım göstermiştir.

KHB enfeksiyonlarında ADAPVEM sonucu ortaya çıkan mutant HBV tiplerinin, sokak tipi HBV ile aşılanmış ya da aşılanmamış bireyler için potansiyel risk olduğu bilinmektedir. Bu mutasyon, ucuz bir ilaç olan LAM'ın tedavide ülkemiz ve bazı Asya ülkelerinde yaygın kullanılması nedeniyle daha fazla oranda görülebilmektedir²⁴. Ülkemizde yapılan ADAPVEM mutasyonlarını belirleyen bazı çalışmalarda mutasyon oranları %10, %17.9 ve %24 olarak bildirilmiştir^{19,23,24}. Çalışmamızda ise ADAPVEM mutasyonları %15.4 olarak belirlenmiştir. HBV *pol* geninde meydana gelen rtA181T/V, rtM204I ve rtM204V gibi ilaç direnç mutasyonları çakışma gösterdiği *S* geninde rtA181T/sW172*, rtM204I/sW196* ve rtV191I/sW182* gibi stop kodon mutasyonlarına yol açtığı belirtilmektedir²⁶. Çalışmamızda LAM kullanan sekiz hastada rtM204I/sW196L ADAPVEM'i ve bir hastada rtA181S mutasyonu ile birlikte sW172C ADAPVEM'i belirlenmiştir. rtA181T/S-sW172* mutasyonunun hepatoselüler karsinomaya (HSK) ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmektedir^{14,15}. ADAPVEM'lerin vertikal yoldan aktarılabilsinin mümkün olması bu mutasyonlu kökenler ile enfekte annelerden doğan bebeklerde aşı ve immün serum uygulamalarının yetersiz yanıt alınmasına yol açabilmektedir²⁵. LAM ve LdT ile seçilmiş sE164D, sI195M, sW196 ve sW196L mutasyonlarının HBsAg'nin hepatit B yüzey antikoruna (anti-HBs)'na bağlanmayı azalttığı gösterilmiştir⁹. Bu nedenle çalışmamızda da olduğu gibi, NA tedavisi altında olan ve tedavi almayan hastalarda *pol* geni mutasyonlarının yanı sıra *pol/S* gen çakışma mutasyonlarının birlikte analiz edilerek değerlendirilmesi yararlı olabilir. Ayrıca bu mutasyonlu suşlar aşılanmış bireylere bulaşabileceği için, lokal ya da global hepatit B bağışıklama programlarında risk oluşturabilir^{5,26}.

Günümüzde kronik HBV enfeksiyonunun tedavisi, en düşük genotipik dirence sahip, en etkin antiviral kullanarak tedaviye monoterapi ile başlanarak ve antiviral cevabı zaman içerisinde takip edilerek gerçekleştirilmektedir. Tedavinin başarısız olduğu durumlarda dirence neden olan mutasyonun belirlenmesi ve gerektiğinde ilaç değişikliğinin yapılması tedavi başarısı açısından çok önemlidir²⁷. Tedavi başarısızlığına yol açarak gereksiz ilaç değişikliğinin önüne geçebilmek için kompensatuvar mutasyonları da bildirmek gereklidir. Tedavi ile gelişebilecek primer, kompensatuvar ve potansiyel yeni mutasyonların belirlenmesinde direkt dizi analizi yöntemi, en tercih edilen ve altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir²⁸.

Sonuç olarak, çalışmamızda KHB'li hastalarda NA tedavilerinde, klinik ve epidemiyolojik önemdeki HBV *pol/S* geni mutasyonları belirlenmiş ve mutasyon profilleri literatür-

deki verilerle benzerlik göstermiştir. KHB'li hastalarda NA tedavilerine bağlı olarak gelişen potansiyel aşı kaçacağı mutasyonları; toplumda aşıllı olan tüm bireyler için, HBV enfeksiyonu açısından önemli bir risk oluşturabilir. Bu nedenle KHB tedavisi sırasında NA mutasyonlarının analizinin yanı sıra genotiplerin ve *pol* geni ile çakışan HBV *S* geninin birlikte değerlendirilmesi, NA tedavilerine bağlı olarak gelişebilecek potansiyel aşı kaçacağı HBsAg mutasyonlarının belirlenmesi ve tedavinin yeniden düzenlenmesinde yararlı olacaktır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Sonneveld MJ, Harry Janssen HLA. Chronic hepatitis B: peginterferon or nucleos(t)ide analogues? *Liver Int.* 2011;31(1):78-84.
2. Locarnini S. Transmission of antiviral drug resistant hepatitis B virus: implications for public health and patient management. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25(4):649-56.
3. Qian F, Qin J, Li D, Ma Z, Zhang H, Jin F, et al. Monitoring of genotypic resistance profile in chronic hepatitis B patients receiving nucleos(t)ide analogues in Huzhou, China. *J Infect Dev Ctries* 2016;10(9):996-1002.
4. Locarnini S, Bowden S. Drug resistance in antiviral therapy. *Clin Liver Dis* 2010;14(3):439-59.
5. Sayan M, Buğdacı MS. Nükleoz(t)id analogları tedavisi altında HBV aşı kaçacağı mutasyonları gelişen bir kronik Hepatit B olgusu. *Mikrobiyol Bul* 2013;47(3):544-9.
6. Ciftci S, Keskin F, Cakiris A, Akyüz F, Pınarbaşı B, Abacı N, et al. Analysis of potential antiviral resistance mutation profiles within the HBV reverse transcriptase in untreated chronic hepatitis B patients using an ultra-deep pyrosequencing method. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;79(1):25-30.
7. Liu BM, Li T, Xu J, Li XG, Dong JP, Yang P, et al. Characterization of potential antiviral resistance mutations in hepatitis B virus reverse transcriptase sequences in treatment-naïve Chinese patients. *Antiviral Res* 2010;85(3):512-9.
8. Avellon A, Echevarria JM. Frequency of Hepatitis B virus "a" determinant variants in unselected spanish chronic carriers. *J Med Virol* 2006;78(1):24-36.
9. Torresi J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Clin Virol* 2002;25(2):97-06.
10. Clements CJ, Coghlan B, Creati M, Locarnini S, Tedder RS, Torresi J. Global control of hepatitis B virus: Does treatment-induced antigenic change affect immunization? *Bull World Health Organ* 2010;88(1):66-3.
11. Li P, Geng J, Li W, Xu X, Zhang X, Zheng W. Antiviral efficacy of entecavir for hepatitis B virus rtA181V/T mutants. *Virol J* 2017;14:68.
12. Xiaohong H, Fang W, Bin H, Peisong C, Liangying Z. Detection and analysis of resistance mutations of hepatitis B virus. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(6):9630-39.
13. Sayan M, Hülügü S, Çetin Akhan S, Şentürk Ö, Meriç M, Çekmen M. Lamivudin tedavisi uygulanmış ve entekavir naif kronik hepatit B'li hastalarda entekavir ilaç direnci. *Mikrobiyol Bul* 2009;43(3):425-32.
14. Li XG, Liu BM, Xu J, Liu XE, Ding H, Li T. Discrepancy of potential antiviral resistance mutation profiles within the HBV reverse transcriptase between nucleos(t)ide analogue-untreated and -treated patients with chronic hepatitis B in a hospital in China. *J Med Virol* 2012;84(2):207-16.
15. Lapinski TW, Pogorzelska J, Flisiak R. HBV mutations and their clinical significance. *Adv Med Sci* 2012;57(1):18-22.
16. Liu Y, Li X, Xin S, Xu Z, Chen R, Yang J, et al. The rtA181S mutation of hepatitis B virus primarily confers resistance to adefovir dipivoxil. *J Viral Hepat* 2015;22(3):328-34.

17. Sayan M, Şentürk Ö, Akhan SC, Hülagü S, Çekmen MB. Monitoring of hepatitis B virus surface antigen escape mutations and concomitantly nucleos(t)ide analog resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis* 2010;14(Suppl 3):e136-41.
18. Sayan M. Molecular diagnosis of entecavir resistance. *Hepat Mon* 2010;10(1):42-7.
19. Özgüler M, Sayan M. Could resistant and escape variants of hepatitis B virus be a problem in the future? *Future Virol* 2018;13(3):171-9.
20. Motahar M, Arabzadeh SAM, Mollaei H, Iranmanesh Z, Nikpour N, Soleimani F. Evaluation of HBV resistance to tenofovir in patients with chronic hepatitis B using ZNA probe assay in Kerman, southeast of Iran. *Asian Pac J Trop Dis* 2016;6(7):513-6.
21. Lin CL, Chien RN, Hu CC, Lai MW, Yeh CT. Identification of hepatitis B virus rtS117F substitution as a compensatory mutation for rtM204I during lamivudine therapy. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(1):39-48.
22. Ji D, Liu Y, Li L, Xu Z, Si LL, Dai JZ, et al. The rtL229 substitutions in the reverse transcriptase region of hepatitis B virus (HBV) polymerase are potentially associated with lamivudine resistance as a compensatory mutation. *J Clin Virol* 2012;54(1):66-72.
23. Arıkan A. KKTC’de tedavi naif hepatit B’li hastalarda genotip/subgenotip dağılımı ve nükleoz(t)id analog direnci. Doktora tezi, 2015.
24. Altındış M, Aslan FG, Köroğlu M, Eren A, Demir L, Uslan Mİ, et al. Tedavi almamış kronik hepatit B olgularında ilaç direnci ilişkili kompensatuvar mutasyonlar. *Viral Hepat J* 2016;22(3):103-7.
25. Sayan M, Akhan SC. Antiviral drug-associated potential vaccine-escape hepatitis B virus mutants in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Inter J Infect Dis* 2011;15:e722-6.
26. Wu C, Chen Y, Cao L, Chen X, Lu M. Hepatitis B virus infection: defective surface antigen expression and pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2018;24(31):3488-99.
27. Bozdayı M, Karataylı E. Hepatit B virüs enfeksiyonlarında anti-viral ilaç direnci- mikrobiyolojik yaklaşım. s.53. *Viral Hepatit Kongresi, Kongre Kitabı, 2009 Antalya, 2009.*
28. Sayan M, Akhan SC, Şentürk Ö. Frequency and mutation patterns of resistance in patients with chronic hepatitis B infection treated with nucleos(t)ide analogs in add-on and switch strategies. *Hepat Mon* 2011;11(10):835-42.