



**T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**KRONİK HEPATİT B ENFEKSİYONLU OLGULAR VE  
ASEMPTOMATİK HEPATİT B TAŞIYICILARI İLE MHC  
CLASS 2 MOLEKÜLLERİNİN İLİŞKİSİ**

**DR. İ.TUBA SAYICI  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
DR. ÖZLEM KANDEMİR**

**MERSİN – 2008**



**T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**KRONİK HEPATİT B ENFEKSİYONLU OLGULAR VE  
ASEMPTOMATİK HEPATİT B TAŞIYICILARI İLE MHC  
CLASS 2 MOLEKÜLLERİNİN İLİŞKİSİ**

**DR. İ. TUBA SAYICI  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. ÖZLEM KANDEMİR**

**Bu tez, BAP-TFDTB (ÖK) 2006-1 kodlu proje olarak  
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.**

**MERSİN - 2008**

## TEŐEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında, çalışma sũresince ve yapım aŐamasında yapıcı ve bilimsel eleŐtirilerini esirgemeyen, her fırsatta bilgi ve deneyimlerini paylaŐan değerli hocam ve tez danıŐmanım olan Sayın Doç.Dr. Özlem Kandemir'e en içten teŐekkũrlerimi sunarım.

Asistanlığım sũresince tũm sorunlarımıza anlayıŐla yaklaşan, bilgi ve birikimlerini bizden esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof.Dr.Ali Kaya'ya, Doç.Dr. Gũlden ErsŐz'e, Yrd.Doç.Dr. Elif Őahin'e ; ayrıca rotasyonlarım sırasında eğitimime katkılarından dolayı İç Hastalıkları, Mikrobiyoloji, Pediatri Anabilim Dallarının değerli Őđretim ũyelerine teŐekkũrũ bir borç bilirim.

Bu tezin hazırlanmasında ve esas emek gerektiren laboratuvar aŐamasında yardımlarını esirgemeyen, Sayın Doç.Dr. Gũrbũz Polat ve ArŐ GŐr.Dr. Deniz Gũn baŐta olmak ũzere Biyokimya Anabilim Dalının tũm değerli Őđretim ũyeleri ve araştırma gŐrevlilerine teŐekkũr ederim.

Son olarak, eŐim Yasin Sayıcı'ya, aileme ve asistanlığım boyunca birlikte çalıŐmaktan zevk duyduğum tũm asistan arkadaŐlarıma yũrekten teŐekkũr ederim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	5
İNGİLİZCE ÖZET.....	6
GİRİŞ VE AMAÇ.....	7
GENEL BİLGİLER.....	8
Tarihçe.....	8
Virüsün Yapısı ve Genomik Organizasyonu .....	8
Viral Replikasyon.....	10
Patogenez.....	11
MajörDoku Uyuşum Kompleksi Yapısı.....	12
Class I MHC Molekülleri.....	14
Class II MHC Molekülleri .....	16
MHC Moleküllerinin Fonksiyonu ve Sentezi .....	17
MHC Moleküllerinin Hastalıklarla Olan İlişkisi.....	18
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21
Araç ve Gereç.....	21
Yöntemler.....	23
İstatistiksel Yöntemler.....	28
BULGULAR.....	29
TARTIŞMA.....	36
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	39
KAYNAKLAR.....	40
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	44

<b>ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ.....</b>	<b>45</b>
<b>TABLOLAR DİZİNİ.....</b>	<b>46</b>

## ÖZET

Kronik hepatit B enfeksiyonu tüm dünyada 400 milyondan fazla insanı etkilemektedir. Hepatit B virüsü asemptomatik hepatit, akut hepatit, kronik hepatit, siroz, hepatoselüler kanser gibi farklı klinik tablolara neden olabilir. Bu klinik durumların çeşitliliği muhtemelen virüsün kendi özelliklerine, konağın immunolojik faktörlerine ve genetik faktörlere dayanmaktadır.

Bu çalışmada, toplumumuzdaki kronik hepatit B hastaları ve asemptomatik hepatit B taşıyıcılarda MHC class-2 tiplendirilmesi yapılarak, belirlenen MHC-class 2 tipinin hastalık seyri ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmaya, 48 kronik hepatit B hastası ile 46 asemptomatik hepatit B taşıyıcısı alındı. DNA'lar uygun oligonükleotid kullanarak PCR ile çoğaltıldı. Ardından agaroz jel elektroforez tekniği uygulanarak oluşan PCR ürünleri UV transilluminatör yardımıyla görüntüledi. Jel üzerinde görüntülenen bantların uzunluklarından yararlanılarak genotipleme yapıldı. HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 allellerindeki polimorfizm izlendi. Çalışma hem allel hem de genotip bazında yapıldı. Allel bazında yapılan çalışmaya göre; HLA-DRB1\*11 ve HLA-DQA1\*03 allelleri taşıyan bireylerin daha çok taşıyıcı grupta bulunduğu, HLA-DQB1\*01 alleli taşıyan bireylerin ise kronik hepatitli grupta yer aldığı gözlemlendi.

Genotip bazında yapılan çalışmaya göre; HLA-DRB1\*1415 ve HLA-DQB1\*0101 genotipi taşıyan bireylerde hastalığın kronikleşme oranının daha yüksek olduğu tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler: Asemptomatik hepatit B, Kronik hepatit B, MHC class II**

## **ABSTRACT**

### **The Association of MHC Class 2 Molecules with Chronic Hepatitis B Infected Cases and Asymptomatic Hepatitis B Porters.**

Chronic hepatitis B infection affects over 4 million people all over the world. Hepatitis B virus can cause various clinical conditions such as asymptomatic hepatitis, acute hepatitis, chronic hepatitis, cirrhosis, hepatocellular cancer. The variety of these clinical conditions depend on generally its own virological features, the hosts immunological factors and genetical factors.

In this study, we aimed to classify MHC Class 2 of chronic hepatitis B cases and asymptomatic hepatitis B porters in our population and to assess the prognosis of disease according to MHC Class 2 type in early stage.

48 chronic hepatitis B cases and 46 asymptomatic hepatitis B porters participated in this study. DNAs have been amplified by polymerase chain reaction by using appropriate oligonucleotides. Then these PCR products have been displayed by agarose gel electrophoresis technique by using UV transilluminator. The polymorphism of the alleles HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 have been observed referring to genotyping based on the lengths of bands displayed on the gel. The study have been performed on the basis of both alleles and genotype.

Referring to our study based on alleles; among individuals with HLA-DQB1\*01 alleles, were more likely in porters group whereas among individuals with HLA-DRB1\*11 and HLA-DQA1\*03 alleles, were more likely in chronic disease group.

Referring to our study based on genotype; its determined that among individuals with HLA-DRB1\*1415 and HLA-DQB1\*0101 alleles, advancing to chronic disease ratio is higher.

**KEY WORDS : Asymptomatic hepatitis B, Chronic hepatitis B, MHC Class II**

## GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit B tüm dünyada olduğu gibi, ülkemizde de halk sağlığını ilgilendiren en önemli hastalıklardan biridir. 1982'den beri aşı ile korunulabilen bir hastalık olmasına rağmen, bugün Dünya'da 2 milyar insan Hepatit B virüsü ile infektidir. Hepatit B virüsü (HBV); asemptomatik hepatit, akut hepatit, kronik hepatit, siroz, hepatoselüler kanser gibi bir çok klinik tabloya neden olabilir. Enfeksiyonun değişik klinik tablolar sergilemesi genel olarak virüse ait faktörlere, konağın immünolojik ve genetik faktörlerine bağlıdır.

HBV enfeksiyonunda, karaciğer hasarının oluşmasında, viral faktörlerden çok konak immün yanıtının rolü vardır. Yüksek düzeyde viral replikasyon gösteren, fakat normal karaciğer enzim düzeyi ve histopatolojisine sahip olan asemptomatik taşıyıcıların varlığı da, virüsün direk sitopatik etkisinin bu konuda çok ön planda olmadığını göstermektedir. Virüsün karaciğerden temizlenmesi spesifik immün yanıtla bağlıdır. Akut enfeksiyonda, viral antijene karşı CD4 ve CD8 T hücre yanıtında artış görülürken, virüsün kolayca temizlenemediği kronik enfeksiyonlarda CD4 ve CD8 T hücre yanıtları belirgin olarak azalmıştır.

HBV enfeksiyonu ve konak genetiğini araştıran çalışmaların çoğu, HLA molekülleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Genetik ilişkiler kompleks olduğu için HBV enfeksiyonu direnci ve duyarlılığından sorumlu tek bir allel göstermek mümkün değildir.

Bu çalışmada amacımız; toplumumuzdaki kronik hepatit B ve asemptomatik hepatit B taşıyıcılarda MHC class-2 tiplendirilmesi yapılarak, hangi allellerin hastalığın kronikleşmesinde, hangilerinin asemptomatik taşıyıcı olarak kalmasında rolü olabileceğinin belirlenmesidir.



## GENEL BİLGİLER

### Tarihçe

Hepatit B Virus (HBV) akut hepatit, kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinomun en önemli etkenlerinden biridir. Tüm dünyada 400 milyonu aşkın sayıda kişinin HBV ile kronik olarak enfekte olduğu ve her sene global olarak izlenen 530.000 hepatoselüler karsinom olgusunun 316.000'inin HBV ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Her yıl dünyada 1.000.000'a yaklaşan sayıda kişi, HBV enfeksiyonu ile ilgili komplikasyonlardan kaybedilmektedir. Etkili bir aşısı olan HBV enfeksiyonu ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak önemini sürdürmektedir <sup>1,2</sup>.

HBV ilk defa Blumberg ve arkadaşları tarafından 1965 yılında 'Avustralya antijeni' olarak tanımlanan bir serum proteini olarak rapor edilmiş, 1970 yılında ise tüm virionun elektron mikroskopi görüntüleri saptanarak 'Dane Partikülleri' adını almıştır. HBV'nin 42 nm büyüklüğündeki Dane partikülleri dışında, 22 nm büyüklüğünde sferik ve 22x100-200 nm büyüklüğünde filamantöz partikülleri de elektron mikroskopunda tarif edilmiş, bunu izleyen yıllarda çeşitli çalışmalarda virusun genomik yapısı ve proteinleri karakterize edilmiştir <sup>3</sup>.

### Virusun Yapısı ve Genomik Organizasyonu

HBV küçük, zarflı bir DNA virusudur ve diğer DNA viruslarından farklı bazı özellikler taşımaktadır. Viral genom yaklaşık 3200 nükleotidden oluşan oldukça küçük ve kısmen çift, kısmen tek iplikli çembersel DNA'dan oluşur ve ikozahedral bir kapsid içerisinde bulunur, bunun dışında da üç farklı yüzey antijenini taşıyan lipid yapılı zarf yer alır. HBV bir DNA virusu olmasına rağmen revers transkriptaz (RT) enzimi kodlar ve RNA aracısı üzerinden replike olur. HBV ile enfekte hücre çekirdeğinde, bir mini-kromozom şeklinde bulunan ve kovalent bağlı çembersel DNA (covalently closed circular DNA, ccc DNA) adı verilen replikasyon ve transkripsiyon aracısı moleküle dayanan, karmaşık bir replikasyon stratejisine sahiptir. Zarflı bir virus olmasına rağmen eter, düşük pH ve ısıya oldukça dirençlidir. Bu özellikler, virusun kişiden kişiye geçişteki etkinliğine katkıda bulunur ve dezenfektan direncini sağlar <sup>4,5</sup>.

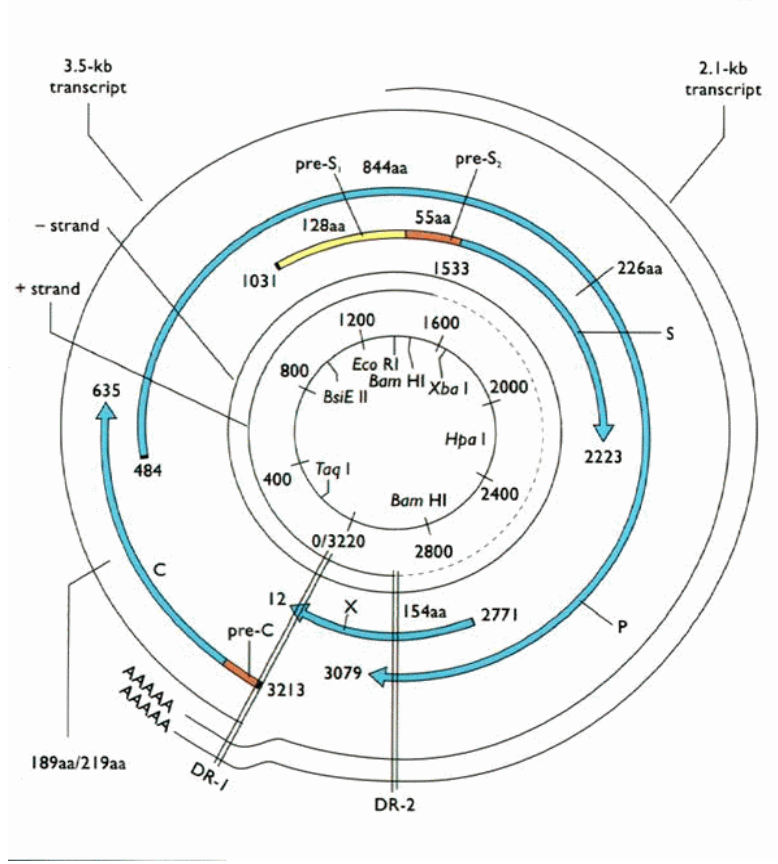
HBV'nin A'dan H'ye kadar 8 majör genotipi mevcuttur.

Bunun dışında HBs antijeninin yapısal farklılıklarına göre HBV serotipleri de tanımlanmıştır. Ortak 'a' determinantı taşıyan HBV serotipleri günümüzde 9 grupta incelenmektedir. S geninin dizi analizi, hem genotip hem serotipleri tanımlar.

HBV genomu dört açık okuma alanı (open reading frame, ORF) oluşturacak şekilde organize olmuştur. Bunlardan en büyüğü olan Pol, viral polimerazı kodlar. Zarf yapılarına ait ORF'de Pol ORF'si içinde yer alır. Core (C) ve X ORF'leri de zarf ORF'si ile kısmi olarak üst üste binmiş şekilde bulunur<sup>3</sup>. HBV'nin genomik organizasyonu şekil 1'de verilmiştir.

HBV zarf proteinleri, karboksi terminalinde yer alan 225 aminoasitleri ortak olan küçük HBs antijeni (SHBs Ag; p24 ve gp27), orta HBs antijeni (MHBs Ag; gp33 ve gp 36) ve büyük HBs antijeni (LHBs Ag; p39 ve gp 42)'den meydana gelmektedir. Dane partiküllerinde her üç bileşen de yer alır. L ve M antijenleri, yaklaşık eşit miktarlarda bulunur ve birlikte virion zarfındaki proteinlerin %30'unu meydana getirir. S antijeni ise virion zarfının ana proteini şeklindedir. HBV yüzey antijenleri, enfekte hücrelerden, infeksiyöz virion miktarının yaklaşık 100 katı oranında salınan, non-enfektif filamantöz ve sferik yüzey antijeni partiküllerinin de yapısını oluştururlar. Bu sferik ve filamantöz partiküller, enfekte kişilerin plazmasında milimetrede birkaç yüz mikrogram düzeylerinde bulunabilmekte ve partiküllerin antikorlarıyla oluşturduğu komplekslerin HBV ile enfekte kişilerde izlenen immun kompleks reaksiyonlarında sorumlu olduğu bilinmektedir<sup>4.5</sup>.

Viral özyapı (core) ve polimeraz gen ürünleri, kapsid proteinlerinden nükleokapsid oluşumu (HBcAg) ve viral DNA replikasyonunda görev alır. Viral polimeraz polipeptidinin terminal protein adı da verilen amino terminali, pre-genomik RNA'nın paketlenmesi ve DNA sentezi için priming görevini üstlenirken, karboksi terminali revers transkriptaz ve RN'az-H aktivitesinden sorumludur<sup>4.6</sup>. HBe antijeni (HBe Ag) pre-kor / kor bölgesinden sentezlenen ürünün proteolizi ile meydana gelir. HBeAg'nin ilk bölümü molekülün endoplazmik retikulum lümenine taşınması için bir sinyal peptidi görevini yaparken, karboksi terminalinden 29 aminoasidin golgiden çıkarılması sonrasında olgunlaşan HBeAg kana salınır<sup>4.7.8</sup>.



Şekil 1. HBV'nin genomik organizasyonu.

### Viral Replikasyon

HBV'nin insan hepatositlerine tutunma ve giriş için kullandığı yüzey molekülleri henüz kesin olarak aydınlatılamamıştır. HBsAg'nin pre-S1 bölgesinin hedef hücreye tutunmada, önemli görev taşıyan epitoplara içerdiği saptanmıştır. Tutunma sonrasında virüs zarfı ve hücre membranı arasında füzyon meydana gelir ve nükleokapsid sitoplazmaya salınır. Kapsidin parçalanması ile viral genomik DNA ve polimeraz çekirdeğe taşınır<sup>5.9.10.11</sup>.

Kısmen çift sarmallı ve 2 ucu serbest DNA'nın kısa sarmalının eksik olan bölümü endojen DNA polimeraz tarafından tamamlanır. Uzun sarmalın 5' ve 3' uçları arasındaki açıklıkta bu dönemde onarılır ve sonuçta tümüyle çift sarmallı, süperkırımlı uçları kapalı sirküler DNA (ccc DNA) oluşur. ccc DNA, HBV'nin hepatositlerde persistansında etkili olan moleküldür ve virusun antiviral tedavi sonrasında görülen reaktivasyonlarından sorumludur.

Kalıp olarak ccc DNA'dan konak hücre DNA polimerazının yardımı ve viral düzenleyiciler ile viral RNA'lar sentezlenir.

HBV'da bilinen 4 mRNA transkripti vardır. 3.5 kb'lık kalıp viral replikasyon ve pre C/C ile polimeraz proteininin ekspresyonundan sorumludur. 2.4 kb'lık transkript pre S1, pre S2 ve HBsAg'yi kodlarlar. 2.1 kb'lık olan pre S1 haricindeki yüzey proteinini kodlar. 0.7 kb'lık transkript ise X proteininden sorumludur.

Translasyon sırasında oluşan pregenom kor partikülü içine yerleşir. Konak hücre sitoplazmasında devam eden replikasyon boyunca 3.5 kb'lık RNA'dan (-) DNA sarmalı sentezlenir. Negatif iplikli DNA oluştuktan sonra RT enzimi RNaz H aktivitesi ile pre-genomik RNA'yı parçalar ve pozitif ipliğin sentezine başlar. Kısmi çift iplikli DNA molekülü oluştuğunda, nükleokapsid partikülleri endoplazmik retikulumda tomurcuklanma ile zarf yapılarını kazanmalarına imkan sağlayacak olgunlaşma sürecine girerler. Oluşan nükleokapsidlerin bir kısmı hücre çekirdeğine geri dönerek hücre içindeki ccc DNA kopya havuzunu artırma işlevi de yapabilmektedir. Her üç zarf proteinini içeren virionlar, endoplazmik retikulumdan golgi kompleksine taşınır. Bu aşamalar sırasında zarf proteinlerinin glikolizasyonu tamamlanır ve olgun virion kan dolaşımına salınır<sup>3.4.12.13</sup>.

### **Patogenez**

Kronik HBV enfeksiyonlarında meydana gelen karaciğer hasarı çoğu kez immün sistem ve HBV ile enfekte hepatositlerin etkileşimine bağlıdır<sup>14</sup>.

İnterferon alfa, beta, gama; tümör nekrozis faktör (TNF)-alfa gibi antiviral sitokinler virusun temizlenmesinde önemli rol oynarken, enfekte hepatositlerin sitotoksik T lenfositlerince ortadan kaldırılması, hem virusun temizlenmesine hem de süregelen karaciğer hasarına katkıda bulunur.

Akut, kendi kendini sınırlayan HBV enfeksiyonu izlenen kişilerde; bir çok viral epitopa karşı poliklonal ve multispesifik mononükleer hücre aktivasyonu görülmektedir. Bu yanıtta MHC sınıf II bağımlı CD4<sup>+</sup> yardımcı T lenfositleri ve CD8<sup>+</sup> sitotoksik T lenfositleri rol oynamaktadır. Akut enfeksiyonda, tip I CD4<sup>+</sup> T hücre yanıtı daha baskın gözlenmektedir<sup>14.15</sup>.

Kronik HBV enfeksiyonu durumunda ise sitotoksik T lenfosit yanıtı genellikle düşük düzeydedir. Kronik B hepatiti izlenen kişilerde IL-4, IL-5, IL-10

salgılanması ile karakterize tip 2 yardımcı T lenfosit yanıtı fazla olmakta, sonuç olarak humoral yanıtı yönlendirilmiş bir bağışıklık söz konusu olmaktadır. İntrahepatik yerleşim gösteren, HBV spesifik sitotoksik T lenfositleri kronik infeksiyonlarda da saptanmakta ve infeksiyonun alevlenmelerinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Buna karşın kronik B hepatitinde, hücresel sitotoksik yanıt virüsü temizlemekte yetersiz kalmaktadır<sup>16.17</sup>.

HBV'nin, konaktan temizlenmesinde, adaptif bağışık yanıt kadar doğal bağışıklık mekanizmaları da önem taşımaktadır. Doğal bağışıklık mekanizmalarının aktivasyonu, HBV enfeksiyonunun ilk dönemlerinde gerçekleşir. Virus replikasyonundaki baskılanma, tipik olarak T lenfositlerin en yüksek düzeyde infiltrasyonu ve karaciğer hasarının başlamasından daha önce gerçekleşmektedir. Bu veriler, doğal bağışıklığın, enfekte kişilerdeki viral replikasyonun baskılanmasındaki önemi ve virusa karşı immün yanıtındaki rolüne dikkati çekmektedir<sup>14.18</sup>.

Virüsün persistansı veya temizlenmesinde konağın immün cevabı, anahtar role sahiptir. Çünkü poliklonal sitotoksik T lenfositlerin cevabı virüsün temizlenmesi ile yakından ilişkilidir<sup>19</sup>. Bu immün cevap genetik olarak belirlenir ve HLA Class I ve II molekülleri tarafından kontrol edilir. HLA molekülleri, yabancı antijenleri sırayla CD8 sitotoksik T lenfositleri ve CD4 yardımcı T hücrelerine sunar. Bu molekülleri kodlayan genler, insan genomundaki en polimorfik moleküllerdir ve hepatit B infeksiyonunun seyrinde etkilidir.

### **Majör Doku Uyuşum Kompleksi Yapısı**

Bağışıklık sisteminin kendinden olanı veya olmayanı tanıması için gerekli olan “doku antijenlerini” kodlayan gen bölgesi, Majör Doku Uyuşum Kompleksi, MHC olarak adlandırılır. İlk olarak kemirgenlerde tanımlanan, bu bölgenin insandaki karşılığı, 6. kromozomun kısa kolunda yerleşmiş olup ilk kez beyaz kan hücrelerinde gösterilmiştir. Bu genler HLA (Human Leukocyte Antigens; İnsan lökosit antijeni) bölgesi olarak da adlandırılır. Çok sayıda genin yer aldığı bu bölgede immün yanıtla ilgisi tanımlanmamış birçok gen de yer alır<sup>20.21.22.23.24</sup>.

1931 yılında Landsteiner eritrosit antijenlerini keşfetmiş, kan transfüzyonu için grup uyumunun gerekliliğini ve doku, organ transplantasyonları için de doku

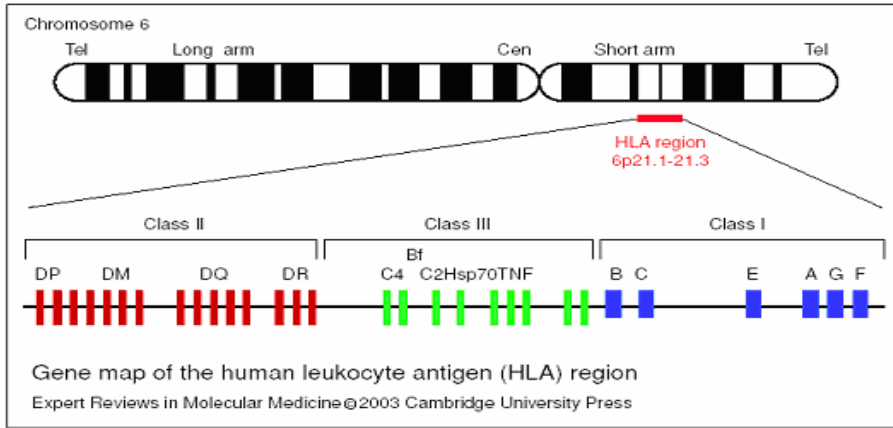
antijenlerinin uyumundan söz etmiştir. 1930'lu yıllarda R.A. Gorer ve G.D. Snell farelerde doku antijenlerinin varlığından bahsetmiş ve bunların gen bölgesine doku uyuşum kompleksi (Major Histocompatibility Complex; MHC) adını vermişlerdir. Daha sonraki araştırmalar MHC kompleksinin bütün memeli türlerinde bulunduğunu göstermiştir. 1958'de Daussel tarafından insanlarda doku antijenleri tespit edilmiş, yine aynı yıl Van Rood ve arkadaşları tarafından çok sayıda transfüzyon uygulanmış lösemi hastalarının ve çok doğum yapmış kadınların serumlarında lökositlere karşı oluşmuş antikolar saptanmış ve bu antijenlere HLA ismini vermişlerdir. HLA, aynı tür içinde bireysel farklılık gösteren bir allo antijendir. Daha sonraki yıllarda bütün vücut hücrelerinde buldukları anlaşılmış ve doku nakillerinde de çok önemli rollerinin olduğu, transplantasyonun başarısını belirledikleri tespit edilmiştir. Bu sisteme MHC antijenleri, sentezini sağlayan gen bölgesine de MHC kompleksi denir.

Belli bir doku tipine sahip insanların bazı hastalıklara daha yatkın olduğu 1970'li yıllarda saptanmıştır.

Son 10 yıl içerisinde MHC molekülleri kristalize edilmiş, rekombinant DNA yöntemleri kullanılarak MHC kompleksi genlerinin baz dizilimi ve bu genlerin sentezini sağladığı MHC antijenlerinin amino asit dizileri ortaya konabilmiştir<sup>21</sup>.

MHC, kodlanan proteinlerin özelliklerine göre sınıf I, II, III olarak alt bölgelere ayrılır. Sınıf I bölgesi, MHC'nin telomerik ucunda yer alır. HLA-A,-B,-C olarak da tanınan klasik transplantasyon antijenlerini ve HLA-E,F,G gibi klasik olmayan sınıf I antijenleri kodlayan gen lokuslarını, HLA H, J, K, L, X gibi psödogenleri ve gen segmentlerini içerir. Sınıf II bölgesi ise sentromere yakın yerleşmiş olup; bu bölgede HLA-DRA, -DRB,-DQA,-DQB,-DPA,-DPB,-DNA,-DMA,-DOB lokusları yanı sıra çeşitli psödogenler, LMP1, LMP2, TAP1, TAP2 gibi antijen işlenmesinde rol alan genleri bulundurur. HLA DRB ile HLA B bölgeleri arasında Sınıf III genleri bulunur, C4B, C4A, Bleferidin, C2, HSP-70, TNF-a, TNF-b bu bölgede kodlanan bazı genlerin ürünüdür<sup>20.21.22.23</sup> (Şekil 2). MHC III bölgesi immunolojik öneme sahiptir. Pek çok kompleman komponenti için gereken yapısal genler, glukokortikoidlerin biyosentezi için kritik bir enzim olan 21-Hidroksilaz için gereken genler de burada kodlanır. Bunlar dışında insanda MHC III'ün distalinde ve MHC

l'in proksimalinde yer alan bölgenin MHC class IV olarak adlandırılması önerilmektedir<sup>22</sup>. Adı geçen lokusların bir kısmı, çok sayıda polimorfik allelin kodlanmasından sorumludur. HLA Tiplendirimi ile amaçlanan da bu allellerin ve kodladıkları antijenlerin belirlenmesidir<sup>20</sup>.



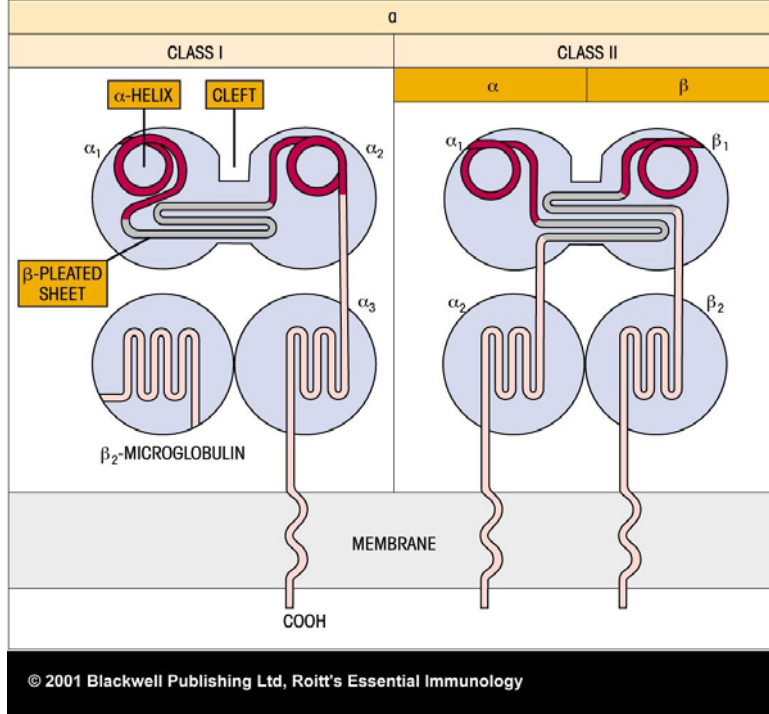
**Şekil 2:** HLA bölgesinin gen haritası<sup>21</sup>.

### **Class I MHC Molekülleri**

Class I moleküller, 44 kDa'luk bir ağır polipeptit zinciri ve nonkovalent olarak bağlı bulunduğu bir 12 kDa'luk daha küçük bir polipeptit olan  $\beta_2$  mikroglobulinden oluşurlar. Ağır zincirin en geniş parçası 3 globuler domain halinde organize olmuştur ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ; şekil 3) ve hücre yüzeyinden dışa doğru çıkıntı yapar. Ağır alfa zinciri MHC bölgesinde kodlanırken; hafif zincir Beta 2 mikroglobulin ( $\beta_2m$ ) ise MHC dışında 15. kromozomda kodlanır<sup>20,21,22,24</sup>. Hidrofobik kısım, molekülün membran içine saplar ve kısa bir hidrofilik sekans, C-terminalini sitoplazma içine taşır.

İnsan class I molekülünün kristal yapısının X ışını ile analizi, MHC fonksiyonunun anlaşılması açısından önemli bir olanak sağlamıştır<sup>23</sup>. Molekülün üç boyutlu yapısına bakıldığında membran dışında birbirine benzerlik (homoloji) gösteren bölgelerin karşılıklı gelmesi ile iki çift domain oluştuğu görülür.  $\alpha_1$  ve  $\alpha_2$  membran distalinde,  $\alpha_3$  ve  $\beta_2m$  de membran proksimalinde karşılıklı yer alır. Karşılıklı yerleşen  $\alpha_1$  ve  $\alpha_2$  zincirlerine ait 8-10 aminoasit büyüklüğünde peptitlerin yerleşebileceği kovuğa benzer bir yapı oluştururlar. Beta 2

mikroglobulin, molekülün üç boyutlu yapısının korunmasında rol almaktadır<sup>20,21,24,25,26</sup>.



**Şekil 3:** Class I ve Class II MHC moleküllerinin yapısı.

β<sub>2</sub> mikroglobulin ve α<sub>3</sub> bölgesi, katlanma paterni bakımından klasik immunglobulin (Ig) domainine benzemektedir. Bununla beraber membrana daha distal pozisyonda bulunan α<sub>1</sub> ve α<sub>2</sub> domainleri, beta-katlantılı tabakalarla bir arada tutulan ilmekler tarafından oluşturulan zemin üzerinde 2 adet uzatılmış alfa-helikal yapı oluştururlar ve bunların tümü mükemmel bir oyuk oluşturur.

Sınıf I molekül genleri, kodlama yapan 8 exon ve kodlama yapmayan 7 introndan oluşur. Polimorfik bir yapı gösteren α<sub>1</sub> ve α<sub>2</sub> bölgeleri, ekson 2-3 tarafından kodlanır. Altıncı kromozom üzerinde Sınıf I molekülleri kodlayan genlerden önce Sınıf I genleri düzenleyen genlerin kodlandığı bir bölge yer almaktadır. Bu kontrol bölgesi, farklı sınıf I genleri, hatta farklı alleller için bile farklı olabilir<sup>20</sup>. MHC class I antijenlerinin çekirdekli hücrelerin çoğunda bulunduğu gösterilmiştir.



## **Class II MHC Molekülleri**

Class II MHC molekülleri; alfa ve beta polipeptit zincirlerinden oluşan ve sırasıyla 34kDa ve 29kDa ağırlığında olan transmembran glikoproteinlerdir. Class I ile büyük ölçüde sekans homolojisine sahiplerdir. Yapısal çalışmalar, hücre membranına daha yakın olan alfa-2 ve beta-2 domainlerinin karakteristik Ig katlanmasına benzer bir yapı gösterdiklerini, bununla birlikte alfa-1 ve beta-1 domainlerinin, class I alfa-1 ve alfa-2'yi taklit ederek zemindeki beta-katlantılı tabaka tarafından oluşturulan zemin üzerindeki 2 alfa-heliks tarafından oluşturulan oyuğun bir benzerini oluşturduğunu saptamıştır<sup>20.21.22</sup>.

Alfa zinciri A, beta zinciri ise B genleri tarafından kodlanır. Bu nedenle sınıf II bölgesinde yer alan DR, DQ ve DP bölgeleri sırasıyla DRA ve DRB, DQA ve DQB, DPA ve DPB olarak ikiye ayrılırlar. DR bölgesinde alfa zinciri kodlayan tek gen varken, beta zinciri için 9 farklı bölge vardır. Bunların bir kısmı kodlama yapmayan genler olup; sadece DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 kodlayıcı genlerdir ve farklı beta zincirlerini kodlarlar. DRB1, 1-18 arasında değişen büyük HLA DR antijenleri için kodlama yaparken; DRB3, DRB4, DRB5; DRB1 antijenlerine bağlı olarak eksprese edilen sırasıyla DR53, DR54, DR51 antijenleri için kodlama yaparlar. HLA DQ, DP bölgelerinde DR'dekinden daha az sayıda alt bölge bulunur. DR bölgesinden farklı olarak DQ ve DP bölgelerinde alfa genleri de çeşitlilik gösterir<sup>20</sup>.

Class II antijen ve genlerinin hepsinde ortak D harfinin bulunmasının nedeni bu antijenlerin varlığını gösteren, serolojik yöntem dışında farklı bir yöntem olarak, hücre kültürüne dayanan bir çeşit MLC (Mixed Lymphocyte Culture; Miks Lenfosit Kültür) reaksiyonu ile gösterilen HLA-A, B ve C den sonra gösterilen bir antijen, HLA-D olarak adlandırılmasından kaynaklanmaktadır<sup>23</sup>.

Daha ileri tarihlerde alloreaktif antikorların yardımı ile de HLA-DR ve DQ antijenleri tanımlanabilmiştir. HLA-DP için bu yöntem geçerli olamamıştır. HLA-DQ'nun alfa ve beta zincirini sentezleyen genler HLA-DQA1 ve HLA-DQB1 olarak adlandırılır. A1 ve B1 genleri peptid bağlayan bölgeleri kodlarken A2 ve B2 bölgeleri ise Ig benzer yapıda molekülleri kodlar. DRB genlerinin ancak %6 kadarı kodlama yapar ve ekson 1-6 olarak sıralanmışlardır. Ekson 1 sinyal peptidi için kodlama yaparken, ekson 2 polimorfik olan  $\beta$ 1 bölgesi, ekson 3 korunan  $\beta$ 2

bölgesi, ekson 4–6 ise transmembran ve sitoplazmik bölümler için kodlama yaparlar. Moleküler HLA-DRB1 incelemelerinde genellikle ekson 2 incelenir<sup>24</sup>. Terminolojik olarak HLA-DRB1\*0401 gibi bir örnek verildiğinde anlatılmak istenen şudur: Moleküler tiplendirme sonucunda (\* bunu göstermektedir) Class II nin R ailesinde beta1 zincir geninde 0401 allelik varyantı saptanmıştır. Bu allele karşılık gelen bir serolojik antijen HLA-DR 04'tür. Saptanan allelin serolojik karşılığı olan numara ilk iki rakamı oluştururken bunu takip eden 2 basamakta moleküler tiplendirme ile ulaşılan yüksek çözünürlükteki alel tipi verilir. Eğer düşük çözünürlükte bir analiz yapıldı ve 3. ve 4. basamak karşılıkları bilinmiyor ise bilinmiyor anlamına gelecek şekilde "XX" koyulacaktır, Ör: HLADRB1\*04XX<sup>20,23</sup>. MHC class II antijenleri daha sınırlı bir dağılım gösterirler. Bu antijenler dentritik hücreler ve makrofajlar gibi profesyonel antijen sunan hücreler, B lenfositler ve aktive T lenfositlerde bulunurlar.

### **MHC Moleküllerinin Fonksiyonu ve Sentezi**

Sınıf I ve Sınıf II MHC moleküller, peptitler ile dayanıklı kompleksler oluşturarak onların T lenfositler tarafından tanınabilecek şekilde hücre yüzeyinde sergilenmesini sağlarlar<sup>24</sup>. TCR (T hücre reseptörü) ile olan etkileşim hem peptite hem de MHC molekülüne bağlıdır. Bir kural olarak TCR; yalnız bir MHC molekülüne veya ilişkisiz bir peptite kompleks oluşturmuş MHC molekülüne bağlanmaz<sup>22</sup>. Peptit-MHC kompleksi TCR repertuarını da belirler. Timustaki T lenfositlerin pozitif ve negatif seçiminde belirleyici olur. MHC molekülleri, bireyin oluşturacağı immun yanıtı:

- 1) Farklı antijenik peptitlerin sunulmasını sağlayarak,
- 2) T hücrelerindeki antijen tanıma mekanizmalarını etkileyerek kontrol etmektedir.

HLA allellerinin farklılıkları ve T hücrelerinde gerçekleşen yeniden gen düzenlemeleri sayesinde her bireye özgü benzersiz bir immun yanıt oluşmaktadır. Canlı türleri arasında antijen sunma kapasitesi en fazla olanlar, antijen sunan molekülleri en çeşitli olanlardır<sup>22</sup>.

MHC molekülleri hücre yüzey göstergeleri olarak aktivasyon gösterirler ve infekte hücrelerden sitotoksik ve yardımcı T hücrelerine sinyal iletimini sağlarlar. Bu

rolün immun yanıt içindeki büyük önemi tartışmasızdır ve MHC bölgesindeki zengin polimorfizm, türlerin farklı mikroorganizmalara karşı maksimum koruma cevabı oluşturmasını sağlamaktadır. Bu duruma çarpıcı bir örnek olarak malarya verilebilir. Doğu Afrika'daki Plasmodium falciparum türünün oluşturduğu ciddi malaryaya karşı oluşan direnç HLA-DRB1\*0101 ile ilişkili görülürken, parazitin Batı Afrika türüne karşı görülen direnç ise HLA-DRB1\*1302 ile ilişki göstermektedir<sup>21.22</sup>.

### **MHC Moleküllerinin Hastalıklarla Olan İlişkisi**

Bir hastalığa olan yatkınlığın; spesifik bir HLA geninin kalıtımıyla bağlantılı olabileceği ilk olarak 30 yıl önce gösterilmiştir. O günden beri 500'den fazla farklı hastalıkla, HLA ilişkisini gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Hastalıklı bireylerde ve genel populasyonda eksprese edilen HLA allellerinin tiplendirilmesi ile; HLA allelleri ve hastalıklar arasındaki ilişki saptanmaya çalışılmıştır. Bu sayede genlerin hastalıklara nasıl sebep oldukları veya hastalığa olan yatkınlığı nasıl modifiye ettikleri anlaşılmaya çalışılmıştır. Tüm bu çalışmaların en büyük sebeplerinden birisi; hastalık spesifik riskin ve koruyucu göstergelerin tanımlanması ve bunların immunolojik profillemeye, risk değerlendirilmesinde ve teropatik kararın verilmesinde kullanılmasıdır<sup>25</sup>.

Bazı hastalıkların belirli HLA tipleriyle yüksek derecede birliktelik göstermesi tanıda yardımcı olabilir. Örneğin; Narkolepsi hastalarının tümü HLA-DR2 [HLA-DQB1\*0602] ye sahip olduğu için bu hastalıktan şüphelenildiğinde tanı HLA tiplendirilmesiyle doğrulanabilmektedir<sup>22</sup>.

Ancak; risk allellerine sahip bireylerin hepsi hastalığı oluşturmazken; tüm hasta bireyler de risk allellerine sahip olmayabilirler. Pek çok vakada HLA bağlantılı hastalıkların açık bir immun patoloji gösterdiği saptanmıştır. HLA ilişkili hastalıklar tüm majör organ sistemlerinde gözlenebilir ve büyük bir çoğunluğu otoimmün hastalıklar olarak sınıflandırılır. Belirli spesifik class I veya class II HLA genleri ile güçlü ilişki gösteren hastalıklara örnek olarak, Tip 1 diyabetes mellitus, romatoid artrit, ankilozan spondilit, çölyak hastalığı gibi hastalıklar verilebilir. Tüberküloz, lepra ve AIDS gibi enfeksiyonlara olan artmış veya azalmış yatkınlık da HLA'nın rolü vardır<sup>25</sup>.

Viral hepatit B enfeksiyonunda ise HLA polimorfizmleri immun cevabı önemli ölçüde etkiler. Çünkü bilindiği gibi viral hepatit B patolojisinde özellikle T lenfositler olmak üzere konağın immun cevabı oldukça önemlidir. İmmun cevaptaki değişkenlik sıklıkla HLA polimorfizmi ile ilişkilendirilmiştir. Bir bireyin HLA genotipi, HBV enfeksiyonunun progresyonunu etkileyebilir<sup>26</sup>. Akut hepatit B'den iyileşen hastalar HLA I ve II ilişkili T hücre cevabını yüksek oranda geliştirirler. Oysa kronik hepatitli olgularda bu cevapların genellikle zayıf olduğu veya gözlenmediği bildirilmektedir.

MHC class I ve II molekülleri T lenfositlerin antijen tanınması için gerekli moleküllerdir. T lenfositlerden MHC glikopeptid molekülüne karşı algaçlar vardır. Bir kısım lenfositlerde MHC class I moleküllerine karşı CD8, diğer bir kısım T lenfositlerde de MHC class II molekülüne karşı CD4 algaçlar bulunur. Th lenfositlerde bu algaçlardan sadece CD4 vardır.

Th lenfosit aktivasyonu; bağışık yanıt mekanizmasının ilk basamağını oluşturur. Aktive olmuş Th lenfositler bağışık yanıt yolundaki diğer basamakların anahtarı niteliğindedir. Bu hücrelerin uyarılması için en az 2 sinyal gerekir. Bunlardan biri sunucu hücrelerin sunduğu antijen epitopu MHC II kompleksinin Th lenfositlerdeki TCR/CD3 birleşik reseptörü ile bağlantısından kaynaklanır. İkinci sinyal bu bağlanma sonrası, sunucu hücrelerin saldıkları IL-1 tarafından verilir. Bunun sonucunda Th lenfositlerden diğer bir lenfokin olan IL-2 salınır. IL-2 belirli hücrelerden kendisine karşı bolca reseptör oluşmasına ve bu hücrelerin çoğalıp gelişmesine neden olur. Bu hücreler yeni Th lenfositler ve Tc lenfositlerdir. Diğer yandan uyarılmış Th lenfositlerin salgıladıkları diğer lenfokinler (IL-4, IL-5, IL-6 gibi) B lenfositleri de uyarır.

Tc lenfosit aktivasyonu; Tc hücreleri genel olarak viruslarla infekte hücreleri ve tümör hücreleri gibi yabancı hücreleri hedef alır ve onları ortadan kaldırırlar. Bunlarda MHC sınıf I moleküllerine karşı CD8 reseptörleri bulunur. Aktif hale geçmesi için 2 sinyal gereklidir. Birinci sinyal hedef hücresindeki epitop ile MHC sınıf I molekülüne bileşiğinin Tc hücresindeki TCR/C3 ile olan ilişkisinden kaynaklanır. İkinci sinyal ise aktive olmuş Th tarafından oluşturulan IL-2'nin verdiği sinyaldir. Bu

şekilde uyarılan Tc lenfositleride salgıladıkları sitokinler ile hedef hücrelerini ( virüs yüklü hücreler veya tümör hücreleri gibi) yok ederler.

Th ve Tc aktivasyonu bir yandan aktif hücreler oluştururken diğer yandan uzun ömürlü bellekli Th ve bellekli Tc hücrelerinin oluşmasına neden olur. Ayrıca B lenfosit aktivasyonu için de Th tarafından salınan IL-4 ve IL-6 gereklidir. Bu çalışmada MHC sınıf II genetik yapısının ele alınmasının başlıca nedeni, bu gen moleküllerinin gerek Th hücrelerin gerekse Tc hücrelerin antijen tanımaları ve aktivasyonlarında rol oynayan temel moleküller oldukları düşünüldüğü içindir<sup>27.28</sup>.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu araştırmada, Mersin Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları AD tarafından takip edilen, 48 kronik hepatit B enfeksiyonlu ve 46 asemptomatik hepatit B taşıyıcısı hasta çalışmaya alındı.

6 ayın üzerinde HBsAg (+)'liği olan, HBV DNA düzeyi  $10^5$  kopya/ml altında olan, transaminaz seviyeleri sürekli normal seyreden, HbeAg negatif, anti HBe pozitif ve karaciğer biyopsisinde nekroinflammatuvar skoru 4'ün altında olan hastalar asemptomatik hepatit B taşıyıcısı olarak tanımlanırken, 6 ayın üzerinde HBsAg (+)'liği olan, HBV DNA düzeyi  $10^5$  kopya/ml üzerinde olan, transaminaz seviyeleri yüksek seyreden, karaciğer biyopsisinde kronik hepatit bulguları olan (nekroinflammatuvar skor > 4) hastalar kronik hepatit B enfeksiyonu olarak tanımlandı.

Bu 2 hasta grubundaki bireyler çalışmaya davet edilip, moleküler inceleme için kan örnekleri alındı. Araştırmaya alınan bütün hastalar araştırma hakkında bilgilendirildi, bu amaçla hazırlanan aydınlatılmış onam formu okutularak, onayları alındı.

Her iki hasta grubundan çalışma için etilendiaminotetraenoik asit'li (EDTA) tüpe alınan kan örnekleri 2-8°C'de çalışma gününe kadar saklandı.

Kronik hepatit B ve asemptomatik hepatit B taşıyıcısı gruplarında çalışılan parametreler aşağıda belirtilmiştir.

- HLA-DRB1 tiplendirilmesi
- HLA-DQA1 tiplendirilmesi
- HLA-DQB1 tiplendirilmesi

### Araç ve Gereç

Çalışmada kullanılan cihazlar:

- Luminex<sup>100</sup> cihazı ve XY Platform
- Thermal cyclers (Corbett Research)
- Isıtıcı blok (Wealtec HB-1)

- Sonikatör (Branson 200 Ultrasonic Cleaner)
- Mikrosantrifüj (Sigma Sartorius 1-15)
- Vorteks (Velp Scientifica)
- Dell Optiplex PC
- Lexmark Yazıcı
- Soğutucu (Bosch)

Çalışmada kullanılan diğer malzemeler:

- Eppendorf tüpü (Isolab 1.5 ml'lik)
- 0.04 ml %7.5'lük EDTA-K<sub>3</sub> içeren 5 ml'lik cam tüp
- Otomatik pipet (Labmate)
- PCR tüpleri ve kapakları (AB Gene. 2ml Thermo Strip, No.AB0451/G)
- 96 kuyucuklu Thermal cyclers (PCR) plate'i (Costar No6509)
- Microseal Film (MJ Research, Inc. No.MSA-5001)

Çalışmada kullanılan kitler:

- Lifecodes HLA-DRB Tiplendirme Kiti
- Lifecodes HLA-DQA Tiplendirme Kiti
- Lifecodes HLA-DQB Tiplendirme Kiti

Çalışmada kullanılan kimyasallar:

- İzopropanol (Merck)
- Mutlak etil alkol (Reidel-Haen)
- R-Pycoerythrin Conjugated Streptavidin (SA-PE), 1mg/ml (Tepnel Lifecodes Cat No.628511)
- Luminex Sheath Fluid (Tepnel Lifecodes Cat.No.628005)
- Recombinant Taq Polymerase
- Distile su

## Yöntemler

### Class II HLA Moleküllerinin (HLA-DRB1, HLA-DQA1 ve HLA DQB1) Tiplendirilmesi

#### Tam Kandan Deoksiribonükleik Asit (DNA) Eldesi

Prensip: Hücreler proteinaz K ile kısa bir inkübasyon ile parçalandı. Bu sırada açığa çıkan nükleik asitlerin, nükleazlar tarafından parçalanmaması için, ortama tüm nükleazları inhibe eden guanidin-hidroklorik asit eklendi. Nükleik asitler, filtre tüplerinde bulunan ve nükleik asitlere seçici olan cam fiberlere bağlandı. Diğer hücresel elemanlar, özel bir inhibitör uzaklaştırıcı tampon kullanılarak, tekrarlayan yıkama ve santrifüj basamaklarıyla ortamdan uzaklaştırıldı. Son aşamada düşük yoğunluklu tuz çözeltisi ile nükleik asitlerin cam fiberden ayrılması sağlandı.

Ayırıcılar: DNA elde edilmesi sırasında High Pure PCR Template kiti kullanıldı. Kit içeriği ve hazırlanması Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1:** High pure PCR template kit içeriği.

Kimyasal	Miktarı	İçeriği
Bağlayıcı tampon	20 ml	6 M guanidin-HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (v/v), pH: 4.4
Proteinaz K	90 mg	Liyofilize proteinaz K
İnhibitör uzaklaştırıcı tampon	33 ml	5 M guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH: 6.6
Yıkama tamponu	20 ml	20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH: 7.5
Elüsyon tamponu	40 ml	10 mM Tris, pH: 8.5

Proteinaz K: Liyofilize haldeki reaktife, 4.5 ml steril distile su eklenerek kullanıma hazır hale getirildi. Tamamı kullanılmayacaksa porsiyonlanarak, -20<sup>0</sup>C’de saklandı.

İnhibitör uzaklaştırıcı tampon: 33 ml reaktife 20 ml mutlak etil alkol eklenerek hazırlandı.



Yıkama tamponu: 20 ml reaktifte 80 ml mutlak etil alkol eklenerek hazırlandı. Bağlayıcı ve elüsyon tamponları kullanıma hazırıldı.

Yöntem:

- Ependorf tüpüne, 200 µl EDTA'lı tam kan kondu ve üzerine sırasıyla 200 µl bağlayıcı tampon, 40 µl proteinaz K eklendi ve vortextlendi.
- 10 dakika 72 °C'de inkübe edildi.
- Tüpe 100 µl izopropanol eklendi, vortextlendi ve karışım özel filtre tüplerine aktarıldı.
- 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi ve filtreden geçen karışım atıldı.
- Filtre tüpün içine 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon eklendi.
- 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi ve filtreden geçen karışım atıldı.
- Filtre tüpün içine 500 µl yıkama tamponu eklendi.
- 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi ve filtreden geçen karışım atıldı.
- İkinci kez filtre tüpün içine 500 µl yıkama tamponu eklendi.
- 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi ve filtreden geçen karışım atıldı.
- Filtre tüp boşaltıldı ve 10 saniye 8000 rpm'de santrifüj edildi.
- Filtre tüpü, yeni bir ependorf tüpü içine yerleştirildi, 72°C'de bekletilmiş olan elüsyon tampondan 200 µl filtre tüpe pipetlendi.
- 1 dakikalık 8000 rpm'de santrifüj sonunda, filtre tüpten ayrılan, saf DNA elde edildi.

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Lökositlerden elde edilen DNA'nın, analiz yapılacak bölgesinin, belli miktarda çoğaltılması gerekir. PCR, DNA'nın bu bölgesinin iki ucuna özgü, sentetik primer (öncül)'ler, Taq polimeraz ve deoksi nükleotit trifosfatlar (dNTP) kullanılarak çoğaltılması esasına dayanır. Primerler öncü DNA görevi görürken, Taq polimeraz ise DNA polimeraz görevi görmektedir. PCR, denatürasyon, yapışma (annealing) ve zincir uzaması (extension) olmak üzere üç aşamadan oluşur. İlk aşama olan denatürasyonda, yüksek ısı etkisiyle çift sarmal DNA'nın ayrılması sağlanır. İkinci aşama olan yapışmada, sıcaklık düşürülerek, primerlerin kendilerini tamamlayıcı DNA dizilerine bağlanmaları sağlanır. Son aşama olan uzamada ise, Taq

polimeraz etkisiyle, ortamda bulunan dNTP'ler primerlere eklenerek DNA zincirleri sentezlenmiş olur. Bu döngünün tekrarlanması ile istenen DNA bölgesi çoğaltılmış olur.

### **Lifecodes HLA-SSO Tiplendirme Kitleri İle Luminex<sup>100</sup> Cihazında HLA-DRB1, HLADQA1 ve HLA DQB1 Allel Tiplendirilmesi**

Lifecodes HLA-SSO Tiplendirme kitleri; PCR ile amplifiye edilmiş örnekteki HLA allellerini saptamak için sekans-spesifik oligonükleotitleri (SSOs) kullanır.

HLA-SSO tiplendirme prosedürü; işaretli tek sarmallı PCR ürünlerinin SSO problemlerine hibridizasyonuna dayanmaktadır. DNA'nın PCR ile amplifikasyonunda genellikle eşit miktarda forward ve reverse primerler kullanılarak çift-sarmallı DNA ürünleri elde edilir. Ancak eğer primerlerden biri diğerine göre daha fazla miktarda bulunursa, reaksiyonda çift sarmallı DNA'ya ek olarak tek sarmallı DNA üretimi de gerçekleşir. Lifecodes amplifikasyon basamağının ilk siklüslerinde çift-sarmallı DNA üretilir. İlerleyen siklüslerde az miktarda bulunan limitli primer tüketildiğinde, kalan primer çift sarmallı ürünü bir şablon gibi kullanarak tek sarmallı DNA üretimini gerçekleştirir. Bu metot ile hibridizasyon reaksiyonuna katılabilecek hem çift sarmallı hem de tek sarmallı ürünler meydana getirilir.

SSO tiplendirme metodunda kullanılan farklı problemlerin her biri amplifiye DNA'ların içindeki allel veya allel gruplarına spesifik olan sekanslara karşı homologturlar. Başka bir ifadeyle bu problemlerin her biri amplifiye DNA'da bulunan veya bulunmayan komplementer bölgelerle hibridize olmaları için tasarlanmışlardır. SSO tiplendirilmesinden elde edilen sonuçların analizi ile amplifiye DNA'daki özel DNA sekanslarının varlığı veya yokluğu saptanabilir ve örnekteki muhtemel alleller tanımlanabilir.

Lifecodes HLA-SSO tiplendirme prosedüründe; problemler, Luminex<sup>100</sup> cihazında kullanılmak için Luminex<sup>100</sup> mikroküreciklerine bağlanmışlardır. Yaklaşık 100 farklı Luminex<sup>100</sup> mikrokürecik popülasyonu bir arada karıştırılarak Luminex<sup>100</sup> cihazıyla analiz edilebilir. Çünkü her bir mikrokürecik popülasyonu kendine has floresans veya rengiyle ayırt edilebilir. Böylece problemler de birbirlerinden kolayca ayırt edilebilirler. Luminex<sup>100</sup> cihazı; her bir Luminex<sup>100</sup> mikroküreciğine hibridize olan işaretli PCR ürünlerinin miktarını saptayabilir. SSO problemlerinden elde edilen

bu sinyaller kullanılarak amplifiye DNA örneği ile pozitif veya negatif reaksiyon gösteren problemler belirlenebilir. Böylece örnekteki HLA fenotipinin belirlenmesi için gerekli bilgi elde edilir.

### **DNA Amplifikasyon (PCR) ve Hibridizasyon Prosedürleri**

Polimeraz zincir reaksiyonu ve hibridizasyon prosedürü için, Lifecodes HLA-DRB, HLA-DQA ve HLA DQB tiplendirme kiti kullanılmıştır. Kit içeriği aşağıda belirtilmiştir.

Lifecodes HLA DRB Tiplendirme Kiti İçeriği:

Lifecodes HLA DRB Generic Master Mix: 870 mikrolitre (50 örnek için)

Lifecodes HLA DRB DR52 Master Mix: 870 mikrolitre (50 örnek için)

Lifecodes HLA DRB Probe Mix: 2x810 mikrolitre (50 örnek için)

Dilution Solution: 19,7 ml (50 örnek için)

Lifecodes HLA DQA Tiplendirme Kiti İçeriği:

Lifecodes HLA DQA Master Mix : 420 mikrolitre (20 örnek için)

Lifecodes HLA DQA Probe Mix: 360 mikrolitre (20 örnek için)

Dilution Solution: 9.9 mL (20 örnek için)

Lifecodes HLA DQB Tiplendirme Kiti İçeriği:

Lifecodes HLA DQB Master Mix: 420 mikrolitre (20 örnek için)

Lifecodes HLA DQB Probe Mix: 360 mikrolitre (20 örnek için)

Dilution Solution: 9,9 ml (20 örnek için)

### **DNA Amplifikasyon (PCR) Prosedürü**

- Master Mix'in oda ısısına gelmesi beklendi.
- Master Mix 10 saniye vortexlendi.
- Her bir hasta için 15 mikrolitre Master Mix, 0,5 mikrolitre Taq polimeraz ve 24.5 mikrolitre steril distile su bir ependorfta karıştırıldı, vortexlendi ve bir amplifikasyon karışımı hazırlandı.
- Her bir hasta için PCR tüpüne 10 mikrolitre DNA ve üzerine 40 mikrolitre amplifikasyon karışımından eklendi (tablo 2).

**Tablo 2:** Amplifikasyon için gerekli reaksiyon içerikleri.

<b>İçerik</b>	<b>Her örnek için gereken miktar</b>
Lifecodes Master Mix	15 µL
DNA	10 µL
Taq Polimeraz	0,5 µL
Steril distile su	24,5 µL

- Tüplerin ağzı PCR sırasında olabilecek buharlaşmayı önlemek için kapatılır.
- Örnekler thermal cyclere yerleştirildi ve tablo 3'deki program çalıştırıldı.

**Tablo 3:** Amplifikasyonda kullanılan thermal cycler programı.

95C <sup>0</sup> de 5dk. Siklüs sayısı:1
95C <sup>0</sup> de 30 sn 60C <sup>0</sup> de 45 sn 72C <sup>0</sup> de 45 sn Siklüs sayısı:8
95C <sup>0</sup> de 30 sn 63C <sup>0</sup> de 45 sn 72C <sup>0</sup> de 45 sn Siklüs sayısı: 32
72C <sup>0</sup> de 15 dk

### **Hibridizasyon Prosedürü**

- Hibridizasyon işlemine başlamadan önce Luminex<sup>100</sup> cihazı açılarak ısınması sağlandı.
- Probe Mix'leri ısıtıcı blokta 55-60<sup>0</sup>C'de 7 dk ısıtıldı.
- Daha sonra Probe Mixler 15 saniye sonikatöre kondu ve ardından 15 saniye vortextlenerek süspansiyon haline gelmeleri sağlandı.
- PCR ürünleri Costar plate'in kuyucukları içine 5 mikrolitre pipetlendi.
- Her bir kuyucuğa 15 mikrolitre Probe Mix eklendi ve kuyucukların üzeri Mikrosealed film ile kaplandı.
- Örnekler termal cyclere yerleştirildi ve program çalıştırıldı.

Programa göre 97 C<sup>0</sup> de 5 dk, 47C<sup>0</sup> de 30 dk, 56C<sup>0</sup> de 10 dk bekletildi.

- Örneklerin hibridizasyonu sırasında 1:200 dilusyon solusyonu/SA-PE karışımı hazırlandı. Her örnek için 170 mikrolitre dilüsyon solüsyonu ile 0,85 mikrolitre SA-PE karıştırıldı.
- Dilusyon solusyonu/SA-PE karışımı oda sıcaklığında karanlıkta tutuldu.
- Hibridizasyon basamağı ikinci 56C<sup>0</sup> basamağına geçtiği anda örnekler termal cycler üzerinde iken, her bir örnek 170 mikrolitre dilusyon solüsyonu/SA-PE ile dilüe edildi.
- Dilüsyon işleminden sonra örnekler değerlendirilmek üzere Luminex<sup>100</sup> cihazına yerleştirildi.

### **İstatistiksel Yöntemler**

İki kategorik değişkenin düzeyleri arasındaki ilişkinin test edilmesinde ki-kare analizi ayrıca iki bağımsız oranın karşılaştırılmasında oranlara ait Z testi kullanılmıştır. Analizlerde SPSS 11.5 for Windows ve Minitab 13 paket programlarından yararlanılmıştır.

## BULGULAR

### Olguların Genel Özellikleri

Çalışmamızda Lifecodes HLA-SSO tiplendirme prosedürü kullanılarak kronik hepatit B grubundaki 27'si erkek, 21'i kadın toplam 48 bireyin ve asemptomatik hepatit B taşıyıcı grubundaki 31'i erkek, 15'i kadın toplam 46 bireyin HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 tiplendirilmesi gerçekleştirildi.

Kronik hepatit B grubunda yaş ortalaması  $37,9 \pm 12,2$  iken asemptomatik hepatit B taşıyıcılarında  $43,1 \pm 11,2$  idi.

### Her İki Hasta Grubunun Allel Bazında Yapılan HLA-DRB1 Analiz Sonuçları

Çalışmamızda Lifecodes HLA-SSO tiplendirme prosedürü kullanılarak kronik hepatit B grubundaki 48 bireyin ve asemptomatik hepatit B grubundaki 46 bireyin HLA-DRB1 tiplendirmesi yapıldı. Kronik hepatit B grubunda 13 çeşit allel saptanırken, asemptomatik hepatit B grubunda 12 çeşit allel saptandı. Her iki grupta tam tiplendirme yapıldı. Kronik hepatit B grubunda toplam allel sayısı 96, asemptomatik hepatit B grubundaki toplam allel sayısı 92 olarak tespit edildi. İstatistiksel değerlendirme birey sayısına göre değil, toplam allel sayısına göre yapıldı ve her bir allel tek başına değerlendirildi.

Değerlendirme sonucunda HLA-DRB1\*11 allelinin kronik hepatit B grubunda görülme sıklığının %10.41 (10/96) olduğu; buna karşılık asemptomatik hepatit B grubunda görülme sıklığının ise %22.82 (21/92) olduğu belirlendi (tablo 4). Bu sonuca göre HLA-DRB1\*11 alleli ile kronik hepatit B oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptandı ( $p=0,030$ ).

**Tablo 4** : Kronik hepatit B ve asemptomatik hepatit B'li hastalarda HLA-DRB1 analiz sonuçları.

	Kr Hepatit B grubu allel sayısı (n=96)	Asemp.Hep.B grubu allel sayısı (n=92)	P
DRB1*01	8 (%8.33)	9 (%9.78)	0.729
DRB1*03	8 (%8.33)	12 (%13.04)	0.295
DRB1*04	5 (%5.20)	12 (%13.04)	0.061
DRB1*07	5 (%5.20)	2 (%2.17)	0.445
DRB1*08	2 (%2.08)	4 (%4.34)	0.437
DRB1*09	0	1 (%1.08)	0.489
DRB1*10	8 (%8.33)	5 (%5.43)	0.568
DRB1*11	10(%10.41)	21 (%22.82)	0.030*
DRB1*12	1 (%1.04)	2 (%2.17)	0.615
DRB1*13	5 (%5.20)	1 (%1.08)	0.212
DRB1*14	18 (%18.75)	10 (%10.86)	0.129
DRB1*15	13 (%13.54)	9 (%9.78)	0.449
DRB1*16	4 (%4.16)	4 (%4.34)	1.000

#### **Her İki Hasta Grubunun Allel Bazında Yapılan HLA-DQA1 Analiz Sonuçları**

Her iki grupta aynı yöntemle yapılan HLA-DQA1 tiplendirilmesinde, 6 çeşit allel saptandı. Kronik hepatit B grubunda 48 hastanın 44'ünde tam tiplendirme yapılabilirken; 4 hastada sadece tek bir allel tiplendirilebildi. Asemptomatik hepatit B grubunda ise 46 hastanın 43'ünde tam tiplendirilme yapılabilirken 2 hastada tiplendirme yapılamadı. Bir hastada tek bir alel tiplendirilebildi. Bu yüzden kronik hepatit B grubundaki toplam allel sayısı 92 iken, asemptomatik hepatit B grubunda toplam allel sayısı 87 olarak saptandı.

Değerlendirme sonucunda HLA-DQA1\*03 allelinin kronik hepatit B grubunda görülme sıklığının %8.69 (8/92) olduğu; buna karşılık asemptomatik hepatit B taşıyıcılarında görülme sıklığının %20.68 (18/87) olduğu belirlendi (tablo 5 ). Bu sonuca göre HLA-DQA1\*03 alleli ile kronik hepatit B oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif ilişki saptandı (p=0,023).

**Tablo 5 :** Kronik hepatit B ve asemptomatik hepatit B'li hastalarda HLA-DQA1 analiz sonuçları.

	Kr Hepatit B (n=92)	Asemp.Hep.B (n=87)	P
DQA1*01	42 (%45.65)	32 (%36.78)	0.228
DQA1*02	3 (%3.26)	2 (%2.29)	1.000
DQA1*03	8 (%8.69)	18 (%20.68)	0.023*
DQA1*04	1 (%1.08)	3 (%3.44)	0.357
DQA1*05	33 (%35.86)	30 (%34.48)	0.846
DQA1*06	3 (%3.26)	2 (%2.29)	0.696

### **Her İki Hasta Grubunun Allel Bazında Yapılan HLA-DQB1 Analiz Sonuçları**

Her iki grupta aynı yöntemle yapılan HLA-DQB1 tiplendirilmesinde, 6 çeşit allel saptandı. Kronik hepatit B grubunda tam tiplendirilme yapılabilirken, asemptomatik hepatit B grubunda 1 hasta tiplendirilemedi. Bu nedenle kronik hepatit B grubundaki toplam allel sayısı 96 iken, asemptomatik hepatit B grubundaki allel sayısı 90'dır.

Değerlendirme sonucunda HLA-DQB1\*01 allelinin kronik hepatit B grubunda görülme sıklığının %14.58 (14/96) olduğu; buna karşılık asemptomatik hepatit B taşıyıcılarında %5.55 (5/90) olduğu belirlendi (tablo 6). Bu sonuca göre HLA-DQB1\*01 alleli ile kronik hepatit B oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif ilişki saptandı (p=0,042).

**Tablo 6 :** Kronik hepatit B ve asemptomatik hepatit B'li hastalarda HLA-DQB1 analiz sonuçları.

	Kr Hepatit B (n=96)	Asemp.Hep.B (n=90)	P
DQB1*01	14 (%14.58)	5 (%5.55)	0.042*
DQB1*02	12 (%12.5)	13 (%14.44)	0.698
DQB1*03	29 (%30.20)	28 (%31.11)	0.894
DQB1*04	2 (%2.08)	6 (%6.66)	0.159
DQB1*05	31 (%32.29)	33 (%36.66)	0.530
DQB1*06	8 (%8.33)	5 (%5.55)	0.570



## **Her İki Hasta Grubunun Genotip Bazında Yapılan HLA-DRB1 Analiz Sonuçları**

Lifecodes HLA-SSO tiplendirme prosedürü kullanılarak yapılan HLA-DRB1 genotip tiplendirilmesinde, kronik hepatit B grubunda 13 çeşit allel saptanırken, asemptomatik hepatit B taşıyıcılarında 12 çeşit allel saptandı. Her iki grupta tüm kombinasyonlar değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirme birey sayısına göre yapıldı.

Değerlendirme sonucunda HLA-DRB1\*1415 allelinin kronik hepatit B grubunda görülme sıklığı %10.41 (5/48) saptanırken, asemptomatik hepatit B taşıyıcılarında 0 (0/46) olduğu bulundu. (tablo 7). Bu sonuca göre HLA-DRB1\*1415 alleli ile kronik hepatit B oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif ilişki saptandı ( $p=0,024$ ).

**Tablo 7 :** Kronik hepatit B ve asemptomatik hepatit B'li hastalarda HLA-DRB1 genotip analiz Sonuçları.

Genotip	Kr. Hepatit B n: 48	Asemp.Hepatit B n: 46	P
DRB1*0101	1/48 (%2.08)	0/46 (%0)	0,325
DRB1*0104	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,304
DRB1*0108	0/48 (%0)	2/46 (%4.34)	0,144
DRB1*0110	1/48 (%2.08)	1/46 (%2.17)	0,976
DRB1*0111	1/48 (%2.08)	1/46 (%2.17)	0,976
DRB1*0112	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,304
DRB1*0114	2/48 (%4.16)	3/46 (%6.52)	0,611
DRB1*0115	1/48 (%2.08)	1/46 (%2.17)	0,976
DRB1*0116	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,304
DRB1*0303	1/48 (%2.08)	2/46 (%4.34)	0,532
DRB1*0304	0/48 (%0)	2/46 (%4.34)	0,144
DRB1*0307	1/48 (%2.08)	1/46 (%2.17)	0,976
DRB1*0310	1/48 (%2.08)	0/46 (%0)	0,325
DRB1*0311	1/48 (%2.08)	2/46 (%4.34)	0,532
DRB1*0313	1/48 (%2.08)	0/46 (%0)	0,325
DRB1*0314	1/48 (%2.08)	1/46 (%2.17)	0,976
DRB1*0315	1/48 (%2.08)	2/46 (%4.34)	0,532
DRB1*0316	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,304
DRB1*0404	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,304
DRB1*0408	0/48 (%0)	2/46 (%4.34)	0,144
DRB1*0410	1/48 (%2.08)	0/46 (%0)	0,325
DRB1*0411	2/48 (%4.16)	1/46 (%2.17)	0,583
DRB1*0414	1/48 (%2.08)	1/46 (%2.17)	0,976
DRB1*0415	1/48 (%2.08)	2/46 (%4.34)	0,532
DRB1*0416	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,304
DRB1*0711	3/48 (%6.25)	0/46 (%0)	0,085
DRB1*0714	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,304
DRB1*0715	1/48 (%2.08)	0/46 (%0)	0,325
DRB1*0810	1/48 (%2.08)	0/46 (%0)	0,325
DRB1*0811	1/48 (%2.08)	0/46 (%0)	0,325
DRB1*0910	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,304
DRB1*1010	1/48 (%2.08)	0/46 (%0)	0,325
DRB1*1011	2/48 (%4.16)	1/46 (%2.17)	0,583
DRB1*1014	0/48 (%0)	2/46 (%4.34)	0,144
DRB1*1111	3/48 (%6.25)	4/46 (%8.69)	0,652
DRB1*1112	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,304
DRB1*1113	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,304
DRB1*1114	0/48 (%0)	2/46 (%4.34)	0,144
DRB1*1115	1/48 (%2.08)	3/46 (%6.52)	0,287
DRB1*1116	3/48 (%6.25)	1/46 (%2.17)	0,328
DRB1*1214	1/48 (%2.08)	0/46 (%0)	0,325
DRB1*1313	1/48 (%2.08)	0/46 (%0)	0,325
DRB1*1314	1/48 (%2.08)	0/46 (%0)	0,325
DRB1*1315	1/48 (%2.08)	0/46 (%0)	0,325
DRB1*1414	3/48 (%6.25)	0/46 (%0)	0,085
DRB1*1415	5/48 (%10.41)	0/46 (%0)	0,024*
DRB1*1416	1/48 (%2.08)	0/46 (%0)	0,325
DRB1*1515	1/48 (%2.08)	1/46 (%2.17)	0,976
DRB1*1516	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,304

## Her İki Hasta Grubunun Genotip Bazında Yapılan HLA-DQA1 Analiz Sonuçları

Her iki grupta aynı yöntemle yapılan HLA-DQA1 tiplendirilmesinde toplam 6 çeşit allel saptandı. Her iki grupta tüm kombinasyonlar değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirme birey sayısına göre yapıldı.

Değerlendirme sonucunda, kronik hepatit B ve asemptomatik hepatit B taşıyıcıları ile HLA-DQA1 genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamadı (tablo 8 ).

**Tablo 8** :Kronik hepatit B ve asemptomatik hepatit B'li hastalarda HLA-DQA1 genotip analiz sonuçları.

Genotip	Kr. Hepatit B n=48	Asemp.Hepatit B n=46	P
DQA1*0101	13/48 (%27.08)	8/46 (%17.39)	0,259
DQA1*0102	1/48 (%2.08)	1/46 (%2.17)	0,976
DQA1*0103	3/48 (%6.25)	5/46 (%10.86)	0,422
DQA1*0104	1/48 (%2.08)	1/46 (%2.17)	0,976
DQA1*0105	11/48 (%22.91)	8/46 (%17.39)	0,505
DQA1*0205	2/48 (%4.16)	1/46 (%2.17)	0,583
DQA1*0303	1/48 (%2.08)	3/46 (%6.52)	0,287
DQA1*0304	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,325
DQA1*0305	1/48 (%2.08)	4/46 (%8.69)	0,153
DQA1*0306	0/48 (%0)	2/46 (%4.34)	0,144
DQA1*0405	1/48 (%2.08)	0/46 (%0)	0,325
DQA1*0505	8/48 (%16.66)	8/46 (%17.39)	0,926
DQA1*0506	3/48 (%6.25)	0/46 (%0)	0,085

## Her İki Hasta Grubunun Genotip Bazında Yapılan HLA-DQB1 Analiz Sonuçları

Her iki grupta aynı yöntemle yapılan HLA-DQB1 tiplendirilmesinde toplam 6 çeşit allel saptandı. Her iki grupta tüm kombinasyonlar değerlendirildi.

Değerlendirme sonucunda HLA-DQB1\*0101 genotipinin kronik hepatit B grubunda görülme sıklığı %14.58 (7/48) bulunurken, asemptomatik hepatit B grubunda taşıyıcılarında %0 (0/46) belirlendi (tablo 9). Bu sonuca göre HLA-DQB1\*0101 alleli ile kronik hepatit B oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif ilişki saptandı (p=0,007).

**Tablo 9** :Kronik hepatit B ve asemptomatik hepatit B'li hastalarda HLA-DQB1 genotip analiz sonuçları.

Genotip	Kr. Hepatit B n= 48	Asemp.Hepatit B n=46	P
DQB1*0101	7/48 (%14.58)	0/46 (%0)	0,007*
DQB1*0103	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,304
DQB1*0104	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,304
DQB1*0105	0/48 (%0)	3/46 (%6.52)	0,072
DQB1*0202	1/48 (%2.08)	2/46 (%4.34)	0,532
DQB1*0203	5/48 (%10.41)	5/46 (%10.86)	0,943
DQB1*0205	3/48 (%6.25)	3/46 (%6.52)	0,957
DQB1*0206	2/48 (%4.16)	1/46 (%2.17)	0,583
DQB1*0303	6/48 (%12.5)	5/46 (%10.86)	0,806
DQB1*0304	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,340
DQB1*0305	9/48 (%18.75)	9/46 (%19.56)	0,920
DQB1*0306	3/48 (%6.25)	2/46 (%4.34)	0,681
DQB1*0404	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,304
DQB1*0405	2/48 (%4.16)	2/46 (%4.34)	0,965
DQB1*0505	7/48 (%14.58)	8/46 (%17.39)	0,710
DQB1*0506	3/48 (%6.25)	0/46 (%0)	0,085
DQB1*0606	0/48 (%0)	1/46 (%2.17)	0,304

## TARTIŞMA

Kronik hepatit B ve asemptomatik hepatit B taşıyıcılarında MHC class-2 tiplendirmesi yapılan çalışmamızda, allel bazında; HLA-DRB1\*11 ve HLA-DQA1\*03 allelleri taşıyan bireylerde, kronik hepatit B gelişme oranının düşük olduğu, HLA-DQB1\*01 alleli taşıyan bireylerde ise kronik hepatit B oranının daha yüksek olduğu tespit edildi. Genotip bazında yapılan çalışmada ise; HLA-DRB1\*1415 ve HLA-DQB1\*0101 genotipi taşıyan bireylerde kronik hepatit B gelişme oranının daha yüksek olduğu tespit edildi.

Kronik HBV enfeksiyonu en yaygın enfeksiyon hastalıklarından biridir. Karaciğer sirozu ve hepatoselüler kansere yol açması nedeniyle yüksek mortalite ve morbidite ile seyreder. Oldukça geniş klinik spektruma sahip olan hastalıkta, hastalığın şiddeti ve sonucu üzerine sıklıkla suçlanan faktörler çevresel faktörler, virusa ait faktörler ( viral yük, genotip, mutasyonlar gibi), immunolojik faktörler ve konak genetik faktörleri olsa da bireysel ve etnik faktörlerin nasıl etki ettiği tam olarak bilinmemekte ve bir çok araştırmaya konu olmaktadır<sup>29</sup>.

Şimdiye kadar HBV persistansı ve hastalık şiddeti ile ilgili tek bir allel sorumlu bulunmamasına rağmen, insanlarda yapılmış epidemiyolojik çalışmalar, enfeksiyöz patojenlere kişinin duyarlılığını etkileyen güçlü genetik komponentlerin varlığını düşündürmüştür. İnsan genomunda yaklaşık 35 bin gen vardır ve allellerin çoğu polimorfizm içerir. Bu, insanlardaki ve etnik gruplardaki genetik farklılığın çokluğunu açıklayabilir. HBV enfeksiyonunun iyi seyirli olması spesifik tek gen polimorfizmi ile ilişkili ise bu allel HBV dirençli allel olarak düşünülebilir. Bunun aksi ise HBV duyarlı allel olarak tanımlanabilir. Ancak genetik ilişkiler kompleks olduğu için HBV persistansından ve duyarlılığından sorumlu tek bir allel veya genotip göstermek mümkün değildir<sup>30</sup>.

HLA Class I ve II genleri konak immun cevabının primer modülatörü olduğu için hem CD4<sup>+</sup> T hem de CD8<sup>+</sup> T sitotoksik hücrelerine yabancı antijeni sunar.

Virüsün temizlenmesi spesifik immün yanıtı bağlıdır. Akut enfeksiyonda, viral antijene karşı CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücre yanıtı görülürken, virüsün kolayca temizlenemediği kronik enfeksiyonlarda CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücre yanıtları belirgin

olarak azalmıştır. HBV enfeksiyonu ve konak genetiğini araştıran pek çok çalışma, HLA molekülleri üzerinde yoğunlaşmıştır.

Thursz ve ark'nın<sup>31</sup> çalışmasında, HLA-DRB1 1302 allelinin viral klirens ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve bu bulgu Almanya'dan bildirilen benzer bir çalışma ile de desteklenmiştir<sup>32</sup>.

Thio ve ark'nın<sup>33</sup> yaptığı çalışmada ise, viral klirens ve persistans kanıtlanmış olgularda moleküler olarak HLA class-1 ve 2 gen polimorfizmi ile hepatit B enfeksiyonu arasındaki ilişki belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuçta viral HLA-A 0301 ile DRB1-1302 alleli ile viral klirens arasında ilişki saptanmıştır. Aynı çalışma grubunda viral persistansla ilişkili haplotipler de incelenmiş ve sadece HLA-A 0101 B08 alleli persistansla ilişkili bulunmuştur.

Jiang ve ark'nın<sup>34</sup>, akut ve kronik hepatit B ile sağlıklı kontrol grubunda HLA DRB1, DQA1 ve DQB1 alellerindeki polimorfizmi incelemişler ve HLA DRB1 0301'in kronik hepatit B grubunda sıklığını, kontrol grubuna göre daha yüksek bulmuşlardır. Ayrıca HLA DQA1 0501 ve HLA DQB1 0301 allel frekansı da kronik hepatit B grubunda, kontrol grubuna göre daha yüksek bulmuşlardır. Bununla birlikte HLA DRB1 1101/1104 ve HLA DQA1 0301 allel frekansı, kronik hepatit B grubunda akut hepatit B grubuna göre daha düşük tespit etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda ise HLA- DRB1 1415 ve HLA- DQB1 0101 genotipleri kronik hepatit B'li hastalarda asemptomatik taşıyıcılardan daha fazla bulunmuştur.

Thio ve ark'nın<sup>35</sup>, yaptığı başka bir çalışmada, HBV persistansı ile HLA DQA1 0501 ve DQB1 0301 alellerinin arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır.

Shen ve ark'<sup>36</sup>, çalışmalarında Kuzey Çin'li hastalarda kronik hepatit B enfeksiyonuna duyarlılığın HLA DRB1 10 alleli ile ilişkili olduğunu belirtmişler ve HLA DRB1 0301, HLA DQA1 0501, HLA DQB1 0301 allel frekanslarının kronik hepatit B grubunda, kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgu sayılan alellerin kronik hepatit B duyarlılığı ile yakından ilişkili olduğunu ve belki de sorumlu gen olduğunu düşündürmüştür.

Cotrina ve ark'<sup>37</sup> ise kronik hepatit B ve akut hepatit B enfeksiyonlu hastalarda HLA DRB1 1302 genotipini analiz etmişlerdir. Çalışma sonunda HLA DRB1 1301 ve 1302 alellerinin hepatit B virüs enfeksiyonunun klirensi ile ilişkili

olduğunu ve de insanları kronik hepatit B infeksiyonuna karşı koruduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmada ise HLA-DRB1 \*11 ve HLA-DQA1 \*03 alleli taşıyan bireylerde hastalığın kronikleşme oranının düşük olduğu bulundu.

Diepolder ve ark<sup>38</sup> ise Hepatit B virüsüne karşı güçlü bir virüs spesifik CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T lenfosit cevabının viral klirens ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. HLA DR13 taşıyan akut hepatit B hastalarının HBV kor proteinine karşı daha güçlü bir CD4<sup>+</sup> T hücre cevabına sahip olduklarını saptamışlardır. Bu bulgu HLA DR13 taşıyan hastalarda HBV infeksiyonunun kendi kendini sınırlamasını açıklayabilmektedir.

Aynı araştırmacıların başka bir çalışmasında, HLA DRB1 1101/1104 ve HLA DQA1 0301 allel frekanslarının kronik hepatit B grubunda, akut hepatit B'ye oranla daha düşük olduğu ve aralarında anlamlı korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu HLA DRB1 1101/1104 ve HLA DQA1 0301 alellerinin kronik hepatit B direnciyle yakından ilişkili olduğunu düşündürmüştür<sup>39</sup>.

Bizim çalışma sonucumuza göre de bazı HLA class II gen allelleri kronik hepatitli olgularda fazla bulunurken (HLA-DQB1\*01, DRB1\*1415,HLA-DQB1\*0101) bazı alleller asemptomatik taşıyıcı grupta sık bulunmuştur (HLA-DRB1\*11 ve HLA-DQA1\*03).

Sonuç olarak, HBV'ye karşı konağın immun cevabı hastalığın seyri üzerine etkilidir ve bu bağlamda HLA immun cevaptaki bireysel farklılıkları belirleyen genetik faktördür. HLA geni HBV'ye karşı konak cevabında rol aldığından farklı HLA tiplerine sahip bireyler hastalığa dirençte ve duyarlılıkta farklılıklar gösterebilir. Genetik ilişkiler kompleks olduğu için HBV direnci ve duyarlılığından sorumlu tek bir allel göstermek mümkün değildir.

Hasta sayısı artırılarak yapılan benzer çalışmalar klinikte daha anlamlı sonuçlar doğuracaktır. Ancak bu allel çeşitliliği toplumdan topluma değişiklik gösterdiğinden her toplumun kendi içinde çalışmayı yapması gerekmektedir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Kronik hepatit B ve asemptomatik hepatit B taşıyıcıları arasında yaptığımız allel bazındaki çalışmada; HLA-DRB1\*11 ve HLA-DQA1\*03 allelleri taşıyan bireylerde, kronik hepatit gelişme oranı taşıyıcılardan daha düşük bulunurken, HLA-DQB1\*01 alleli taşıyan bireylerde hastalığın kronikleşme oranı taşıyıcılardan anlamlı olarak yüksek bulundu.

Genotip bazında yapılan çalışmada ise; HLA-DRB1\*1415 ve HLA-DQB1\*0101 genotipi taşıyan bireylerde hastalığın kronikleşme oranının asemptomatik hepatit B taşıyıcılarına oranla daha yüksek olduğu tespit edildi.

HBV'ye karşı konağın immun cevabı hastalığın sonucu üzerine büyük etkilere sahiptir. HLA immun cevaptaki bireysel farklılıkları belirleyen genetik faktördür. HLA geni HBV'ye karşı konak cevabında rol aldığından farklı HLA tiplerine sahip bireyler hastalığa dirençte ve duyarlılıkta farklılıklar gösterebilir.

HBV ile enfekte olduktan sonra MHC sınıf II allelleri bakılarak, hastalığın seyri konusunda bilgi sahibi olunabilir. Hasta sayısı artırılarak yapılan benzer çalışmalar klinikte daha anlamlı sonuçlar doğuracaktır. Ancak bu allel çeşitliliği toplumdan topluma değişiklik gösterdiğinden her toplumun kendi içinde çalışmayı yapması gerekmektedir.



## KAYNAKLAR

1. Lee WM. Hepatitis B virus infection, *N Engl J Med* 1997;337:1733-1745.
2. Pawlotsky JM. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J Clin Virol* 2005; 34(1):S125-S129.
3. Ganem D, Schneider R. Hepadnaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven;2001: 2923-2970.
4. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Bio Rev* 2000;64:51-68
5. Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* 2004;106(2):199-209.
6. Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nukleokapsid. *Virus Res* 2004;106(2):199-209.
7. Paetzel M, Karla A, Strynadka N, Dalbey R. Signal peptidases, *Chem Rev* 2002;102:4549-4579.
8. Tong S. Mechanism of HBV genome variability and replication of HBV mutants. *J Clin Virol* 2005;34(1): S134-S138.
9. Neurath AR, Kent SB, Strick N, Parker K. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 1986;46:429-436.
10. Hartmann- Stuhler C, Prange R. Hepatitis B Virus large envelope protein interact with gamma 2- adaptin, a clathrin adaptor- related protein. *J Virol* 2001;75:5343-5351.
11. Kann M, Bischof A, Gerlich WH. In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J virol* 1997;71:1310-1316.
12. Locarnini S. Molecular virology of Hepatitis B Virus. *Semin Liver Dis* 2004; 24 (1): 3-10.
13. Tagawa M, Omata M, Okuda K. Appearance of viral RNA transcripts in the early stage of duck hepatitis B virus infection. *Virology* 1986;152:477-482.
14. Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E et al. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1991;325:675-680.

15. Arii S, Yamaoka Y, Futagawa S et al. Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. The Liver Cancer Study Group of Japan. *Hepatology* 2000;32:1224-1229.
16. Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinoma Hepatocellulaire. A comparison of lipiodol chemembolization and conservative treatment for unresectable hepatocellular cancer. *N Engl J Med* 1995;332:1256-1261.
17. Epstein B, Ettinger D, Leichner PK. Multimodality cisplatin treatment in nonresectable alpha-fetoprotein-positive hepatoma. *Cancer* 1991;67:896-900.
18. Nagaoka S, Yatsunami H, Hamada H, et al. The des gamma-carboxy prothrombin index is a new prognostic indicator for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003;98:2671-7.
19. Rehermann B, P. Fowler, J. Sidney, J. Person, A. Redeker, M. Brown, B. Moss, A. Sette, and F. V. Chisari. 1995. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp. Med.* 181: 1047-1058.
20. Davla K. Her Yerde Karşımda; Nedir Bu HLA Tiplendirimi. XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, IV. Hematoloji İlk Basamak Kursu
21. Roitt IM, Delves PJ. Membrane Receptors For Antigen. *Roitt's Essential Immunology*. Blackwell Science. Tenth Edition. 2001. Chapter 4. 62–79.
22. William EP. The Major Histocompatibility Complex. *Fundamental Immunology*, Fourth Edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1999. Chapter 8. 263–280.
23. Bektaş M. HLA ve Doku Tiplendirilmesi. Türk Hematoloji Derneği Kan ve Kemik İliği Transplantasyon Kursu.
24. Nepom GT, Taurog JD. The Major Histocompatibility Gene Complex. *Harrison's Principles Of Internal Medicine*. 15th Edition Vol.2 Mc Graw-Hill Medical Publishing Division 2001.
25. Yogita G, Kaplana J, Arvind C, Bhushan P. HLA and Disease. *European Journal Epidemiology* (2005): 475-488.

26. Takayama T, Sekine T. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of HCC: a randomized trial. *Lancet* 2000;356:802-807.
27. Strominger JL, Wiley DC. The class I and class II proteins of the human major histocompatibility complex. *JAMA* 1995;274:1074-1076.
28. Singh N, Agrawal S, Rastogi AK. Infectious diseases and immunity: special references to major histocompatibility complex. *Emerg Infect Dis* 1997;3: 41-49
29. Gu CH, Luo KX. Hepatitis B. Basic biology and clinical science. Second edition. Beijing, People's Medical Publishing House 2001: 1-6.
30. Dean M, Corrington M, O' Brien SJ. Balanced polymorphism selected by genetic versus infectious human disease. *Annu Rev. Genomics* 2002;3:263-292.
31. Thursz, M.R, D. Kwiatkowski, C. E. M.Allsopp. Association between an MHC class-2 allele and clearance of hepatitis B virus in The Gambia. *N. Engl.J.Med.* 332: 1065-1069.
32. Hohler, T., G. Gerken, A. Notghi. HLA DRB1 1301 and 1302 protect against chronic hepatitis B. *J. Hepatol.*26:503-507.
33. Rehmann, B., P. Fowler , J. Sidney. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp. Med.* 181: 1047-1058.
34. Jiang, YG, Wang YM, Liu J. Association between HLA class-II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. *World J gastroenterol* 2003 ; 9 (10) : 2221- 2225.
35. Thio CL, Carrington M, Marti D. Class II HLA alleles and hepatitis B virus persistence in African Americans. *J Infect Dis* 1999;179: 1004-1006.
36. Shen JJ, Ji Y, Gu XL. The association of HLA DRB1 10 with chronic hepatitis B in Chinese patients. *Zhonghua Weishengwuxue He Mianyixue Zazhi* 1999; 19: 58-59.
37. Cotrina M, Buti M, Jardi R. Study of HLA- II antigens in chronic hepatitis B. *Gastroenterol Hepatol* 1997; 20: 115-118.

38. Diepolder HM, Jung MC, Keller E. A vigorous virus –specific CD4 (+) T cell response may contribute to the association of HLA DR 13 with viral clearance in hepatitis b. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 244-251.
39. Chu RH, Ma LX, Wang G. Influence of HLA DRB1 alleles and HBV genotypes on interferon alfa therapy for chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11(30):4753- 4757.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>CDC</b>	Central Disease Control (Hastalık kontrol merkezi)
<b>HLA</b>	Human Lökosit Antijeni
<b>LMP</b>	Düşük Molekül Ağırlıklı Protein
<b>MHC</b>	Majör Doku Uyuşum Kompleksi
<b>MLC</b>	Karışık Lenfosit Kültürü
<b>ORF</b>	Açık Okuma Bölgeleri
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RT</b>	Revers Transkriptaz
<b>TAP</b>	Antijen İşlenmesi İle İlişkili Taşıyıcı
<b>TCR</b>	T Hücre Reseptörü
<b>TNF</b>	Tümör Nekrozis Faktör
<b>WHO</b>	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

## ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (HBV'nin genomik organizasyonu).....	10
Şekil 2 (HLA bölgesinin gen haritası).....	14
Şekil 3 (Class I ve Class II MHC Moleküllerinin Yapısı).....	15

## TABLULAR DİZİNİ

<b><u>Tablolar</u></b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b>	<b>(High pure PCR template kit içeriği)..... 23</b>
<b>Tablo 2</b>	<b>(Amplifikasyon İçin Gerekli Reaksiyon İçerikleri).....27</b>
<b>Tablo 3</b>	<b>(Amplifikasyonda Kullanılan Thermal Cyclers Programı).....27</b>
<b>Tablo 4</b>	<b>(Kronik Hepatit B ve Asemptomatik Hepatit B'li Hastalarda HLA-DRB1 Analiz Sonuçları).....30</b>
<b>Tablo 5</b>	<b>(Kronik Hepatit B ve Asemptomatik Hepatit B'li Hastalarda HLA-DQA1 Analiz Sonuçları).....31</b>
<b>Tablo 6</b>	<b>(Kronik Hepatit B ve Asemptomatik Hepatit B'li Hastalarda HLA-DQB1 Analiz Sonuçları).....31</b>
<b>Tablo 7</b>	<b>(Kronik Hepatit B ve Asemptomatik Hepatit B'li Hastalarda HLA-DRB1 Genotip Analiz Sonuçları)..... 33</b>
<b>Tablo 8</b>	<b>(Kronik Hepatit B ve Asemptomatik Hepatit B'li Hastalarda HLA-DQA1 Genotip Analiz Sonuçları)..... 34</b>
<b>Tablo 9</b>	<b>(Kronik Hepatit B ve Asemptomatik Hepatit B'li Hastalarda HLA-DQB1 Genotip Analiz Sonuçları).....35</b>