

Viral Hepatit B Hastalarında İlk Tedavi Öncesi Revers Transkriptaz İnhibitörü Nükleozid Analogu İlaç Direnç Profilinin Belirlenmesi

Determination of Reverse Transcriptase Inhibitor Nucleoside Analogue Resistance Profile in Pretreatment Phase of Patients with Viral Hepatitis B

Zehra ÖKSÜZ¹, Mehmet Sami SERİN¹, Ayşe SERİN², Orhan SEZGİN³, Serpil GONCA⁴

¹ Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

¹ Mersin University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Mersin, Turkey.

² Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı, Adana.

² Cukurova University Faculty of Medicine, Department of Forensic Medicine, Adana, Turkey.

³ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Mersin.

³ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Gastroenterology, Mersin, Turkey.

⁴ Mersin Üniversitesi, İleri Teknoloji Araştırma ve Eğitim Merkezi, Mersin.

⁴ Mersin University, Advanced Technology Research, and Education Centre, Mersin, Turkey.

* Bu çalışma, Dr. Zehra Öksüz'ün 2015-TP3-1213 nolu doktora tez projesi kapsamında yapılmıştır. Bu çalışma sonuçlarının bir bölümü, 2. Uluslararası Gazi Farma Sempozyum Serileri [2. International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS), 11-13 October 2017, Ankara]'nde ve İlaç Keşfi ve Tedavisi Dünya Kongresi [Drug Discovery & Therapy World Congress (DDTWC), 10-13 Haziran 2017, Boston ABD]'sinde bildiri olarak sunulmuştur.

Makale Atfı: Öksüz Z, Serin MS, Serin A, Sezgin O, Gonca S. Viral hepatit B hastalarında ilk tedavi öncesi revers transkriptaz inhibitörü nükleozid analogu ilaç direnç profilinin belirlenmesi. Mikrobiyol Bul 2019;53(2):156-169.

ÖZ

Hepatit B virüsü (HBV), viral hepatit B hastalığının etkeni olan bir DNA virüsüdür. Hepatit B bulaşıcı bir enfeksiyondur ve halen tüm dünyada önemli bir sağlık sorunudur. Enfeksiyon kronikleştiği zaman karaciğerde fibrozis, siroz ve/veya hepatoselüler karsinoma gibi ciddi hastalıklara neden olabilmektedir. Tedavisinde intravenöz yol ile verilen interferon/pegile interferon veya oral yoldan verilen lamivudin, adefovir, entekavir, telbivudin, tenofovir gibi nükleozid/nükleotid analogu ilaçlar kullanılmaktadır. Ancak HBV'nin replikasyon stratejisi ve biyolojik özelliklerinden dolayı, zamanla ilaçtan ilaca değişiklik göstermekle birlikte, farklı oranlarda bu ilaçlara karşı antiviral dirence neden olan mutasyonlar ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde dirençli hale gelen virüslerin hastalardan sağlam bireylere bulaşabilme olasılığı bulunmaktadır. Bu nedenle tedavi öncesinde de ilaca dirençli HBV ile enfeksiyon gelişme olasılığı bulunmaktadır. Antiviral direnç mutasyonları; i) nükleozid analogu (NA) ilişkili mutasyonlar, ii) primer ilaç direnci mutasyonları, iii) sekonder/telafi edici mutasyonlar, iv) varsayılan antiviral direnç mutasyonları ve tedavi öncesi varyasyonları olmak üzere dört kategoriye ayrılmıştır. Özellikle son dönemdeki çalışmalar varsayılan mutasyonlar ve tedavi öncesi varyasyonlar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu çalışmada, NA tedavisi almış ve almamış kronik hepatit B (KHB) hastalarında antiviral direnç profillerinin daha iyi anlaşılması ve buna bağlı olarak ortaya

İletişim (Correspondence): Arş. Gör. Dr. Zehra Öksüz, Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 324-341 281512160, **E-posta (E-mail):** zehraoaksuz@gmail.com

çıkan gereksiz ilaç kullanımı, yan etki ve ekonomik zararları önemli ölçüde minimize edecek sonuçlara ulaşmak amaçlanmıştır. Çalışmaya NA ilaçlardan biriyle tedavi edilmiş 72 hasta ve herhangi bir NA ilaç ile tedavi edilmemiş 52 hasta olmak üzere toplam 124 hasta dahil edilmiştir. Bu bireylere ait plazma örneklerinden DNA izole edilerek, HBV genomunda tüm nükleozid analoglarının bağlandığı, revers transkriptaz bölgesi içerisinde yer alan B, C ve D alan bölgelerini içine alan 511 baz çift (bp)'lik DNA bölgesi 'nested' polimeraz zincir reaksiyonu (nPCR) ile çoğaltılarak DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Tedavi alan 72 hastanın 13 (%18.05)'ünde ve tedavi almamış 52 hastanın 18 (%34.61)'inde farklı mutasyonlar belirlenmiştir ($p < 0.05$). Hasta örneklerinin hiçbirinde rtI169T, rtA181T/V, rtT184A/C/F/G/I/L/M/S, rtA194T, rtS202C/G/I, rtM204I/V/S, rtN236T, rtM250I/L/V ve rtV173L gibi primer ilaç direnci ile ilişkili mutasyonlar belirlenememiş olmakla birlikte, revers transkriptaz geninin B, C, D ve E alan bölgelerinde belirlenmiş rtR164R, rtG165D/A, rtG172Q, rtS176N, rtF178V, rtA181G, rtS185N/G/C, rtV207M, rtQ215H/S, rtL231V, rtI233K, rtN238S, rtV253T, rtC256G/S ve rtI266R/V mutasyonlarının ilaç direnciyle ilişkili olma potansiyeli gözlenmiştir. Çalışmamızdaki bulgular kapsamında tedavi öncesi varyasyonların tespit edilmesi ile daha iyi tedavi yönetimi için doğru antiviral ilacı seçmede yardımcı olabileceğini düşündüğümüz veriler elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Hepatit B virüsü; nükleozid analogu ilaçlar; polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); mutasyon; antiviral direnç.

ABSTRACT

HBV is a DNA virus and the causative agent of hepatitis B infection. Hepatitis B is a contagious disease and is still a major health problem all over the world. When the infection become chronic, it may cause serious diseases such as fibrosis, cirrhosis and/or hepatocellular carcinoma. Interferon/pegylated interferon by intravenous route and nucleoside/nucleotide (NA) analogues such as lamivudine, adefovir, entecavir, telbivudine and tenofovir given by oral route are used in the treatment. Antivirals given by oral route are mostly preferred in the treatment. However, because of the replication strategy and biological properties of HBV, mutations that cause antiviral resistance against these drugs can occur at different rates, although they can vary from drug to drug over time. It is possible that drug resistant virus may transmit from patient to healthy individuals. Therefore, there is a possibility of infection with drug-resistant HBV before treatment. Antiviral resistance mutations are divided into four categories; *i*) Nucleos(t)ide analog resistance (NAR)-related mutations, *ii*) primary drug resistance mutations, *iii*) secondary/compensatory mutations, *iv*) putative antiviral resistance mutations and pre-treatment variations. Recent studies have focused particularly on putative mutations and pre-treatment variations. The aim of this study was to better understanding of the antiviral resistance profiles of chronic hepatitis B (CHB) patients treated and untreated with NA, and help to prevent unnecessary drug use, minimize the side effects and economic damages. A total of 124 patients who have received nucleoside analog (NA) drug treatments ($n = 72$) and patients without NA treatment ($n = 52$) were included in the study. Viral DNA was isolated from the plasma samples of the patients. A DNA fragment, which is 551 bp, was amplified and sequenced including the binding side of all nucleoside analogs containing the B, C and D domains located in the reverse transcriptase region in the HBV genome. Different types of mutations were detected in 13 (18.05%) of 72 treated patients and in 18 (34.61%) of 52 untreated patients ($p < 0.05$). Primary drug resistance mutations such as rtI169T, rtA181T/V, rtT184A/C/F/G/I/L/M/S, rtA194T, rtS202C/G/I, rtM204I/V/S, rtN236T, rtM250I/L/V and rtV173L were not detected in any of the patient samples. However, potential drug resistance mutations such as rtR164R, rtG165D/A, rtG172Q, rtS176N, rtF178V, rtA181G, rtS185N/G/C, rtV207M, rtQ215H/S, rtL231V, rtI233K, rtN238S, rtV253T, rtC256G/S and rtI266R/V were detected in untreated patient samples in B, C, D and D domains of reverse transcriptase region. Our results have suggested that the detection of pretreatment variations could be helpful for choosing the correct antiviral drug for the better treatment management.

Keywords: Hepatitis B virus; nucleoside analog drugs; polymerase chain reaction (PCR); mutation; antiviral resistance.

GİRİŞ

Dünya çapında önemli sağlık sorunlarına yol açabilen hepatit B virüsü (HBV), karaciğer fibrozisi, siroz ve/veya hepatoselüler karsinoma (HSK) gibi ciddi komplikasyonlara neden olabilmektedir. HBV genomu yaklaşık 3200 baz büyüklüğünde olup 'proofreading' aktivitesi eksik olan HBV revers transkriptazı (RT) kodlamaktadır¹. Bu enzimin eksikliğinden dolayı, tüm genom içindeki her nükleotid pozisyonunda hızla mutasyonlar meydana gelmekte ve bu mutasyonlar HBV varyantlarının oluşmasına neden olabilmektedir^{2,3}. Bu tür mutasyonların viral hastalığın patogenezi ve antiviral direnç üzerinde önemli etkileri olabileceği bilinmektedir². Son yıllarda, lamivudin (LAM), adefovir dipivoksil (ADV), entekavir (ETV), tenofovir (TDF) ve telbivudinin (LdT) dahil olduğu oral nükleozid analoğu (NA) ilaçların HBV enfeksiyonu kontrolüne ciddi katkılar sağladıkları bilinmektedir^{4,5}. Ancak HBV polimerazın revers transkriptaz aktivitesini doğrudan inhibe eden NA'ların uzun süreli kullanımı, ilaç direncinin gelişmesine yol açabilmektedir⁶. Önceki çalışmalarda HBV RT bölgesinde 42 potansiyel NA direnci ile ilişkili aminoasit değişikliği bölgesi tanımlanmıştır. İn vitro fenotip direnç verilerine bağlı olarak bu bölgelerdeki NA ile ilişkili mutasyonlar; primer ilaç direnci mutasyonları (kategori 1), sekonder/telafi edici mutasyonlar (kategori 2), varsayılan antiviral direnç mutasyonları (kategori 3) ve tedavi öncesi varyasyonları (kategori 4) olmak üzere dört kategoriye ayrılabilir (Tablo I)⁷⁻¹⁰.

Gelişen dirençli virüslerin HBV ile enfekte olmuş hastalardan sağlıklı bireylere bulaşabilme olasılığı bulunmaktadır. Bildiğimiz kadarıyla, NA ile tedavi edilmemiş kronik hepatit B (KHB) hastalarında varsayılan antiviral direnç klonlarının yaygınlığı sınırlı sayıdaki çalışmada elde edilmiştir². Bu çalışmaların sınırlılığı, önceki çalışmaların primer mutasyonlara (kategori 1) ve ikincil/telafi edici mutasyonlara (kategori 2) odaklanmış olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu yüzden son dönemdeki çalışmalar varsayılan mutasyonlar (kategori 3) ve tedavi öncesi varyasyonlarla (kategori 4) ilgili çalışmalardır^{11,12} (Tablo I). NA ile tedavi edilmiş ve edilmemiş KHB hastalarında antiviral direnç profillerinin daha iyi anlaşılması, gereksiz ilaç kullanımı ve buna bağlı olarak ortaya çıkan zaman kaybı, yan etki ve ekonomik zararları önemli ölçüde minimize edecek bulgular sağlayacaktır^{13,14}. Bu nedenle, bu çalışmada herhangi bir NA ile tedavi edilmiş ve edilmemiş naif KHB hastalarında tek seferde "nested" polimeraz zincir reaksiyonu (nPCR) ve DNA dizi analizi yaparak NA mutasyon profilleri arasındaki farklılıkları belirlemek ve antiviral ilaca dirençli HBV'nin evriminde, üçüncü ve dördüncü kategorilerde ortaya çıkan aminoasit değişikliğinin rolünü ortaya koymak amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi ve her hastadan bilgilendirilmiş onam formu alındı (Tarih: 12.02.2015 ve Karar No. 2015/53).

Tablo 1. Hepatit B Virüsü Revers Transkriptaz Bölgesindeki Potansiyel Nükleozid Analogu Mutasyonları (pozisyon 42 mutasyon)⁷⁻¹⁰

Mutasyon kategorisi	Referans tipi	Tedavi ile ilişkisi
1. Primer ilaç direnci mutasyonları	I169T	ETV
	A181T/V	LAM, LdT, ADV, TDF
	T184A/C/F/G/I/L/M/S	ETV
	A194T	ADV, TDF
	S202C/G/I	ETV
	M204I/V/S	LAM, ETV, LdT, TDF
	N236T	ADV, TDF
	M250I/L/V	ETV
2. Sekonder/telafi edici mutasyonları	L80I/V, V173L	LAM
	L180M	LAM, ETV, LdT
3. Varsayılan NA mutasyonları	S53N	LAM
	T54N	ADV
	L82M	LAM
	V84M, S85A	ADV
	I91L	LAM
	Y126C	ADV
	T128I, T128N, N139D, W153Q,	LAM
	F166L	
	V191I	LAM, ADV
	A200V, V207I	LAM
	S213T, V214A	ADV
	Q215P/S	LAM, ADV
	L217R, E218D, F221Y	ADV
L229G/V/W	LAM	
I233V, P237H, N238D/S/T, Y245H	ADV	
S/C256G	LAM, ETV	
4. Tedavi öncesi mutasyonları	T38A, Y124H, D134E, N139K/H,	Tedavi öncesi
	I224V, R242A	

LAM: Lamivudin, ADV: Adefovir dipivoksil, ETV: Entekavir, TDF: Tenofovir, LdT: Telbivudin.

Hasta Grubu ve Klinik Örnekler

Çalışmaya Mersin Üniversitesi Hastanesi Gastroenteroloji Bölümünde takibi yapılan ve NA ile tedavi edilen 72 hasta ile NA tedavisi almamış olan 52 hasta dahil edildi. Çalışmaya hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) ve HBV DNA'sı pozitif KHB hastaları dışında hepatit

C virüsü (HCV)/hepatit delta virüsü (HDV)/insan immünyetmezlik virüsü (HIV) koenfeksiyonu ve/veya otoimmün karaciğer hastalığı olan hastalar dahil edilmedi.

HBV DNA İzolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu

HBV DNA, üretici firmanın önerileri doğrultusunda MagJET viral DNA ve RNA (Thermo Fisher Scientific, Litvanya) kiti kullanılarak 200 µl serum örneklerinden ekstrakte edildi. Tüm NA'ların HBV genomuna bağlandığı 511 bp DNA bölgesi, nPCR ile amplifiye edildi. PCR için kullanılan dizi, özellikle Türkiye'de yapılan çalışmalarda belirlenen ve D genotipine ait referans dizi olan AY721609 gen bankasından indirilerek Vektör NTI 11.5 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Litvanya) programıyla bu çalışmada tasarlandı. İlk tur PCR'de hedef bölge için kullanılan sense ve antisense primerler sırasıyla 5'-TGT GTC TGC GGC GTT TTA TC-3' ve 5'-GCA GGA TAA CCG CAT TGT GT-3' iken, ikinci tur PCR'de hedef bölge için kullanılan internal sense ve antisense primerler sırasıyla 5'-CAA GGA ACC TCT ATG TAT CC-3' ve 5'-GCA GGA TAA CCG CAT TGT GT-3'tür. Isı döngü cihazında, 95°C'de 5 dk bekletildikten sonra 94°C'de 30 sn denatürasyon, 56°C'de 30 sn primer bağlanması ve 72°C'de 45 sn uzama olmak üzere toplam 30 döngü gerçekleştirildi. Ardından ikinci PCR reaksiyonu 95°C'de 5 dk bekletildikten sonra 30 döngü 94°C'de 30 sn denatürasyon, 55°C'de 30 sn primer bağlanması ve 72°C'de 45 sn uzama şeklinde devam eden program ile çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri, %1.5 agaroz jelde elektroforezde yürütüldü.

DNA Dizi Analizi

PCR ürünleri DNA dizi analizi yapılması amacıyla GeneJET PCR saflaştırma kiti (Thermo Fisher Scientific, Litvanya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırıldı. BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing Kit (Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific, Litvanya) kullanılarak her bir örnek için, 0.75 µl 5X dizi analizi tamponu, 0.5 µl Sequencing RR-100, 5.75 µl distile su ve 1 µl primer (HBV rt internal sense) içeren reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR, ısı döngü cihazında 96°C'de 1 dk bekletilmenin ardından 30 döngü 96°C'de 5 sn denatürasyon, 50°C'de 5 sn bağlanma, 60°C'de 4 dk şeklinde gerçekleştirildi. Dizi analiz örnekleri Sephadex® G-50 ile saflaştırıldı ve kromatogramlarının elde edilmesi için kapiller elektroforeze (ABI 3130 -POP-7 polymer- Applied Biosystems, ABD) yüklendi.

İstatistiksel Analiz ve Değerlendirme

Kapiler elektroforez ile elde edilen kromatogramların dijital veri dosyaları, VECTOR NTI 11.5 (Invitrogen) ve MEGA 7.0.21 bilgisayar programları kullanılarak özellikle Türkiye'de yapılan çalışmalarda belirlenen ve D genotipine ait olan referans diziler ile (Z35716, AY721609, AY721605, AY796030, AY661792, AY741796, AY796031 X72702) bizim elde ettiğimiz dizilerin hizalanması (alignment) ve karşılaştırması yapılarak bu dizilerin aminoasit translasyonları yapıldı. Farklı aminoasit karşılıkları içeren polimorfizmler mutasyon olarak değerlendirildi. Ayrıca, NA ile tedavi edilen hastalarla NA ile tedavi edilmeyen naif hastalar istatistiksel olarak Chi-square ya da Fisher's exact test ile karşılaştırıldı ve

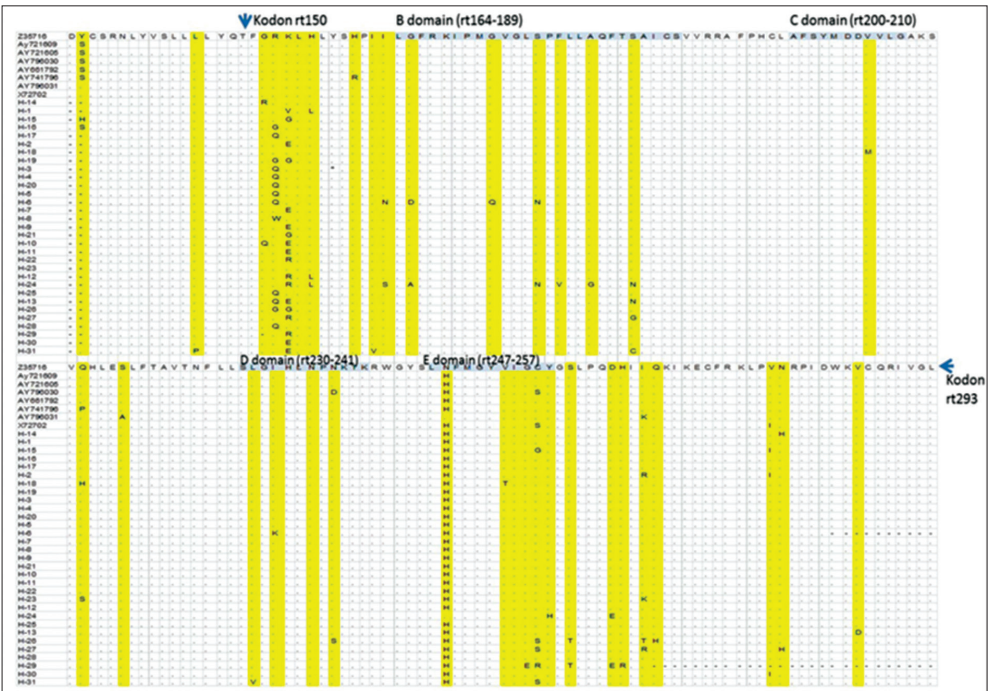
$p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analiz, Prism for Windows (ver 6.01) programı kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Belirlenen tüm mutasyonlar, çalışılan kodon rt150-293 arasında kalan RT bölgesinin A-B, B, B-C, C, C-D, D, D-E, E ve E- alanlarındaki konum, mutasyon çeşidi ve sayılarına göre kategorize edilmiştir (Şekil 1).

Farklı aminoasit içeren polimorfizmler mutasyon olarak değerlendirilmiştir. NA ile tedavi edilen 72 hastanın 13 (%18.05)'ünde ve NA ile tedavi edilmeyen naif 52 hastanın 18 (%34.61)'inde farklı mutasyon türleri saptanmıştır ($p < 0.05$). Mutasyon tespit edilen NA tedavisi almış hastalardan dört tanesi ETV, altı tanesi TDF, iki tanesi ADV ve bir tanesi de LdT + LAM kullanmıştır (Tablo II) (Tablo III).

En fazla mutasyon A-B alanları arasında (inter-domain) belirlenmiştir. NA tedavisi alan ve mutasyon belirlenen 13 örneğin tamamında (%100) A-B alanları arası bölgede değişik sayılarda ve türlerde mutasyon belirlenirken, NA tedavisi almamış naif 18 takip hastasının 16 (%88.88)'sında bu bölgede mutasyon belirlenmiştir. Her iki grup arasında A-B alan mutasyonları bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p = 0.3290$). A-B alanlar arası bölgede belirlenen aminoasit değişiklik



Şekil 1. Referans olarak kullanılan sekiz dizi ve mutasyon belirlenen toplam 31 örneğe (NA tedavisi almış ve almamış) ait diziler.

oranları çalışılan 143 kodon üzerinden hesaplanmış ve tedavi alan hastalarda bu oran %12.58, tedavi almamış takip hastalarında ise %15.38 olarak hesaplanmıştır (Tablo II, Tablo III). Bu oranlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p= 0.3398$). Bu bölgede kodon 153 ve 154'te belirlenen mutasyonlar en fazla belirlenen mutasyonlar olmuştur. Tedavi alan hasta grubunda toplam altı hastada rtR153Q/W, sekiz hastada ise rtK154V/E/R mutasyonları belirlenmiştir. Ayrıca, bir hastada rtG152Q, bir hastada rtH156L, bir hastada da rtI163N motif mutasyonu belirlenmiştir (Tablo II). Tedavi almayan takip hastalarında da benzer şekilde kodon 153 ve 154'te tespit edilen mutasyonlar en fazla belirlenen mutasyonlar olarak saptanmıştır. Toplam yedi hastada rtR153G/Q, sekiz hastada rtK154G/R/D mutasyonu belirlenmiştir. Ayrıca birer hastada rtG152R ve rtG155E, ikişer hastada rtG156L ve rtI163S/V ve bir hastada da rtS159T mutasyonu belirlenmiştir (Tablo III).

Tablo II. Nükleozid Analogu Tedavisi Almış Hastalarda rtA-E Alanları Arasında Kalan Kısımda Belirlenen Mutasyonlar ve 143 Kodona Göre Değişiklik Oranları (%)

Hasta no	İlaç	rt A-E alanları arasında belirlenen mutasyonlar								
		A-B	B	B-C	C	C-D	D	D-E	E	E-
T-1	ETV	K154V H156L								
T-2	TDF	K154E								I266R V278I
T-3	ETV	R153Q								
T-4	ADV	R153Q								
T-5	TDF	R153Q								
T-6	TDF	R153Q I163N	G165D G172Q S176N				I233K			
T-7	LAM	K154E								
T-8	TDF	R153W								
T-9	TDF	K154E								
T-10	ETV	G152Q K154E								
T-11	TDF	K154E								
T-12	ETV	K154R H156L								
T-13	TDF	R153Q K154E	S158N							V286D
Toplam aminoasit değişiklik oranı (%)		12.58	2.79	0	0	0	0.69	0	0	2.09

T: Nükleozid analogu tedavisi alan hasta, LAM: Lamivudin, ADV: Adefovir dipivoksil, ETV: Entekavir, TDF: Tenofovir, LdT: Telbivudin.

Tablo III. Nükleozid Analöğü Tedavisi Almamış Hastalarda rtA-E Alanları Arasında Belirlenen Mutasyonlar ve 143 Kodona Göre Değişiklik Oranları (%)

Hasta no	rtA-E alanları arasında belirlenen mutasyonlar								
	A-B	B	B-C	C	C-D	D	D-E	E	E-
UT-1	G152R								N279H
UT-2	K154E							C256G	V278I
UT-3	R153G								
UT-4	R153Q								
UT-5				V207M	Q215H			V253T	
UT-6	R153G								
	K154G								
UT-7	R153Q								
UT-8	K154G								
UT-9	K154R								
UT-10					Q215S				I266K
UT-11	K154R	G165A							
	H156L	S176N							
	I163S	F178V							
		A181G							
		S185N							
UT-12	R153Q								
UT-13	R153G	S158N				N238S			C259S
	K154D								S262T
									I269T
									Q270H
UT-14	K154R	S185G						C256S	I266R
									N279H
UT-15	R153Q								
UT-16	K154R	R164R							
	G155E								
	G156L								
	S159T								
UT-17									V278I
UT-18	I163V	S185C				L231V		C256S	
Toplam aminoasit değişiklik oranı (%)	15.38	5.59	0	0.69	1.39	1.39	0	2.79	

UT: Nükleozid analöğü tedavisi almayan hasta.

İlaç tedavisi almış 13 hastadan 2 (%15.38)'sinde B alan bölgesinde toplam dört mutasyon belirlenmiştir. Bu hastalardan birinde rtG165D, rtG172Q, rtS176N, diğerinde ise rtS185N mutasyonu belirlenmiştir (Tablo II). Tedavi almamış 18 takip hastasının 4 (%22.22)'ünde B alan bölgesinde toplam sekiz mutasyon belirlenmiştir. Bunların; bir hastada rtG165A, rtS176N, rtF178V, rtA181G ve rtS185N, bir hastada rtS185G, bir hastada rtR164R ve bir hastada da rtS185C mutasyonları olduğu belirlenmiştir (Tablo III). NA tedavisi almış ve almamış takip hastalarındaki B alan bölgesi mutasyonları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p= 0.5007$).

NA tedavisi alan 13 hastanın hiçbirinde C alanı bölgesinde mutasyon belirlenmemiştir. Ancak NA tedavisi almayan 18 takip hastasından 1 (%5.55)'inde rtV207M mutasyonu belirlenmiştir (Tablo III). Her iki grup arasında C alanı bölge mutasyonları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p= 0.5806$).

NA tedavisi alan 13 hastanın hiçbirinde C-D alanlar arası bölgede mutasyon belirlenmemiştir. Ancak NA tedavisi almayan 18 takip hastasından 2 (%11.11)'sinde rtQ215H ve rtQ215S mutasyonları belirlenmiştir (Tablo III). Her iki grup arasında C-D alanları arası bölge mutasyonları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p= 0.3290$).

D alanı bölgesinde ilaç tedavisi alan 13 hastanın 1 (%7.69)'inde rtI233K mutasyonu ve ilaç tedavisi almayan 18 takip hastasından 2 (%11.11)'sinde her hastada bir adet olmak üzere rtL231V ve rtN238S mutasyonları belirlenmiştir (Tablo II, Tablo III). Her iki grup arasında D alanı bölgesi mutasyonları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p= 0.6240$).

NA tedavisi alan 13 hastanın hiçbirisinde E alanı bölgesinde mutasyon belirlenmemiştir. NA tedavisi almayan 18 takip hastasından 4 (%22.22)'ünde mutasyon belirlenmiş olup bu mutasyonlar; birer hastada rtC256G, rtV253T, rtC256S ve rtC256S olarak gözlenmiştir (Tablo III). Her iki grup arasında E alanı bölgesi mutasyonları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p= 0.0973$).

NA tedavisi alan 13 hastanın 2 (%15.38)'sinde E alanı bölgesinde mutasyon belirlenmiş olup, bu mutasyonlar; bir hastada rtI266R ve rtV278I, bir hastada ise rtV286D olarak saptanmıştır (Tablo II). NA tedavisi almayan 18 takip hastasından 6 (%33.33)'sında E alanı bölgesinde mutasyon belirlenmiştir. Bu mutasyonların; birer hastada rtN279H, rtV278I, rtI266K, rtV278I ve yine birer hastada rtC259S, rtS262T, rtI269T, rtQ270H ve rtI266R, rtN279H olduğu tespit edilmiştir (Tablo III). Her iki grup arasında E alanı bölgesi mutasyonları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p= 0.0973$).

NA tedavisi alan ve almayan takip hastalarının hiçbirinde B-C ve D-E alanları arasındaki bölgelerde mutasyon belirlenmemiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada 72 NA ile tedavi edilmiş ve 52 NA ile tedavi edilmemiş naif KHB hastasının, HBV RT gen bölgesindeki klasik ve varsayılan NA antiviral direnç mutasyonlarının profilleri nPCR, kapiler elektroforez ve biyoinformatik yaklaşımlar kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışmamızdaki bulguları genel olarak değerlendirdiğimizde, çalışılan RT geninin kodon rt150-293 arasında kalan bölgesinde toplamda 124 hastanın 31 (%25)'inde değişik sayıda ve çeşitte mutasyon belirlenmiştir (Tablo II, Tablo III). NA tedavisi almamış takip hastalarında, NA tedavisi alan hastalara göre daha yüksek oranda ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. NA tedavisi alan 72 hastanın 13 (%18.05)'ünde, NA tedavisi almayan 52 takip hastasının ise 18 (%34.61)'inde mutasyon belirlenmiştir ($p=0.0297$; $p<0.05$). Mutasyon oranının ilaç tedavisi alan hastalarda daha düşük bulunmasının, bu varyantların yüksek olasılıkla ilaç baskısı altında ortadan kalkması ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Wasityastuti ve arkadaşları¹⁵ tarafından yapılan bir çalışmada bulgularımıza benzer şekilde NA tedavisi almamış hastalarda %23.9, NA tedavisi alan hastalarda ise %4.59 oranında mutasyon belirlenmiştir.

HBV'nin DNA polimerazı terminal protein, "spacer", RT ve RNaz alanlarından oluşmaktadır. NA'dan etkilenen varyasyonlar korunmuş G, F, A, B, C, D ve E alanlarının yanı sıra HBV replikasyonunda rol oynayan F-A, A-B, B-C, C-D ve D-E ara bölgelerini içeren RT bölgesinde yer almaktadır. Bu alanlardaki mutasyonlar NA tedavisinin yokluğunda bile RT fonksiyonunu etkilemektedir. Bununla birlikte, RT varyantları çoğunlukla fonksiyonel alandan yapısal olarak uzak olan HBsAg "a" determinant bölgesiyle örtüşen A-B alanları arası bölgede bulunur ve bu mutasyonlar viral immün kaçışa neden olabilmektedir^{16,17}.

Çalışmamızda, A-B alanları arasındaki bölgede rtG152Q/R, rtR153Q/W, rtK154V/E/R/G, rtG155E, rtH156R, rtS159T, rtI163N/S mutasyonları belirlenmiştir. Kodon 153'teki rtR153Q/W mutasyonunun olası varsayılan bir ilaç direnç mutasyonu olduğu bildirilmiştir¹⁷. Bu mutasyon A-B alanları arasındaki bölgede en yüksek oranda belirlediğimiz mutasyonlardan birisidir. NA tedavisi alan 13 hastadan 6 (%46.15)'sında, NA tedavisi almayan 18 hastadan 7 (%38.88)'sinde bu mutasyon belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen 31 hastanın 13 (%41.93)'ünde bu mutasyonu belirlediğimiz görülmektedir. Wasityastuti ve arkadaşları¹⁵ yedi naif hastadan 6 (%85.71)'sında bu mutasyonu belirlemiştir. Bizim çalışmamızda LAM tedavisi başarısız olan altı hastanın 2 (%33.33)'sinde rtR153Q mutasyonu saptanmıştır (Tablo IV).

Bununla birlikte B, C, D ve E alanlarında belirlediğimiz rtR164R, rtG165D/A, rtG172Q, rtS176N, rtF178V, rtA181G, rtS185N/G/C, rtV207M, rtQ215H/S, rtL231V, rtI233K, rtN238S, rtV253T, rtC256G/S ve rtI266R/V mutasyonlarının ilaç direnciyle ilişkili olma potansiyeli bulunmaktadır.

Ülkemizde Çiftçi ve arkadaşları¹⁸ tarafından yapılan çalışmada NA tedavisi almamış 16 naif hastanın hiçbirinde klasik primer veya sekonder ilaç direnciyle ilişkili mutasyon belirlenememiştir. Bununla birlikte altı izolatta NA ilaç direnci ile ilişkili olabilecek rtL911,

Tablo IV. Çalışmamızda ve Benzer Çalışmalarda Aynı Kodonda Saptanan Farklı Polimorfizmler

Mutasyonun gerçekleştiği kodon	Tespit ettiğimiz polimorfizm	Benzer çalışmalardaki polimorfizmler	Referans makaleler
R153	Q/W	Q, Q	15, 25
Q215	H/S	P, H, H, H/S,	18, 22, 23, 24
N238	S	D, S/T	18, 25
C256	G/S	S, S, G	18, 21, 25
I266	R/V	G	18
V207	M	M/L, M, M/I	21, 24, 25
A181	G	V, G	21, 24
I233	K	V	25

rtT128I, rtQ215P, rtF221Y, rtN238D, rtC256S ve rtI266G mutasyonları bulunmuştur. Çalışmamızda rtQ215H/S, rtN238S, C256G/S, I266R/V mutasyonları belirlenmiştir. Bu mutasyonlar da henüz tedavi almamış takip hasta örneklerinde belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda, LAM tedavisi sırasında rtC256S mutasyonlarının ortaya çıktığını ve bu mutasyonların potansiyel NAr mutasyonları olarak tanımlandığını bildirilmiştir^{19,20}. Ren ve arkadaşları²¹ benzer bir çalışmada genellikle uzun süreli LAM tedavisi gören KHB hastalarında rtV207M/L ve rtC256S mutasyonlarının olduğunu bildirmişlerdir.

Çiftçi ve arkadaşları¹⁸ ilaç tedavisi alan dokuz hastadan 1 (%11.11)'inde LAM direnci ve aynı hastada rtI266G mutasyonunu saptamıştır. LAM direnciyle ilişkisi daha önce bildirilmeyen kodon 266'daki bu mutasyon bizim çalışmamızda yine hiç tedavi almamış 18 takip hastasının 2 (%11.11)'inde belirlenmiştir. Bu mutasyonların rtI266R ve rtI266V olduğu belirlenmiştir (Tablo IV).

Kim ve arkadaşları²² LAM tedavisi başarısız olan altı hastadan 1 (%16.66)'inde rtQ215H ve rtA181V mutasyonlarını belirlemişlerdir. Micco ve arkadaşları²³ rtQ215H mutasyonunun ADV direnci ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda tedavi almamış 18 takip hastasının 2 (%11.11)'inde 215. kodonda rtQ215H ve rtQ215S şeklinde iki farklı mutasyon saptanırken, 1 (%5.55)'inde de aynı kodonda rtA181G mutasyonu belirlenmiştir. Salpini ve arkadaşları²⁴ ise NA tedavisi almamış D genotipli 140 naif hastanın 30 (%21.4)'unda ilaç direnci ile ilişkili olduğu bildirilen pozisyonlarda bazı yeni aminoasit değişikliklerinin varlığını gözlemlemişlerdir. Söz konusu çalışmada belirlenen rtV207M, rtQ215H/S ve rtA181G mutasyonları benzer şekilde çalışmamızda da saptanmıştır. Bu polimorfizmlerin, HBV ilaç direncinin altında yatan mekanizmalarla doğrudan ilişkili olabileceği ve/veya ilaca dirençli mutasyonların kazanılmasında genetik bariyeri etkilediğini gösteren çalışmalarla yapılan karşılaştırma Tablo IV'te vurgulanmıştır.

Liu ve arkadaşları²⁵ 192 ilaç tedavisi almayan naif hepatit B hasta serumu ile yapmış oldukları çalışmada tüm RT genini analiz etmişlerdir. Bu çalışmada örneklerin hiçbirisinde

klasik NA direnç motifinde mutasyon belirlenmediği, bununla birlikte 59 (%30.53) hasta örneğinde potansiyel NA direnç mutasyonu olduğu görülmüştür. Belirlenmiş olan bu mutasyonlardan rtV207M/I, rtI233V, rtN238S/T, rtS256G, rtR153W/Q mutasyonları bizim çalışmamızda da benzer şekilde gözlenmiştir. Bunlardan rtI233'teki mutasyon çalışmamızda saptanan rtI233K, ilaç tedavisi alan hastaların birinde belirlenmiştir. İlaç tedavisi almamış takip hastalarından birinde rtN238S mutasyonu, birinde rtC256G mutasyonu, ikisinde rtC256S mutasyonu belirlenmiştir. Liu ve arkadaşları²⁵ bu kodondaki mutasyonu rtS256G olarak belirlemiştir. Bu mutasyon hem ilaç tedavisi alan hem de almayan takip hastalarında belirlenmiştir. Liu ve arkadaşları²⁵ aynı kodonda saptadıkları rtR153W mutasyonu çalışmamızda ilaç tedavisi almış bir hastada da bulunmuştur. Kombinasyon mutasyon paternleri ve HBV genotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren önceki çalışmalara dayanarak bu farklılığın genotipik özelliklerden kaynaklandığını söyleyebiliriz^{26,27}. Önceki çalışmalar genotip B ve C HBV suşlarının, rtM204I ve rtM204V mutantlarının replikasyonunu kolaylaştırmak için sırasıyla rtL80I/V ve rtL180M gibi farklı dengeleyici mutasyonları kullanabildiğini göstermiştir²⁸. Liu ve arkadaşları²⁵ çalışmalarına dahil edilen örneklerin %28.65'inin genotip B, %71.35'inin ise genotip C ile enfekte olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda hasta örneklerinin tamamı genotip D olarak belirlenmiştir (Tablo IV).

Son yıllarda HBV RT gen bölgesindeki klasik ve varsayılan NAr antiviral direnç mutasyonları birçok çalışmada farklı pozisyonlarda bildirilmiştir. Bununla birlikte, tedaviye henüz başlanmamış hastalarda özellikle varsayımsal ilaç direnci mutasyonları net değildir. Bu çalışmada örneklerin hiçbirisinde rtI169T, rtA181T/V, rtT184A/C/F/G/I/L/M/S, rtA194T, rtS202C/G/I, rtM204I/V/S, rtN236T, rtM250I/L/V ve rtV173L gibi primer ilaç direnci ile ilişkili mutasyonlar belirlenememiş olmakla birlikte RT geninin B, C, D ve E alanlarında, ilaç direnciyle ilişkili olma potansiyeli olan rtR164R, rtG165D/A, rtG172Q, rtS176N, rtF178V, rtA181G, rtS185N/G/C, rtV207M, rtQ215H/S, rtL231V, rtI233K, rtN238S, rtV253T, rtC256G/S ve rtI266R/V mutasyonları belirlenmiştir. Ayrıca bu mutasyonlardan rtG165A, rtS176N, rtF178V, rtA181G, rtS185N, rtS185G, rtR164R, rtS185C, rtV207M, rtQ215H, rtQ215S, rtN238S, rtL231V, rtC256G, rtV253T, rtC256S ve rtC256S mutasyonları, NA tedavisi almamış takip hastalarında belirlenmiştir.

Tedavi almamış naif hastalarda önceden varolan HBV RT mutasyonları potansiyel ilaç direnci ve HSK/siroz gibi karaciğer hastalığının ilerlemesi ile ilgilidir. Bununla birlikte RT'de genotip bağımlı polimorfik aminoasit değişikliği ilaç direncine bağlı olarak tedavi sonuçlarını da etkileyebilir. Naif hastalardaki spontan RT mutasyonlarının prevalansı çeşitlidir ve büyük oranda coğrafi faktörlere, HBV genotiplerine, HBeAg serolojisine, HBV viral yüküne, hastalık progresyonuna ve HIV ile koenfeksiyona bağlıdır²⁹.

Sonuç olarak, RT mutasyonlarının tedavi öncesi varlığı virüs ve konak immün yanıtının modülasyonu ile popülasyonda hastalığın ilerlemesini ve tedavi sonuçlarını etkileyebilir. Bu nedenle özellikle tedaviden önce direnç mutasyonlarının belirlenmesi tedavi stratejisinin planlanmasında önemlidir. Bunun için gelecekte daha geniş bir hasta profilinin bulunduğu kohort çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç vardır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Nijhuis M, van Maarseveen NM, Boucher CA. Antiviral resistance and impact on viral replication capacity: evolution of viruses under antiviral pressure occurs in three phases. *Handb Exp Pharmacol* 2009;(189):299-320.
2. Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K, Nasu A, Osaki Y, et al. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing. *PLoS One* 2012;7(4):1-10.
3. Murray JM, Purcell RH, Wieland SF. The half-life of hepatitis B virions. *Hepatology* 2006;44(5):1117-21.
4. Dienstag JL. Benefits and risks of nucleoside analog therapy for hepatitis B. *Hepatology* 2009;49(5):112-21.
5. Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shiffman ML, et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003;348(9):808-16.
6. Zoulim F, Lebosse F, Levrero M. Current treatments for chronic hepatitis B virus infections. *Curr Opin Virol* 2016;18:109-16.
7. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009;137(5):1593-608.
8. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007;46(1):254-65.
9. Ghany MG, Doo EC. Antiviral resistance and hepatitis B therapy. *Hepatology* 2009;49(5):174-84.
10. Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, et al. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: 2008 update. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6(12):1315-41.
11. Matsuda M, Suzuki F, Suzuki Y, Tsubota A, Akuta N, Hosaka T, et al. YMDD mutants in patients with chronic hepatitis B before treatment are not selected by lamivudine. *J Med Virol* 2004;74(2):361-6.
12. Ramezani A, Velayati AA, Roshan MR, Gachkar L, Banifazl M, Keyvani H, et al. Rate of YMDD motif mutants in lamivudine-untreated Iranian patients with chronic hepatitis B virus infection. *Int J Infect Dis* 2008;12(3):252-5.
13. Zoulim F, Durantel D, Deny P. Management and prevention of drug resistance in chronic hepatitis B. *Liver Int* 2009;29(1):108-15.
14. Yang JX, Liu BM, Li XG, Yan CH, Xu J, Sun XW, et al. Profile of HBV antiviral resistance mutations with distinct evolutionary pathways against nucleoside/nucleotide analogue treatment among Chinese chronic hepatitis B patients. *Antivir Ther* 2010;15(8):1171-8.
15. Wasyastuti W, Yano Y, Widasari DI, Yamani LN, Ratnasari N, Heriyanto DS, et al. Different variants in reverse transcriptase domain determined by ultra-deep sequencing in treatment-naive and treated Indonesian patients infected with hepatitis B virus. *Kobe J Med Sci* 2016;62(1):1-8.
16. Locarnini S. Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure. *Hepatol Int* 2008;2(2):147-51.
17. Warner N, Locarnini S, Kuiper M, Bartholomeusz A, Ayres A, Yuen L, et al. The L80I substitution in the reverse transcriptase domain of the hepatitis B virus polymerase is associated with lamivudine resistance and enhanced viral replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(7):2285-92.
18. Ciftci S, Keskin F, Cakiris A, Akyuz F, Pinarbasi B, Abaci 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.

19. Ciancio A, Smedile A, Rizetto M, Legget M, Gerin J, Korba B. Identification of HBV DNA sequences that are predictive of response to lamivudine therapy. *Hepatology*. 2004;39(1):64-73.
20. Wakil SM, Kazim SN, Khan LA, Raisuddin S, Paryez MK, Guptan RC, et al. Prevalence and profile of mutations associated with lamivudine therapy in Indian patients with chronic hepatitis B in the surface and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Med Virol* 2002;68(3):311-8.
21. Ren WH, Sun L, Zhao SL, Gu ZF. Analysis of the reverse transcriptase domain of HBV polymerase in 310 patients with chronic hepatitis B under Lamivudine therapy. *Int J Lab Med* 2010;31:34-6.
22. Kim DY, Chang HY, Lim SM, Kim SU, Park JY, Kim JK, et al. Quasispecies and pre-existing drug-resistant mutations of Hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B. *Gut Liver* 2013;7(3):329-34.
23. Micco L, Fiorino S, Loggi E, Lorenzini S, Vitale G, Cursaro C, et al. Polymorphism rtQ215H in primary resistance to adefovir dipivoxil in hepatitis B virus infection: a case report. *BMJ Case Rep* 2009;2009:bcr06.2008.0287.
24. Salpini R, Svicher V, Cento V, Gori C, Bertoli A, Scopelliti F, et al. Characterization of drug-resistance mutations in HBV D-genotype chronically infected patients, naïve to antiviral drugs. *Antiviral Res* 2011;92(2):382-5.
25. Liu BM, Li T, Xu J, Li XG, Dong JP, Yan P, et al. Characterization of potential antiviral resistance mutations in hepatitis B virus reverse transcriptase sequences in treatment-naïve Chinese patients. *Antivir Res* 2010;85(3):512-9.
26. Seifer M, Patty A, Serra I, Li B, Strandring DN. Telbivudine, a nucleoside analog inhibitor of HBV polymerase, has a different in vitro cross-resistance profile than the nucleotide analog inhibitors adefovir and tenofovir. *Antivir Res* 2009;81(2):147-55.
27. Damerow H, Yuen L, Wiegand J, Walker C, Bock CT, Locarnini S, et al. Mutation pattern of lamivudine resistance in relation to hepatitis B genotypes: Hepatitis B genotypes differ in their lamivudine resistance associated mutation pattern. *J Med Virol* 2010;82(11):1850-8.
28. 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.
29. Choi YM, Lee SY, Kim BJ. Naturally occurring hepatitis B virus reverse transcriptase mutations related to potential antiviral drug resistance and liver disease progression. *World J Gastroenterol* 2018;24(16):1708-24.