

# Mersin İlinde Hepatit B Virus Genotip D ile Kronik Enfekte Hastalarda Bazal Kor Promotor/Prekor Gen Bölgesi Mutasyonlarının Karakterizasyonu\*

## Characterization of Basal Core Promoter/Precore Gene Mutations in Chronically Infected Patients with Hepatitis B Virus Genotype D in Mersin Province, Turkey

Seda TEZCAN<sup>1</sup>, Mahmut ÜLGER<sup>2</sup>, Enver ÜÇBİLEK<sup>3</sup>, Gönül ASLAN<sup>1</sup>, Mehmet Sami SERİN<sup>2</sup>, Orhan SEZGİN<sup>3</sup>, Nuran DELİALİOĞLU<sup>1</sup>, Engin ALTINTAŞ<sup>3</sup>, İltter HELVACI<sup>4</sup>, Gürol EMEKDAŞ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

<sup>1</sup> Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.

<sup>2</sup> Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

<sup>2</sup> Mersin University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Mersin, Turkey.

<sup>3</sup> Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Mersin.

<sup>3</sup> Mersin University Faculty of Medicine, Department of Gastroenterology, Mersin, Turkey.

<sup>4</sup> Mersin Üniversitesi, Silifke Uygulamalı Teknoloji ve İşletmecilik Yüksekokulu, İşletme Bilgi Yönetimi Anabilim Dalı, Mersin.

<sup>4</sup> Mersin University, Silifke School of Applied Technology and Management, Department of Business Information Management, Mersin, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 13.03.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 09.04.2015

\* Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE TM (ST) 2008-9 DR nolu proje olarak desteklenmiştir. Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak hazırlanan çalışmanın bir bölümünü oluşturmaktadır ve IV. Ulusal Viroloji Kongresi (23-26 Haziran 2011, İstanbul)'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

### ÖZ

Hepatit B virus (HBV) genomunun bazal kor promotor (BCP) ve prekor (PC) gen bölgeleri, viral replikasyon ve "e" antijen sentezinde büyük öneme sahiptir. Bu gen bölgelerindeki genetik değişkenlik genellikle HBeAg negatif hastalarda tanımlanmıştır. Bu çalışmada, Mersin ilinde HBV genotip D ile kronik olarak enfekte hastalarda BCP ve PC gen bölgelerinde predominant olarak görülen mutasyon paternlerinin sıklığı ile HBeAg durumu, HBV-DNA düzeyi ve karaciğer biyokimyasal profilleri ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, genotip D ile enfekte 54 kronik hepatit B (KHB) hastası (33 erkek, 21 kadın; yaş ortalaması: 40.05 ± 12.91 yıl) dahil edilmiştir. Hastaların, serum HBV-DNA düzeyleri, serolojik

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Seda Tezcan, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yenişehir 33343, Mersin, Türkiye. Tel (Phone): +90 324 361 0684-1153, E-posta (E-mail): tezcanseda@mersin.edu.tr

göstergeleri (HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc) ve karaciğer biyokimyasal profilleri (ALT ve AST) belirlenmiştir. BCP ve PC gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edilmiş ve bu bölgelerdeki mutasyonlar, PCR ürünlerinin direkt DNA dizi analizinden sonra bilinen vahşi tip HBV dizileri ile hizalanarak karşılaştırılması sonunda tespit edilmiştir. Hastaların %87.75 (43/49)'inde BCP (nükleotid [nt.] 1753-1762/1764) ve/veya PC (nt. 1896) mutasyonları bulunmuştur. HBeAg negatif hastalarda mutasyon oranı %97.1 (33/34), HBeAg pozitif hastalarda ise %66.7 (10/15) olarak saptanmıştır ( $p=0.008$ ). PC nt. G1896A stop kodon mutasyonu HBeAg negatif hastalarda, HBeAg pozitif olanlardan daha yaygın olarak tespit edilmiş (%73.5'e karşı %20,  $p=0.001$ ), ancak bu iki grup arasında, BCP mutasyonları açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p=0.331$ ). BCP ve/veya PC mutasyonlarının varlığı ile serum HBV-DNA veya ALT-AST düzeyleri arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır. Sonuç olarak bu çalışma, bölgemizde yaşayan genotip D ile enfekte KHB hastalarının önemli bir kısmının, BCP ve PC varyantları taşıdığını göstermiştir. PC gen bölgesinde görülen G1896A stop kodon mutasyonu ise, Mersin ilindeki HBV ile kronik olarak enfekte hastalardaki HBeAg kaybında önemli bir role sahip gibi görünmektedir. Çalışmanın sonuçları, BCP ve PC gen bölgelerinde meydana gelen farklı mutasyonların sıklığı ve genetik heterojenitesini gösteren önemli veriler sağlamıştır.

**Anahtar sözcükler:** Hepatit B virus; HBeAg; nükleotid mutasyonu; basal kor promotor, prekor.

## ABSTRACT

The basal core promoter (BCP) and precore (PC) gene regions of hepatitis B virus (HBV) genome are important for the viral replication and synthesis of "e" antigen. Genetic variability has been described in BCP and PC gene regions, commonly in HBeAg negative patients. The aim of this study was to determine the frequency of the predominant mutation patterns of BCP/PC gene regions and their correlations with HBeAg status, HBV-DNA levels, and liver biochemical profiles in chronic hepatitis B (CHB) patients infected with genotype D, in Mersin province which is located at Mediterranean part of Turkey. A total of 54 CHB patients (33 male, 21 female; mean age:  $40.05 \pm 12.91$  years) infected with HBV genotype D were enrolled in the study. Serum HBV-DNA levels, serological markers (HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc) and biochemical profiles (ALT and AST) were analyzed in all patients. BCP and PC gene regions were determined by polymerase chain reaction (PCR) and mutations of these regions were determined by direct sequencing of PCR products then aligned with known wild-type HBV sequences. BCP [nucleotide (nt.) 1753-1762/1764] and/or PC (nt. 1896) mutations were detected in 87.75% (43/49) of the patients. Mutation rates were detected as 97.1% (33/34) and 66.7% (10/15) in the HBeAg negative and in HBeAg positive patient groups, respectively ( $p=0.008$ ). PC nt. G1896A mutation was more common in HBeAg negative samples than in HBeAg positive samples (73.5% vs. 20%,  $p=0.001$ ), however there was no significant differences in the occurrence of BCP mutations between the two groups ( $p=0.331$ ). No correlation was found between the presence of BCP and/or PC mutations and serum HBV-DNA or ALT-AST levels. Our study reveals that significant number of chronically infected patients with genotype D HBV have BCP and PC variants. G1896A stop codon mutation in precore region seems to have a significant role in the loss of HBeAg in our patients. The results of our study provided important data about the frequency and the genetic heterogeneity of different kinds of mutations occurring at BCP and PC gene regions.

**Keywords:** Hepatitis B virus; HBeAg; nucleotide mutation; basal core promoter, precore.

## GİRİŞ

Hepatit B virus (HBV) enfeksiyonu halen dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur. Yaklaşık iki milyar kişi HBV ile enfekte olup, bunlardan 350 milyon kişi kronik HBV enfeksiyonuna yakalanmaktadır<sup>1</sup>. HBV enfeksiyonu, akut kendini sınırlandıran hastalık ve

inaktif taşıyıcılıktan, kronik karaciğer hastalığı, siroz ve hepatoselüler karsinomaya kadar ilerleyebilen oldukça geniş spektrumda klinik görünümüne sebep olmaktadır<sup>2</sup>. HBV, Sahra-altı Afrika, Güneydoğu Asya ve Akdeniz havzasında endemiktir<sup>1</sup>. Türkiye’de HBV ile kronik olarak enfekte kişilerde HBsAg taşıyıcılığının %5 oranında olduğu tahmin edilmekte ve ülkemiz HBV endemisitesi yönünden orta prevalans zonunda yer almaktadır<sup>3,4</sup>.

Hepadnaviridae ailesinde yer alan HBV, kendi kodladığı ters transkriptazı kullanarak bir RNA aracısı ile replike olan, 3.2 kb uzunluğunda kısmen çift zincirli çembersel DNA genomu içerir. HBV genomu 4 adet örtüşük açık okuma çerçevesine (open reading frame, ORF) sahiptir, bunlar; pol (P), env (E), core (C) ve X’dir<sup>5</sup>. Aktif replikasyon sırasında üretilen yüksek viral kopya sayısı ve HBV polimerazın “proof reading” aktivitesinin olmaması nedeniyle, HBV; konak immünitesinin baskısı altında yüksek mutasyon oranına sahiptir<sup>6</sup>. Bu HBV mutantları, konak immün sisteminin tanıdığı önemli epitoplarda değişiklikler gösterebilmekte, mutant HBV replikasyon düzeyinde yükselme ile virülans artabilmekte, antiviral tedaviye karşı direnç gelişebilmekte ve virusun hücreye tutunması ve penetrasyonu kolaylaşabilmektedir<sup>7</sup>.

HBV’nin moleküler morfolojisi ile klinik seyri arasında güçlü bir ilişki vardır. HBV mutasyonları viral yapısal proteinlerin morfolojisini değiştirebilmekte ve bu sebeple HBV ile enfekte hastanın klinik önemini etkilemektedir<sup>8</sup>. HBV genomunun özellikle prekor (precore; PC), bazal kor promotör (basal core promoter; BCP) ve preS gen bölgelerinde görülen önemli mutasyonlar gibi genotipik ve özgül varyasyonların HBV ile ilişkili hastalıkların klinik seyrine olan etkisi gösterilmiştir<sup>2</sup>. BCP bölgesi, PC bölgesinin transkripsiyonunu ve viral replikasyonu düzenler; bu sebeple bu bölgedeki bazı mutasyonlar HBeAg sentezini etkileyebilir<sup>9</sup>. En sık görülen BCP mutasyonları, PC mRNA ve HBeAg azalmasına neden olabilen 1762. nükleotid (nt)’de adenin (A)’den timin (T)’e ve 1764. nt’de guanin (G)’den a’e (nt. T1762/A1764) değişim şeklinde görülen ikili mutasyonlardır<sup>10,11</sup>. BCP bölgesinin AT yönünden zengin bölgesinde bulunan 1753. nt’de T’den sitozin (C)/A/G’ye değişim şeklinde gözlenen mutasyonların, transkripsiyon ve translasyon faktörlerinin bağlanma etkinliğini değiştirdiği ve kronik hepatitin ilerlemesi ile yakın ilişkili olduğu bildirilmektedir<sup>10</sup>. PC mutantları HBV varyantları olup, HBeAg serokonversiyonu sırasında ortaya çıkmaktadır. HBeAg negatif kronik hepatit B ile ilişkili en yaygın çalışılan mutasyon, PC bölgesinde 1896. nt’de G’nin A ile yer değiştirmesi ile ortaya çıkan mutasyon olup, bu da HBeAg sentezini prematür bir şekilde sonlandıran TAG stop kodonunun oluşmasına neden olmaktadır<sup>12</sup>.

Başlangıçta vahşi tip HBV ile enfekte bireylerde, konağın immün baskısı altında gelişen kronik enfeksiyonun seyri sırasında dereceli olarak mutant suşlar meydana gelmektedir. Bu viral mutasyonların durumunun anlaşılması ise hiç şüphesiz ki, HBV enfeksiyonuna karşı doğru immünoprofilaksi ve yeni antiviral tedavi stratejilerinin tasarlanmasına yardımcı olacaktır. Bu doğrultuda yaptığımız bu çalışmada, Mersin ilinde HBV genotip D ile kronik olarak enfekte hastalarda, BCP/PC gen bölgelerinde görülen predominant mutasyon paternlerinin sıklığı ile HBeAg durumu, HBV-DNA seviyeleri ve karaciğer biyokimyasal profili (alanin aminotransferaz; ALT ve aspartat aminotransferaz; AST seviyeleri) ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Hastalar

Çalışmaya, Aralık 2008-Haziran 2009 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji kliniğinde takip edilen 33'ü erkek (%61.1), 21'i kadın (%38.9) ve yaş ortalamaları  $40.05 \pm 12.91$  yıl olan, HBsAg'si pozitif toplam 54 kronik hepatit B'li hastaya ait serum örnekleri dahil edildi. Kronik hepatit B (KHB) tanısı, 6 aydan daha uzun süredir HBsAg pozitif olan hastalar için konuldu. Düzenli olarak kontrolü yapılan hastalar, en az bir yıldır antiviral tedavi almaktaydı. Çalışma, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı ile gerçekleştirildi ve çalışmaya dahil edilen hastaların hepsi, yapılacak çalışma ile ilgili olarak bilgilendirildi (Etik Kurul Onay No.9/13-11/21/2008).

### Biyokimyasal ve Serolojik Analiz

Hastalarının karaciğer biyokimyasal profilleri, ALT ve AST enzim seviyelerinin ölçülmesi ile belirlendi. Hasta serumlarında HBV serolojik belirteçleri; HBsAg, anti-HBs, anti-HBc (IgM ve IgG), HBeAg ve anti-HBe varlığı ticari ELISA kitleri ile belirlendi. Yöntem mikropartikül ELISA prensibine dayanmakta olup, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda Architect i 2000 SR (Abbott Diagnostics, Almanya) sisteminde gerçekleştirildi.

### HBV-DNA Seviyeleri

Serum HBV-DNA seviyeleri, "Cobas TaqMan™ 48" (Roche Diagnostics, Almanya) sistemi ile ölçüldü. Testin tespit limiti 6 IU/mL ve dinamik tespit aralığı  $6-1.1 \times 10^8$  IU/mL idi.

### BCP/PC Gen Bölgesi Mutasyonlarının Belirlenmesi

Serum örneklerinden viral DNA izolasyonu, modifiye klasik fenol-kloroform ve kloroform yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi<sup>13</sup>. Öncelikle 150 µL serum örneği 450 µL parçalayıcı tampon [13.3 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 6.7 µmol/µL etilen-diamin-tetraasetik asit, %0.67 sodyum dodesil sülfat ve 133 mg/mL proteinaz-K] ile karıştırıldı ve 56°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda önce iki kez fenol-kloroform (1:1) ekstraksiyonu, daha sonra bir kez kloroform ekstraksiyonu gerçekleştirildi. DNA daha önceden soğutulmuş %96'lık etil alkol ile çöktürüldü. DNA peleti havada kurutulduktan sonra 25 µL nükleaz içermeyen steril suda çözdürüldü, sonrasında analiz edilinceye kadar -20°C'de saklandı ve amplifikasyonda kalıp DNA olarak kullanıldı.

Mutasyonların belirlenmesi için, HBV genomunun kor ORF bölgesinde yer alan BCP (nt. 1742-1849) ve PC (nt. 1814-1900) gen bölgelerinin 330 baz çiftlik (bç) parçasının amplifikasyonu nested polimeraz zincir reaksiyonu (N-PCR) ile gerçekleştirildi<sup>14</sup>. N-PCR'in birinci turunda kullanılan dış primerler 5'-CATAAGAGGACTCTTGGACT-3' (sense, nt. 1653-1672) ve 5'-GGCGAGGGAGTTCTTCTTCTAGGGG-3' (antisense, nt. 2394-2369), ikinci turunda kullanılan iç primerler ise 5'-AATGTCAACGACCGACCTTG-3' (sense, nt. 1679-1698) ve 5'-AGCTGAGGCGGTGTCGAGGAGATC-3' (antisense, nt. 1985-2009) idi.

Her bir örneğin birinci tur PCR amplifikasyonu 50 µL'lik reaksiyon hacimlerinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı, 5 µL 10X PCR tampon, 2 µmol/µL MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µmol/µL

dNTP karışımı, 0.25 pmol/μL her bir dış primer (sense ve antisense), 1.25 U Taq DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya) ve 5 μL örnek DNA'sı içermekteydi. İkinci tur PCR amplifikasyonu için birinci tur karışımındaki aynı bileşenler kullanılmış olup, sadece birinci tur PCR ürününden 0.5 μL kalıp olarak ve her bir iç primer (sense ve antisense) 0.125 pmol/μL oranında kullanıldı. Örneklerin, ısı döngü cihazında (Eppendorf, Mastercycler, Almanya) amplifikasyon koşulları ise; 94°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonu, arkasından 30 döngü 94°C'de 45 saniye denatürasyon, 55°C'de 45 saniye bağlanma (birinci tur için) ve 72°C'de 1 dakika uzama basamakları ve arkasından 70°C'de 7 dakika son uzama şeklinde uygulandı. İkinci tur PCR reaksiyonunda ise bağlanma sıcaklığı 60°C'ye yükseltildi. PCR ürünleri, %1'lik agaroz jel elektroforezinden sonra 0.5 μg/mL etidyum bromür ile boyandıktan sonra UV transilüminatörde görüntülendi.

### PCR Ürünlerinin Direkt DNA Dizi Analizi

Bazal kor/prekor gen bölgesi N-PCR tekniği ile çoğaltıldıktan sonra, elde edilen özgül diziler, işaretli dideoksinnükleotidleri içeren "Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit" (Applied Biosystems, CA, ABD) kullanarak, sense ve antisense zinciri BCP/PC primerleri ile "Cycle Sequence" PCR'ı yapıldı. "Cycle Sequencing" sonrası reaksiyon ürünlerine saflaştırma işlemi uygulandı. Saflaştırma işlemi sonrasında, "ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, CA, ABD) otomatize DNA dizi analizi cihazında, reaksiyon ürünlerinin kapiller elektroforez işlemi gerçekleştirilerek dizi verileri kromatogram şeklinde elde edildi.

Dizi analizi sonrası her zincir, komplementeri ile birlikte kromatogram dalgalarının pik uzunluklarının karşılaştırılması ile kontrol edildi ve gerekli düzeltmeler yapıldı. CLUSTAL X versiyon 1.83 yazılım programında her iki zincir karşı karşıya getirilerek hizalandı ve daha sonra GENDOC versiyon 2.6.002 (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility) DNA dizi analizi yazılım programında son konsensus dizi şeklinde kaydedildi. Her bir hastaya ait dizisi çıkarılmış olan BCP/PC gen bölgelerindeki özgül nükleotid değişiklikleri, NCBI veritabanında yayınlanmış referans HBV dizi verileri (erişim numarası X04615) ile karşılaştırılarak belirlendi. Mutasyonlar sense ve antisens dizinin her ikisinde tespit edildiğinde kaydedildi.

### HBV Genotipleri

HBV genotipleri, pre-S gen bölgesi temel alınarak PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) metodu ile belirlendi. PCR-RFLP paternlerinin doğrulaması, direkt dizi analizi ile gerçekleştirildi<sup>15</sup>.

### İstatistiksel Analiz

Bütün istatistik analizleri için SPSS (Ver. 13.0, Chicago, ABD) kullanıldı. Sürekli verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığını kontrol etmek için *Shapiro-Wilk* testi; iki bağımsız grubun ortalamalar açısından karşılaştırılmasında *Student's t-test* kullanıldı. Kategorik verilerin birbiri ile olan ilişkilerinin kontrol edilmesinde ise, *x2* analizi ve *Fisher's exact* testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık,  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

## BULGULAR

### Klinik ve demografik veriler

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalar HBV genotip D ile enfekte olup, KHB'li 54 hastanın 35 (%64.8)'i HBeAg negatif ve 19 (%35.2)'u HBeAg pozitif bulunmuştur. HBeAg negatif ve pozitif hastaların yaş ortalamaları sırasıyla,  $44.94 \pm 11.35$  ve  $31.05 \pm 10.76$  olarak hesaplanmıştır ( $p = 0.001$ ). Hastaların hepsi HBsAg pozitif olup, 2 hasta serumu haricinde diğer 52 hasta serumunun anti-HBs'si negatif olarak tespit edilmiştir. Hastaların hepsinin anti-HBc IgG'leri pozitif olup, sadece 4 hastanın anti-HBc IgM'si pozitif olarak izlenmiştir. HBeAg negatif ve pozitif hastalar arasında ALT ( $p = 0.356$ ) ve AST ( $p = 0.800$ ) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir. Çalışmaya dahil edilen bütün hastaların serum HBV-DNA düzeyleri PCR ile tespit edilebilir seviyede olup, sadece bir örnekte yetersiz örnek hacmi nedeniyle miktar belirlenememiştir. HBV yükü HBeAg pozitif hastalarda, negatiflerden anlamlı derecede yüksektir ( $p = 0.001$ ). Hastalara ait bütün klinik, laboratuvar ve demografik özellikler Tablo 1'de özetlenmiştir.

### BCP/PC gen bölgesi mutasyonları

Mutasyonlar değerlendirilirken, en yaygın görülen BCP gen bölgesindeki nt. 1753 ve nt. 1762/1764'de ikili mutasyon ile PC gen bölgesindeki nt. 1896'da stop kodon oluşumuna neden olan mutasyon paternlerinin dağılımı incelenmiştir. Örneklerden 5'inin DNA dizi analizi okunamamış, kalan 49 örneğin 43'ünde (%87.75) BCP/PC gen bölgesinde mutasyon tespit edilmiştir. HBeAg negatif olanlarda mutasyon oranı %97.1 (33/34), HBeAg pozitiflerde ise %66.7 (10/15) olarak belirlenmiş ve mutasyon oranı HBeAg negatiflerde, HBeAg pozitiflerden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ( $p = 0.008$ ) bulunmuştur.

**Tablo 1.** Kronik hepatit B'li hastaların klinik, laboratuvar ve demografik özellikleri.

	HBeAg (-) (n= 35)	HBeAg (+) (n= 19)	p değeri
Cinsiyet			
E, n (%)	19 (57.6)	14 (42.4)	0.243
K, n (%)	16 (76.2)	5 (23.8)	
Yaş (yıl, ortalama $\pm$ SS)	$44.94 \pm 11.35$	$31.05 \pm 10.76$	0.001
ALT düzeyi (IU/L, ortanca $\pm$ SS)	27.6 (16-43)	25.7 (22.93-75.42)	0.356
< 31, n (%)	20 (66.7)	10 (33.3)	0.781
$\geq$ 31, n (%)	15 (62.5)	9 (37.5)	
AST düzeyi (IU/L, ortanca $\pm$ SS)	31.5 (26-43.83)	30.03 (25.54-57.5)	0.800
< 32, n (%)	19 (63.3)	11 (36.7)	1.000
$\geq$ 32, n (%)	16 (66.7)	8 (33.3)	
Serum HBV-DNA düzeyi (IU/mL, ortanca $\pm$ SS)	2350 (84.74-23950)	52500 (15300-789000)	0.001
< 6, n (%)	4 (100)	0 (0)	0.284
$\geq$ 6, n (%)	30 (61.2)	19 (38.8)	

HBeAg negatiflerde 7, HBeAg pozitiflerde ise 5 farklı mutasyon paterni görülmüş ve her iki grupta ortak üç paterne rastlanmıştır (Tablo II).

HBeAg negatif ve pozitif hastalar arasında BCP/PC gen mutasyon paternlerinin dağılım oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0.006$ ). Bu hastalarda, özellikle BCP nt. 1753 ve PC nt. 1896'da birlikte mutasyon pozitifliğinin dağılımı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.001$ ) (Tablo III).

BCP/PC gen bölgelerindeki mutasyonların (1753 + 1762/1764 + 1896) dağılımı göz önüne alındığında, BCP mutasyonlarının (1753 + 1762/1764) oranı HBeAg negatif ve pozitif hastalarda sırasıyla %70.6 ve %53.3 olarak bulunmuş olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0.331$ ). PC mutasyonlarının (1896) oranı ise, HBeAg negatif ve pozitif hastalarda sırasıyla %73.5 ve %20 oranında bulunmuş ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p=0.001$ ). BCP ve PC birlikte mutasyon oranı, HBeAg negatif hastalarda %47.1, pozitif hastalarda ise %6.7 oranında saptanmış ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0.008$ ) (Tablo IV).

HBeAg negatif hastaların %67.6 (23/34)'sında ve HBeAg pozitif hastaların %53.3 (8/15)'ünde BCP gen bölgesinin nt. 1762/1764'de mutasyon tespit edilmiştir ( $p=0.357$ ) (Tablo IV). HBeAg negatif 23 hastada nt. 1762/1764'de belirlenen mutasyon paternleri: hastaların 17 (%73.9)'sinde AGG→TGA, dördünde (%17.4) AGG→AGT ve ikisinde (%8.7) AGG→AGA şeklindedir. HBeAg pozitif 8 hastada nt. 1762/1764'de belirlenen mutasyon paternleri ise; hastaların beşinde (%62.5) AGG→TGA, birinde (%12.5) AGG→AGT, birinde (%12.5) AGG→AGT ve birinde (%12.5) nt. 1763-1770 arasında sekiz bç'lik "GGTCTTTG" delesyonu şeklindedir (Tablo II).

BCP gen bölgesi nt. 1753 mutasyonları HBeAg negatif hastaların %55.9 (19/34)'unda ve HBeAg pozitif hastaların %40 (6/15)'inde belirlendi ( $p=0.364$ ) (Tablo IV). HBeAg negatif 19 hastada belirlenen nt. 1753 mutasyon paternleri: 13 (%68.4)'ünde T→C, dördünde (%21.1) T→A ve ikisinde (%10.5) T→G şeklindedir. HBeAg pozitif altı hastada belirlenen nt. 1753 mutasyon paternleri ise: beşinde (%83.3) T→C ve birinde (%16.7) T→G şeklindedir. PC gen bölgesi nt. 1896 mutasyonlarının, HBeAg negatif ve pozitif tüm hastalarda belirlenen mutasyon paterni TGG→TAG şeklindedir.

BCP nt. 1753 ve nt 1762/1764 ile PC nt. 1896 mutasyonları ile serum ALT, AST ve HBV-DNA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Tablo V).

## TARTIŞMA

HBV enfeksiyonunun doğal öyküsünde, vahşi tip virus ile enfekte hastalar kronik hepatit B (KHB) enfeksiyonunun erken fazında HBeAg üretebilmektedirler. Ancak HBeAg'den anti-HBe'ye serokonversiyon sırasında nt. 1896 pozisyonunda G'den A'ya değişim şeklinde mutasyonun meydana gelmesi ile prekor geninde TAG stop kodonu oluşarak olgun "e" antijeninin sekresyonu durmakta ve HBeAg negatifliği meydana gelebilmektedir<sup>16,17</sup>. Diğer taraftan bazal kor gen bölgesindeki T1762/A1764 ikili mutasyonunun meydana gelmesi de, HBeAg üretimini azaltabilmektedir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, bazal kor/prekor gen bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar ile HBV enfeksiyonunun

**Tablo II. HBeAg negatif ve pozitif hastaların BCP/PC gen bölgelerinde en yaygın görülen mutasyonların dağılımı**

Toplam n= 49 34 HBeAg (-) 15 HBeAg (+)	Patern (%)	Hasta No	Anti-HBe	HBeAg	BCP Mutasyonları		PC Mutasyonları	
					nt. 1753	nt. 1762/1764	nt. 1762/1764	nt. 1896
1	2.9	1-NK	+	-	-	-	-	-
1		5-NG	+	-	T→A	AGG→TCA	AGG→TCA	TGG→TAG
9	32.4	9-IU, 11-CS, 31-MY, 20-AA, 36-HA, 47-ARK, 67-FG, 77-MG, 115-SM	+	-	T→C	AGG→TCA	AGG→TCA	TGG→TAG
1		49-MA	+	-	T→W	AGG→TGR	AGG→TGR	TGG→TAG
4		7-ES, 33-FD, 83-SK, 87-IA	+	-	T→C	AGG→TCA	AGG→TCA	-
1	20.6	12-NO	+	-	T→R	AGG→TCA	AGG→TCA	-
1		102-SM	+	-	T→G	AGG→AGT	AGG→AGT	-
1		111-IY	+	-	T→W	AGG→TCA	AGG→TCA	-
9	26.5	29-RB, 45-BO, 58-NI, 80-CC, 86-OG, 96-SK, 99-NO, 100-DID, 110-SC	+	-	-	-	-	TGG→TAG
2		46-HY, 75-MA	+	-	-	AGG→AGT	AGG→AGT	TGG→TAG
1	11.8	69-KE	+	-	-	AGG→AGA	AGG→AGA	TGG→TAG
1		85-OG	+	-	-	AGG→AGR	AGG→AGR	TGG→TAG
1	2.9	89-SS	+	-	-	-	-	TGG→TAG
1	2.9	121-MG	+	-	T→A	-	-	TGG→TAG
1	6.7	27-KY	+	-	-	AGG→AGT	AGG→AGT	-
2	13.3	32-SK, 81-UC	-	+	-	AGG→WGR	AGG→WGR	-
1	6.7	39-MT	-	+	-	-	1763-1770 DEL	TGG→TRG
4		35-NU, 4-NE, 38-HA, 41-ZO	-	+	T→C	AGG→TCA	AGG→TCA	TGG→TAG
1	40	61-AO	+	+	T→G	AGG→AGT	AGG→AGT	-
1		103-AS	-	+	T→C	AGG→TGG	AGG→TGG	-
4		60-EK, 72-SD, 76-MK, 93-HO	-	+	-	-	-	-
1	33.3	68-AY	-	+	-	-	-	-

R: A veya G; W: A veya T; DEL: Delesyon.  
(değişik lokasyonlarda indersiyonlara sahip)

**Tablo III.** BCP/PC gen bölgelerindeki mutasyon paternlerinin dağılımı

Mutasyon tipleri	HBeAg		Toplam n (%)
	Negatif n (%)	Negatif n (%)	
Mutasyon yok	1 (2.9)	5 (33.3)	6 (12.2)
1753 + 1762 / 1764 + 1896	11 (32.4)	0	11 (22.4)
1753 + 1762 / 1764	7 (20.6)	6 (40)	13 (26.5)
1896	9 (26.5)	2 (13.3)	11 (22.4)
1762 / 1764 + 1896	4 (11.8)	0	4 (8.2)
1753 + 1896	1 (2.9)	0	4 (8.2)
1762 / 1764	1 (2.9)	1 (6.7)	2 (4.1)
1763 / 1770 DEL + 1896	0	1 (6.7)	1 (2)
<b>Toplam</b>	<b>34 (100)</b>	<b>15 (100)</b>	<b>49 (100)</b>

**Tablo IV.** BCP/PC mutasyonları ile HBeAg durumu arasındaki ilişki

Gen bölgesi	Nükleotid pozisyonu	Mutasyon	HBeAg (-) n (%)	HBeAg (+) n (%)	Tüm hastalar n (%)	p değeri
BCP	1753	Negatif	15 (44.1)	9 (60)	24 (48.9)	0.364
		Pozitif	19 (55.9)	6 (40)	25 (51.1)	
	1762/1764	Negatif	11 (32.4)	7 (46.7)	18 (36.8)	0.357
		Pozitif	23 (67.6)	8 (53.3)	31 (63.2)	
PC	1753+1762/1764	Negatif	10 (29.4)	7 (46.7)	17 (34.7)	0.331
		Pozitif	24 (70.6)	8 (53.3)	32 (65.3)	
	1896	Negatif	9 (26.5)	12 (80)	21 (42.9)	0.001
		Pozitif	25 (73.5)	3 (20)	28 (57.1)	
BCP/PC	1753+1762/1764+1896	Negatif	18 (52.9)	14 (93.3)	32 (65.3)	0.008
		Pozitif	16 (47.1)	1 (6.7)	17 (34.7)	

**Tablo V.** BCP nt. 1753 ile nt. 1762/1764 ve PC nt. 1896 mutasyonları ile serum ALT, AST ve HBV-DNA düzeyleri arasındaki ilişki

		BCP		PC
		1753	1762/1764	1896
ALT	Negatif	30.8 (25.1-63.24)	41.39 (25.80-76.24)	24.9 (15.97-57.77)
	Pozitif	20.78 (16.04-40.97)	20.78 (15.8-39.3)	28.79 (17.25-47.97)
p değeri		<b>0.056</b>	<b>0.006</b>	<b>0.492</b>
AST	Negatif	30.94 (26.13-45.45)	30.88 (26.72-44.91)	31.5 (23.61-48.82)
	Pozitif	31.5 (23.61-51.82)	31.73 (23.65-54.91)	31.04 (26.25-49.95)
p değeri		<b>0.509</b>	<b>0.644</b>	<b>0.671</b>
HBV DNA	Negatif	9535 (559.75-62475)	20900 (812-150550)	26400 (353-560000)
	Pozitif	6320 (70.95-104750)	4560 (102.5-51350)	3140 (180.75-26650)
p değeri		0.575	0.298	0.104

seyri arasında bir ilişki olduğunun doğrulandığı belirtilmektedir<sup>11,12,18</sup>. HBeAg ekspresyonunun olmaması ise enfekte hepatositlerin lenfositler tarafından tanınmasını önlemektedir<sup>14</sup>.

Yaptığımız bu çalışmada, Mersin ilinde KHB'li hastalarda, HBeAg ekspresyonu ile ilişkili BCP ve PC bölgelerinde görünen mutasyonlar epidemiyolojik olarak incelenmiştir. Mutasyonlar değerlendirilirken 54 kronik enfekte hastada, BCP geninin nt. 1753 ve nt. 1762/1764 pozisyonundaki ikili mutasyonlar ile PC geninin nt. 1896'daki stop kodon mutasyonları araştırılmıştır. Örneklerden beşinin BCP/PC geni dizi analizi okunamamış; kalan 49 hastanın 43 (%87.75)'ünde BCP ve/veya PC gen mutasyonları belirlenmiştir.

HBeAg negatif KHB hastalarının insidansı birçok ülkede giderek artmaktadır<sup>17,19,20</sup>. Çalışmamızda da HBeAg negatif hastalar çoğunluktadır (35/54, %64.8). Hastaların hepsi HBV genotip D olarak belirlenmiştir<sup>15</sup>. BCP ve/veya PC gen bölgelerinde mutasyonlar HBeAg negatif hastaların %97.1 (33/34)'inde ve HBeAg pozitif hastaların %66.7 (10/15)'inde tespit edilmiş olup, HBeAg eksprese etmeyen hastalarda mutasyon sıklığının fazla olduğu görülmüştür ( $p= 0.008$ ). Benzer olarak, genotip D'nin baskın olarak görüldüğü Pakistan-Karaçi'de yapılan bir çalışmada, HBeAg negatif hastaların %62 (44/71)'inin ve HBeAg pozitif hastaların %24 (9/38)'ünün BCP ve PC mutantlarına sahip olduğu bildirilmiştir ( $p= 0.00$ )<sup>19</sup>.

Birden fazla gen bölgesinde mutasyonlar yaygın bulunmuştur. BCP nt. 1753. ve nt. 1762/1764 ile PC nt. 1896'da birlikte mutasyon oranının dağılımı HBeAg negatif (%32.4) ve pozitif (%0) hastalar arasında anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p< 0.001$ ) (Tablo III). HBeAg negatif KHB'li hastalarda bu mutasyonların birlikte bulunması şeklinde ortaya çıkan bu yüksek heterojenitenin, ilgili gen bölgelerindeki immün aracılı yüksek hastalık aktivitesi ile ilişkili olabileceği düşüncesindedir.

BCP mutasyonları genel olarak hastaların %65.3'ünde tespit edilirken, HBeAg negatif olanların %70.6 (24/34)'sında ve pozitiflerin %53.3 (8/15)'ünde belirlenmiştir. Ancak bu farklılık her iki grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p= 0.331$ ). PC mutasyonları da hastaların %57.1'inde tespit edilirken, HBeAg negatif olanların %73.5 (25/34)'i ile pozitiflerin %20 (3/15)'sinde belirlenmiştir ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p= 0.001$ ). PC gen bölgesindeki bu mutasyonlar, büyük olasılıkla bölgemizde KHB'li hastalarda HBeAg negatif fenotipin oluşması ile ilişkilidir. Diğer yandan BCP/PC birlikte mutasyon oranı da, HBeAg negatif hastalarda (%47.1) pozitiflere oranla (%6.7) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p= 0.008$ ) (Tablo IV).

HBV BCP/PC bölgesindeki özgül mutasyonların genotipler ile ilişkili olduğu belirtilmektedir<sup>18,21,22</sup>. BCP/PC bölgesi viral replikasyon ve gen ekspresyonu ile ilişkili olduğu için, bu gen bölgelerindeki mutasyonlar/varyasyonlar, farklı genotipler/subgenotipler ile enfeksiyonun bir sonucu olarak da hastalığın seyrinde değişikliklere neden olabilmektedir<sup>18</sup>. HBV genotiplerinin dünya genelinde dağılımındaki heterojenite, farklı popülasyonlarda HBV mutasyonlarının prevalansındaki farklılıktan da sorumlu tutulmaktadır<sup>12</sup>. HBV BCP/PC mutasyonları ile ilgili çalışmalar, genotip yönünden heterojen hasta popülasyonlarında gerçekleştirildiğinden verilerin değerlendirilmesi zorlaşmaktadır<sup>23,24</sup>. Bu sebeple

yaptığımız çalışmanın, tek bir genotip ile yansıtılan homojen hasta popülasyonunda değerlendirilmiş olması oldukça önemlidir.

Dünyanın birçok yerinde, PC nt. 1896 G→A mutasyonunun, HBeAg negatif KHB'li hastaların %18-94'ünde tespit edildiği bildirilmiştir<sup>17,25-27</sup>, ancak en yüksek prevalans oranı (> %85) Akdeniz ülkelerinde görülmektedir<sup>28-31</sup>. Prekor varyantlarının prevalansındaki bu coğrafi varyasyon, nt. 1858'de T bulunduran HBV genotiplerinin dağılımı ile ilişkilidir<sup>18</sup>. Bu sebeple, nt. 1858 pozisyonunda T-A baz eşleşmesi nedeniyle pregenomik kapsidasyon sinyalinin sekonder yapı stabilitesini artırdığı için, PC G1896A varyantı, Akdeniz ülkelerinde predominant olan D genotipi ile enfekte hastalar arasında en yaygın bulunmaktadır<sup>8,30,32</sup>. Bu durum viral replikasyonun devamını ve böylece immün temizlenmeden kaçmada avantaj sağladığı için viral persistansa yardımcı olmaktadır<sup>8,32</sup>. Japonya ve Güneydoğu Asya'da en çok görünen genotip B ve C'de, PC nt. G1896A varyantları orta sıklıkta bulunmaktadır. Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da yaygın görünen genotip A'da ise bu varyantlar daha nadir görünmektedir<sup>30</sup>. Yaptığımız bu çalışmada, bütün örnekler nt. 1853 pozisyonunda T nükleotidi içermektedir ve HBeAg negatif KHB'li hastaların çoğu (%57.1) nt. 1896 pozisyonunda PC stop kodon mutasyonuna (TGG→TAG, G-A değişimi) sahiptir. Stop kodon oluşumuna neden olan bu mutasyonların prevalansı, genotip D HBeAg negatif (25/34, %73.5) ve pozitif (3/15, %20) hastalar arasında anlamlı bir farklılık göstermektedir ( $p=0.001$ ) ve daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi HBeAg kaybı ile ilişkilidir<sup>2,24,26</sup>.

Bilindiği gibi PC nt. 1896'da stop kodon oluşumu ile sonuçlanan mutasyon, HBeAg negatif fenotipin oluşumundan sorumludur. Ancak bizim çalışmamızda HBeAg pozitif hastaların %20'sinde prekor mutasyonu tespit edilmesine rağmen HBeAg kaybolmamıştır. Benzer sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir<sup>17,19,23,28</sup>. PC G1896A mutasyonu ile HBeAg pozitifliği arasındaki bu uyumsuzluk, HBeAg serokonversiyon sürecinde vahşi tip HBeAg salgılayan virus popülasyonları ile karışık enfeksiyon oluşumu ile açıklanabilmekle birlikte, enfeksiyonun seyri sırasında HBeAg'nin temizlenmesi beklenmektedir. Ancak HBeAg negatifliğinin gelişmesinden sorumlu başka mutasyonların da olabileceğinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Çalışmamızda, HBeAg negatif hastaların yaş ortalaması ( $44.94 \pm 11.35$  yıl), HBeAg pozitif hastaların yaş ortalamasından ( $31.05 \pm 10.76$  yıl) yüksek bulunmuştur ( $p=0.001$ ). Bu durum bazı hastalar arasında, kronik HBV enfeksiyonunun ileri dönemlerinde serokonversiyon ile ilişkili immün baskı nedeniyle HBeAg'yi az veya hiç eksprese etmeyen HBV varyantlarının seçilmesi ile açıklanmaktadır<sup>30</sup>.

Yaptığımız çalışmada, HBeAg negatif ve pozitif hastalar ile ALT ( $p=0.356$ ) ve AST ( $p=0.800$ ) düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. HBV-DNA ise HBeAg pozitif hastalarda belirgin olarak yüksek bulunmuştur ( $p=0.001$ ). Çalışmada, HBV genotip D ile kronik enfekte HBeAg negatif hastaların büyük çoğunluğunun, HBV-DNA ve serum ALT-AST düzeylerinden bağımsız olarak PC G1896A stop kodon mutasyonuna sahip olduğu bulunmuştur. Choi ve arkadaşları<sup>27</sup>, G1896A mutasyonunun, HBeAg negatif hastalarda HBV-DNA ve ALT yüksek serum düzeyleri ile ilişkili olduğunu bildirmişler-

dir. Diğer yandan, aktif karaciğer hastalığı olan hastalarda saptanan G1896A mutasyonunun, ciddi karaciğer hastalığı veya fulminant hepatite neden olduğu belirtilmiş<sup>10</sup>; ancak inaktif HBeAg negatif taşıyıcılarda da sıklıkla tespit edildiği bildirilmiştir<sup>33</sup>. Bugüne kadar yapılan çeşitli çalışmalarda, PC mutasyonları ve HBV-DNA düzeyi ile hastalığın ciddiyeti arasında herhangi bir ilişki bulunmadığı ileri sürülmüştür<sup>17,34</sup>. Diğer yandan HBeAg negatif KHB'nin heterojen bir durum olabileceği ve PC HBV mutantları ile devamlı ilişkisinin bulunmadığı ifade edilmiştir<sup>34</sup>. Prekor mutantlarının oluşmasının, spontan veya interferon aracılı HBeAg'den anti-HBe'ye serokonversiyon sırasında arttığı belirtilmekte ve immün baskı ile seçildiği düşünülmektedir<sup>14,35</sup>. Bu sebeple de kronik HBV'nin doğal seyri sırasında, prekor mutanlı HBV'nin prevalan suç olarak seçilmeden önce en kısa sürede tedavi edilmesi gerekmektedir.

BCP gen bölgesinde nt. T1762/A1764 pozisyonunda görülen ikili mutasyonlar, PC bölgesinin distal bölgesinde TAG stop kodon mutasyonları ile ilişkili olarak, fulminant veya kronik hepatit olgularında bildirilmektedir<sup>14</sup>. BCP T1762/A1764 ikili mutasyonunun; PC mRNA ekspresyonu ile HBeAg sentezinde azalmaya ve ayrıca pregenomik mRNA ile kor mRNA etkinliğinde belirgin azalmaya neden olduğu saptanmıştır<sup>18</sup>. Yaptığımız bu çalışmada, BCP gen bölgesinde nt. 1762/1764'de görülen ikili mutasyonlar yüksek olup, %63.2'lere kadar ulaşmaktadır. Ancak T1762/A1764 mutasyonlarının HBeAg negatif (23/34, %67.6) ve HBeAg pozitifler (8/15, %53.3) arasında görülme sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p = 0.357$ ). Bu da, BCP gen bölgesindeki bu nükleotid değişikliklerinin, HBeAg sentezinin ortadan kaldırılmasında önemli bir faktör olmadığını göstermektedir. Benzer bir şekilde İran'da yapılan bir çalışmada da, HBeAg negatif ve pozitif hastalar arasında BCP nt. 1762/1764 ikili mutasyonlarının görülme oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir<sup>26</sup>. Ancak bazı değişik bölgelerde BCP nt. 1762/1764 mutasyonlarının, HBeAg negatif (%36-71.4) hastalarda pozitiflere (%11-42.5) oranla daha yaygın görüldüğü rapor edilmiştir<sup>21,23,24</sup>. Bu sonuçlar, HBeAg negatif ve pozitif hastalar arasında, BCP gen mutasyonlarının coğrafi olarak farklı dağılıma sahip olabileceğini, bu farklılığa viral faktörlerin (predominant olarak görülen HBV genotipi gibi) ve konak faktörlerinin (HLA tipi gibi) etki edebileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda, önceki çalışmalar<sup>17,27,34</sup> ile uyumlu olarak, BCP T1762/A1764 mutasyonları ile serum ALT, AST ve HBV-DNA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Ülkemizde Bozdayı ve arkadaşları<sup>36</sup> tarafından yapılan çalışmada da, T1762/A1764 mutasyonları ile HBV-DNA ve ALT düzeyi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte bazal kor gen bölgesindeki nükleotid değişikliğinin, hepatit B hastalığının aktivitesi ile ilişkili bir faktör olabileceği belirtilmiştir<sup>36</sup>. Yoo ve arkadaşlarının<sup>17</sup> Kore'de yaptıkları çalışmada ise, HBeAg negatif hastaların yaklaşık %89'unda bazal kor T1762/G1764 mutasyonu tespit edildiği ve HBV-DNA düzeyi veya hastalığın ciddiyeti arasında bir ilişki tespit edilmediği için, bu mutasyonların viral replikasyon düzeyi veya hastalığın ciddiyetine bakılmaksızın sıklıkla bulunduğu belirlenmiştir. Ancak yapılan başka çalışmalarda, T1762/A1764 mutasyonları ile ciddi karaciğer hasarı ve hepatoselüler karsinoma arasında bir ilişki bulunduğu bildirilmektedir<sup>37,38</sup>.

Ülkemizde ise BCP/PC gen bölgesi mutasyonları ile ilgili olarak sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Özgenç ve arkadaşları<sup>39</sup>, HBeAg negatif örnekleri, %92 oranında tespit ettikleri PC G1896A mutasyonları ile ilişkili bulmuşlar ve ayrıca %42 oranında G1899A mutasyonu tespit etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada<sup>39</sup> BCP mutasyonları, HBeAg pozitif ve negatif hastaların sırasıyla, %55 (11/20) ve %46 (11/24)'sında saptanmış olup, bizim çalışmamız ile uyumlu olarak her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bozdayı ve arkadaşlarının<sup>28</sup> yaptıkları bir çalışmada ise, HBeAg negatif hastaların %85 (29/34)'inde ve HBeAg pozitif hastaların %15 (7/47)'inde PC gen stop kodon mutasyonu (G1896A) tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızın bulguları ile uyumlu olarak, Batı Akdeniz'deki kronik hepatitli Türk hastalarda, HBeAg negatif fenotipin PC bölgesindeki mutasyonla ilişkili olduğu bildirilmiş ve diğer bölgelerdeki hastaların sonucu ile desteklenmesi gerektiği belirtilmiştir<sup>28</sup>. Yine Bozdayı ve arkadaşlarının<sup>36</sup> yaptığı başka bir çalışmada, BCP 1762/1764. nt'lerdeki mutasyon HBeAg negatiflerde %29, HBeAg pozitiflerde ise %17.2 oranında bulunmuştur. Bizim çalışmamızda olduğu gibi, her iki grup arasında bazal kor mutasyonlarının görülme sıklığı açısından anlamlı bir ilişki bulunmasa da, mutasyon oranı bizim çalışmamızın bulgularından oldukça düşüktür. Sünbül ve arkadaşlarının<sup>40</sup> yaptıkları çalışmada, BCP 1762/1764. nt'lerdeki mutasyon oranının HBeAg negatif (%34) ve pozitif (%21.3) hastalar arasındaki dağılımı anlamlı bulunmamıştır. Yine bu çalışmada, G1896A mutasyonunun oranı HBeAg negatiflerde %76 (38/50), HBeAg pozitiflerde %12.8 (6/47) olarak saptanmış ve bizim çalışmamızda da olduğu gibi dağılım istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur<sup>40</sup>.

HBV BCP gen bölgesinde bazı delesyonların tanımlandığı, ancak en yaygın olanının TA yönünden zengin, transkripsiyonun başlangıç bölgesi olan TATA bağlayan alanı etkileyen ve HBeAg ekspresyonunda azalmaya neden olan 8 bç'lik delesyon mutasyonu olduğu bildirilmiştir. Yaptığımız bu çalışmada, örneklerden bir tanesinde, bazal kor gen bölgesinde nt. 1763-1770 arasında görülen 8 bç'lik "GGTCTTTG" delesyonu tespit edilmiştir. Ancak bu mutasyonun tespit edildiği örnek, HBeAg pozitif olup, henüz serokonversiyon gerçekleşmemiştir ve PC gen bölgesinde de stop kodon mutasyonuna sahiptir. Sayıca fazla örnekte tespit edilemediği için, viral yük ve HBeAg ekspresyonu ile arasındaki ilişki gösterilememiştir. Bu 8 bç'lik delesyon mutasyonu, ülkemizde Bozdayı ve arkadaşları<sup>36</sup> tarafından dört hastada tespit edilmiş olup, Hindistan'da<sup>24</sup> bir, İran'da<sup>41</sup> dört ve Pakistan'da<sup>42</sup> da dört hastada bildirilmiştir. Çok sık rastlanmayan bu delesyon mutasyonlarının; virusun davranışına, moleküler patolojisine ve immün yanıt üzerine olan etkisinin, daha ileri in vitro çalışmalar ile aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak yaptığımız bu çalışma, BCP ve PC gen bölgelerinde meydana gelen farklı mutasyonların sıklığı ve genetik heterojenitesini gösteren önemli veriler sağlamıştır. Çalışmaya dahil edilen hastaların çoğu BCP ve/veya PC gen varyantları ile enfektedir. PC G1896A stop kodon mutasyonu, Mersin ilinde yaşayan HBV genotip D ile kronik enfekte hastalarda, HBeAg negatif fenotipin oluşmasında önemli bir role sahip gibi görünmektedir. HBV BCP ve/veya PC stop kodon mutasyonuna sahip hastalar ile mutasyona uğramamış virus taşıyan hastalar arasında serum HBV-DNA veya ALT-AST düzeylerinde belirgin farklılık görülmemiştir. Bu sebeple bu mutasyonların, HBeAg serokonversiyonu

sırasında sıklıkla olduğu ve viral replikasyon düzeyi veya hastalığın ciddiyetine bakılmaksızın yaygın olarak bulunduğu söylenebilir. Çalışma bulgularının, ülkemizde, sınırlı bir coğrafi bölge olan Mersin ilinde oldukça detaylı mutasyon paternlerinin dağılımını içermesinden dolayı, ileride bu doğrultuda gerçekleştirilecek olan çalışmalara ışık tutacağı düşüncesindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Pawlotsky JM. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 1: S125-9.
2. Revill P, Locarnini S. Viral factors and predicting disease outcomes in chronic hepatitis B. *Gut* 2015; 64(2): 191-3.
3. Mistik R, Balık İ. Türkiyede viral hepatitlerin epidemiyolojik analizi, s: 9-55. Tekeli E, Balık İ (ed), Viral Hepatit. 2003. Viral Hepatitle Savaşım Derneği, Ankara.
4. Uzunalımoğlu O, Yurdaydın C, Cetinkaya H, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Turkey. *Dig Dis Sci* 2001; 46(5): 1022-8.
5. Ezzikouri S, Ozawa M, Kohara M, Elmdaghri N, Benjelloun S, Tsukiyama-Kohara K. Recent insights into hepatitis B virus-host interactions. *J Med Virol* 2014; 86(6): 925-32.
6. Sheldon J, Rodès B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2006; 13(7): 427-34.
7. Gao S, Duan ZP, Coffin CS. Clinical relevance of hepatitis B virus variants. *World J Hepatol* 2015; 7(8): 1086-96.
8. Yokosuka O, Arai M. Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B. *Med Mol Morphol* 2006; 39(3): 113-20.
9. Sharma S, Sharma B, Singla B, et al. Clinical significance of genotypes and precore/basal core promoter mutations in HBV related chronic liver disease patients in North India. *Dig Dis Sci* 2010; 55(3): 794-802.
10. Malik A, Singhal DK, Albanyan A, Husain SA, Kar P. Hepatitis B virus gene mutations in liver diseases: a report from New Delhi. *PLoS One* 2012; 7(6): e39028.
11. Zheng JX, Zeng Z, Zheng YY, et al. Role of hepatitis B virus base core and precore/core promoter mutations on hepatocellular carcinoma in untreated older genotype C Chinese patients. *J Viral Hepat* 2011; 18(10): e423-31.
12. Biswas A, Banerjee A, Chandra PK, et al. Variations in the functional domain of basal core promoter of hepatitis B virus among Eastern Indian patients with prevalence of genotypes A, C, and D among the same ethnic population. *J Med Virol* 2011; 83(2): 253-60.
13. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Book 3. 1989, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
14. Cho SW, Hahn KB, Kim JH. Reversion from precore/core promoter mutants to wild-type hepatitis B virus during the course of lamivudine therapy. *Hepatology* 2000; 32(5): 1172-4.
15. Emekdas G, Tezcan S, Aslan G, et al. Determination of hepatitis B virus genotypes in chronic hepatitis B patients in Mersin province, Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(3): 432-45.
16. Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, Kew MC. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol* 2008; 80(1): 27-46.
17. Yoo BC, Park JW, Kim HJ, Lee DH, Cha YJ, Park SM. Precore and core promoter mutations of hepatitis B virus and hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B in Korea. *J Hepatol* 2003; 38(1): 98-103.
18. Hakami A, Ali A, Hakami A. Effects of hepatitis B virus mutations on its replication and liver disease severity. *Open Virol J* 2013; 7: 12-8.

19. Abbas Z, Muzaffar R, Siddiqui A, Naqvi SA, Rizvi SA. Genetic variability in the precore and core promoter regions of hepatitis B virus strains in Karachi. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 20.
20. Zhang Q, Liao Y, Cai B, et al. Incidence of natural resistance mutations in naïve chronic hepatitis B patients: a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 2015; 30(2): 252-61.
21. Du H, Li T, Zhang HY, et al. Correlation of hepatitis B virus (HBV) genotypes and mutations in basal core promoter/precore with clinical features of chronic HBV infection. *Liver Int* 2007; 27(2): 240-6.
22. Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1999; 179(4): 775-82.
23. Ayed K, Gorgi Y, Ayed-Jendoubi S, et al. Hepatitis B virus genotypes and precore/core-promoter mutations in Tunisian patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Infect* 2007; 54(3): 291-7.
24. Chauhan R, Kazim SN, Bhattacharjee J, Sakhuja P, Sarin SK. Basal core promoter, precore region mutations of HBV and their association with e antigen, genotype, and severity of liver disease in patients with chronic hepatitis B in India. *J Med Virol* 2006; 78(8): 1047-54.
25. Banerjee A, Banerjee S, Chowdhury A, et al. Nucleic acid sequence analysis of basal core promoter/precore/core region of hepatitis B virus isolated from chronic carriers of the virus from Kolkata, eastern India: low frequency of mutation in the precore region. *Intervirology* 2005; 48(6): 389-99.
26. Bahramali G, Sadeghizadeh M, Amini-Bavil-Olyae S, et al. Clinical, virologic and phylogenetic features of hepatitis B infection in Iranian patients. *World J Gastroenterol* 2008; 14(35): 5448-53.
27. Choi JW, Ahn SH, Park JY, et al. Hepatitis B e antigen-negative mutations in the precore and core promoter regions in Korean patients. *J Med Virol* 2009; 81(4): 594-601.
28. Bozdayi AM, Bozkaya H, Türkyilmaz A, et al. Polymorphism of precore region of hepatitis B virus DNA among patients with chronic HBV infection in Turkey. *Infection* 1999; 27(6): 357-60.
29. Brunetto MR, Giarin M, Saracco G, et al. Hepatitis B virus unable to secrete e antigen and response to interferon in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1993; 105(3): 845-50.
30. Funk ML, Rosenberg DM, Lok AS. World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J Viral Hepat* 2002; 9(1): 52-61.
31. Laras A, Koskinas J, Avgidis K, Hadziyannis SJ. Incidence and clinical significance of hepatitis B virus precore gene translation initiation mutations in e antigen-negative patients. *J Viral Hepat* 1998; 5(4): 241-8.
32. Ouneissa R, Bahri O, Alaya-Bouaffif NB, et al. Frequency and clinical significance of core promoter and pre-core region mutations in Tunisian patients infected chronically with hepatitis B. *J Med Virol* 2012; 84(11): 1719-26.
33. Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, et al. Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol* 1990; 64(3): 1298-303.
34. Chan HL, Leung NW, Hussain M, Wong ML, Lok AS. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B in Hong Kong. *Hepatology* 2000; 31(3): 763-8.
35. Sonneveld MJ, Rijckborst V, Zeuzem S, et al. Presence of precore and core promoter mutants limits the probability of response to peginterferon in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2012; 56(1): 67-75.
36. Bozdayi AM, Bozkaya H, Türkyilmaz AR, et al. Nucleotide divergences in the core promoter and precore region of genotype D hepatitis B virus in patients with persistently elevated or normal ALT levels. *J Clin Virol* 2001; 21(1): 91-101.
37. Juniastuti, Utsumi T, Aksono EB, et al. Predominance of precore mutations and clinical significance of basal core promoter mutations in chronic hepatitis B virus infection in Indonesia. *Biomed Rep* 2013; 1(4): 522-8.
38. Qu LS, Zhu J, Liu TT, et al. Effect of combined mutations in the enhancer II and basal core promoter of hepatitis B virus on development of hepatocellular carcinoma in Qidong, China. *Hepatol Res* 2014; 44(12): 1186-95.

39. Ozgenc O, Ozacar T, Erensoy S, et al. Clinical significance of basal core promoter and precore mutations in chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 2007; 54(80): 2319-23.
40. Sunbul M, Sugiyama M, Kurbanov F, et al. Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subgenotype D1 prevalent in Turkey. *Microbiol Immunol* 2013; 57(2): 122-9.
41. Veazjalali M, Norder H, Magnus L, Jazayeri SM, Alavian SM, Mokhtari-Azad T. A new core promoter mutation and premature stop codon in the S gene in HBV strains from Iranian patients with cirrhosis. *J Viral Hepat* 2009; 16(4): 259-64.
42. Ahmed CS, Wang ZH, Bin Z, Chen JJ, Kamal M, Hou JL. Hepatitis B virus genotypes, subgenotypes, precore, and basal core promoter mutations in the two largest provinces of Pakistan. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24(4): 569-73.