

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**HEPATİT B VİRUSU İLE ENFEKTE OLAN HASTALARDA
KLİNİK GİDİŞ İLE TNF α , IFN γ , IL-10, IL-17 VE IL-18 GEN
POLİMORFİZİMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
BELİRLENMESİ**

**Dr. Esra Nurlu Temel
UZMANLIK TEZİ**

**ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİMDALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. F. Zeynep AKÇAM**

**2011
ISPARTA**

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**HEPATİT B VİRUSU İLE ENFEKTE OLAN HASTALARDA
KLİNİK GİDİŞ İLE TNF α , IFN γ , IL-10, IL-17 VE IL-18 GEN
POLİMORFİZİMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
BELİRLENMESİ**

Dr. Esra Nurlu Temel
UZMANLIK TEZİ

**ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİMDALI**

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. F. Zeynep AKÇAM

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 1785-TU-09 proje numarası ile desteklenmiştir.

2011
ISPARTA

ÖNSÖZ

Asistanlığım süresince araştırmayı planladığım her konuda bilgi alabildiğim karşılaştığım güçlükleri kendi deneyim ve birikimiyle çözümleyerek aşmamı sağlayan, bilimsel bir araştırma konusunda sergilenebilecek özgün yaklaşımın nasıl olacağını öğreten, tez sürem boyunca yönlendirilmeye ihtiyaç duyduğum her anda bilgisini esirgmeden aktaran ve manevi desteğini her zaman hissettiren, sayın hocam Doç. Dr. F. Zeynep Akçam'a,

Asistanlık eğitimim süresince bilimsel tecrübelerini her zaman bizimle paylaşan, hasta hekim ilişkisine gösterdiği özenle tüm öğrencilerine ve asistanlarına örnek olan, bilimsel konular dışında da hayat ve insanlık adına olumlu birçok davranışı kendisinden öğrendiğim, sayın hocam Prof.Dr.Güler Yaylı'ya,

Kimi zaman kardeş, kimi zaman arkadaş gibi hissettiğim, dürüstlüğünü ve yardımseverliğini her zaman örnek aldığım, bilimsel tüm konularda desteğini gördüğüm sayın hocam Yrd. Doç. Dr.Onur Kaya'ya,

Tez çalışmamı hayatımın en güzel bilimsel deneyimine dönüştüren, bilimsel donanımını esirgmeden benimle paylaşan, fedakarlığın sınır tanımayan boyutunu öğreten, tüm engellerin aşılabileceğini gösteren, yaşama tamamıyla aktarılabilmiş samimiyetin ve mütevaziliğin örneği olan, sayın hocam Doç. Dr.Vildan Caner'e,

Tez çalışmam süresince Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik bölümünün laboratuvar imkanlarını kullanmamı sağlayan ve her aşamasında bizzat destek olan sayın hocam Prof. Dr. Gülseren Bağcı'ya,

Tezimin istatistiksel danışmanlığını üstlenen, bulguların analizi ve yorumlanmasında değerli bilgilerini benimle paylaşan, sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Esin Kulaç'a,

Asistanlık dönemimde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma, servis ve enfeksiyon kontrol komitesi hemşirelerine,

Son olarak sevgi ve desteklerini tüm yaşamımda hissettiğim aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR ve SEMBOLLER	v
TABLolar DİZİNİ	vii
GRAFİKLER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Hepatit B Virüs Enfeksiyonu	2
2.1.1. Tarihçe	2
2.1.2. Virüsün Yapısı	3
2.1.2.1. Virüsün Genomik Organizasyonu	4
2.1.2.2. Virüsün Replikasyonu	5
2.1.2.3. Virüs Subtipleri ve Genotipleri	7
2.1.2.4. Virüs Mutantları	7
2.1.2.5. Virüsün Dayanıklılığı	8
2.2. Epidemiyoloji	9
2.2.1. Hepatit B Virüsünün Bulaşma Yolları	9
2.2.2. Hepatit B Virüsünün Prevelansı	10
2.3. Patogenez	12
2.3.1. Doğal İmmün Yanıt	12
2.3.2. Adaptif İmmün Yanıt	14
2.3.3. Karaciğer İmmünopatogenezi	17
2.3.4. Hepatit B Virüs Enfeksiyonunda Doğal Seyir	18
2.3.5. Hepatit B Virüs Persistansının Fizyopatogenezi	19
2.4. Klinik	23
2.4.1. Akut Hepatit B Enfeksiyonunda Klinik	23
2.4.2. Kronik Hepatit B Enfeksiyonunda Klinik	23

2.4.3. Laboratuvar Bulguları	24
2.5. Genetik ve Polimorfizm	26
2.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	28
2.7. Sitokinler	32
2.7.1. Sitokinlerin Genel Özellikleri	32
2.7.2. Sitokinlerin Sınıflandırılması	33
2.7.3. Sitokinlerin Etki Mekanizması	34
2.7.4. Hepatit B Enfeksiyonu ve Sitokin Polimorfizimi	36
3. MATERYAL ve METOD.....	38
3.1. Çalışma Grupları ve Materyal	38
3.2. Genomik DNA Ekstraksiyonu	38
3.3. Sitokin Gen Polimorfizimlerinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi	39
3.4. İstatistiksel Analiz	49
4. BULGULAR	50
5. TARTIŞMA	64
ÖZET	70
SUMMARY	71
KAYNAKLAR	72

KISALTMALAR ve SEMBOLLER

CTL	: Sitotoksik T lenfosit
DC	: Dentritik Hücre
DNA	: Deoksiribonükleik asit
cccDNA	: Covalently closed circular DNA
HBcAg	: Hepatit B kor antijenini
HBe Ag	: Hepatit B zarf antijeni
HBs Ag	: Hepatit B yüzey antijeni
HBV	: Hepatit B virüsü
IL-1	: İnterlökin 1
IL-2	: İnterlökin 2
IL-3	: İnterlökin 3
IL-4	: İnterlökin 4
IL-5	: İnterlökin 5
IL-6	: İnterlökin 6
IL-7	: İnterlökin 7
IL-8	: İnterlökin 8
IL-9	: İnterlökin 9
IL-10	: İnterlökin 10
IL-11	: İnterlökin 11
IL-12	: İnterlökin 12
IL-13	: İnterlökin 13
IL-14	: İnterlökin 14
IL-15	: İnterlökin 15
IL-16	: İnterlökin 16
IL-17	: İnterlökin 17
IL-18	: İnterlökin 18
IFN	: İnterferon
MBL	: MannoZ Bağlayıcı Lektin

MHC	: Major-histokompatibilite-kompleksi
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
NFκB	: Nükleer Faktör Kappa B
NK	: Doğal öldürücü
NKT	: Doğal öldürücü T
nm	: Nanometre
PAMP	: Patojenle ilişkili moleküler model
PCR	: Polimeraz zincir tepkimesi
PD 1	: Programlı ölüm
pH	: Power of Hydrogen
PMNL	: Polimorf Nüveli Lökositler
PRR	: Model tanıma reseptörü
rcDNA	: Relaxed circular DNA
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: revolutions per minute
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü
TNF-α	: Tümör nekroze edici faktör
TRAIL-1	: TNF ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand -1
Treg	: T regülatör

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. HBV Enfeksiyonunun bulaşma yollarına göre risk grupları	10
Tablo 2. HBV Enfeksiyonunda klinik sonuçları etkileyen parametreler	12
Tablo 3. TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-17 ve IL-18 SNP'leri ve lokalizasyonları	40
Tablo 4. TNF- α -308 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5'→3')	40
Tablo 5. IFN- γ +874 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5'→3')	40
Tablo 6. IL-10 -592 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5'→3')	41
Tablo 7. IL-10 -1082 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5'→3')	41
Tablo 8. IL-17 3'UTR SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5'→3')	41
Tablo 9. IL-17 Ekzon 3 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5'→3')	42
Tablo 10. IL-18 -137 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5'→3')	42
Tablo 11. IL-18 -607 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5'→3')	42
Tablo 12. TNF- α -308 SNP analizine özgün reaksiyon karışımı.....	43
Tablo 13. IFN- γ +874 SNP analizine özgün reaksiyon karışımı	43
Tablo 14. Diğer SNP analizlerine özgün reaksiyon karışımı	44
Tablo 15. TNF- α -308 SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü	45
Tablo 16. IFN- γ +874 SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü	45
Tablo 17. IL-10 -592 SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü	46
Tablo 18. IL-10 -1082 SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü	46
Tablo 19. IL-17 3'UTR SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü ..	47
Tablo 20. IL-17F Ekzon3 SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü	47
Tablo 21. IL-18 -137 SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü	47

Tablo 22. IL-18 -607 SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü	48
Tablo 23. Sitokin genlerine özgün SNP'lerinin çalışma gruplarına göre dağılım oranları	63

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. TNF- α -308 SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı	51
Grafik 2. IFN- γ +874 SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı	53
Grafik 3. IL-10 -592 SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı	54
Grafik 4. IL-10 -1082 SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı	56
Grafik 5. IL-17 3' UTR SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı	57
Grafik 6. IL-17 Ekzon 3 SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı	59
Grafik 7. IL-18 -137 SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı	60
Grafik 8. IL-18 -607 SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Serumda gözlenen HBV partiküllerinin elektron mikroskop fotoğrafı	3
Şekil 2. Serumda gözlenen HBV partikülleri	3
Şekil 3. Dünyada HBsAg prevalans haritası	11
Şekil 4. HBV spesifik CD8 T hücrelerinin hepatositler üzerindeki çift yönlü etkisi ...	15
Şekil 5. Kromozom-DNA-Gen ilişkisi	26
Şekil 6. Kompleks canlıdan en basit genetik moleküle geçişin şematizasyonu	27
Şekil 7. Hibridizasyon prob yöntemi ve FRET şematizasyonu	29
Şekil 8. Lightcycler Real –Time PCR Cihazı	31
Şekil 9. Lightcycler Real –Time PCR Cihazının Kısımları	32
Şekil 10. Sitokin Reseptörlerinin Sinyal İletim Mekanizmalarının Şematizasyonu	35
Şekil 11. TNF- α -308 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi	50
Şekil 12. TNF- α -308 SNP'ne özgün erime eğrisi	51
Şekil 13. IFN- γ +874 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi	52
Şekil 14. IFN- γ +874 SNP'ne özgün erime eğrisi	52
Şekil 15. IL-10 -592 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi	53
Şekil 16. IL-10 -592 SNP'ne özgün erime eğrisi	54
Şekil 17. IL-10 -1082 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi	55
Şekil 18. IL-10 -1082 SNP'ne özgün erime eğrisi	55
Şekil 19. IL-17 3'UTR SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi	56
Şekil 20. IL-17 3'UTR SNP'ne özgün erime eğrisi	57
Şekil 21. IL-17 ekzon 3 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi	58
Şekil 22. IL-17 ekzon 3 SNP'ne özgün erime eğrisi	58
Şekil 23. IL-18 -137 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi	59
Şekil 24. IL-18 -137 SNP'ne özgün erime eğrisi	60
Şekil 25. IL-18 -607 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi	61
Şekil 26. IL-18 -607 SNP'ne özgün erime eğrisi	61

1.GİRİŞ

Hepatit B virüsü (HBV) kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinoma neden olan hepatotropik bir virüstür. Kronik hepatit B enfeksiyonu dünyada 400 milyondan fazla insanı etkileyen bir halk sağlığı sorunudur. Etkili bir aşısının olmasına, tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen önemini korumaktadır (4).

Hepatit B enfeksiyonu kendiliğinden iyileşme, asemptomatik taşıyıcılık, kronik aktif hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinoma kadar değişen farklı klinik seyirler göstermektedir. Ayrıca bireyler arasında antiviral tedaviye yanıt da değişkendir (16). Hücrel ve humoral immün yanıt ile yakından ilişkili olan bu kompleks hastalıkta sitokinlerin, virüsün oluşturacağı hastalık tipini ve sonucunu belirlemede oldukça önemli olduğu düşünülmektedir (67). Doğal sitokin yanıtını etkileyen ve bireyler arasında sitokin üretiminde veya kapasitesinde varyasyonlara sebep olan esas faktör genetik varyasyonlardır. Bu kapsamda, sitokin gen polimorfizimleri enfeksiyon hastalıklarına duyarlılığı, hastalığın şiddetini ve klinik sonucunu etkileyen önemli bir mekanizmadır. Yapılmış çalışmalarda bireyler arasındaki klinik yanıtların farklılığı sitokin üretiminde veya kapasitesinde varyasyonlara neden olan ilgili genlerde tanımlanan polimorfizimlere bağlanmıştır (68,69).

Tüm bu bilgiler doğrultusunda HBV ile enfekte olan bireylerde, hepatit immünopatogenezinde konağa ait faktörler içinde değerlendirilen sitokinlerden TNF- α , IFN γ , IL-10, IL-17, ve IL-18'e ait gen polimorfizimlerinin belirlenmesi ve bu polimorfizimlerle klinik sonuçlar arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatit B Virüs Enfeksiyonu

HBV uzun kuluçka süreli hepatit, serum hepatiti ve viral hepatit B olarak isimlendirilen enfeksiyon hastalığının etkenidir.

2.1.1. Tarihçe

Çok eski çağlardan beri bilinen viral hepatitler tıbbi kayıtlara ilk olarak M.Ö. V. yüzyılda girmiştir. İlk sarılık salgını Napoleon'un Mısır seferinde görülmüştür. Virchow 1865'te ilk olarak 'kataral ikter' diye tanımlamıştır. 1887'de Weil; sarılık enfeksiyöz olabilir derken, 1942'de Vogt; etkenin virüs olabileceğini düşünmüştür. MacCallum ise 1947 yılında serum hepatiti için 'hepatit B' terimini kullanmıştır.

Blumberg'in 1965 yılında Avustralya antijenini bulmasıyla önemli bir adım atılmıştır. 1970 yılına gelindiğinde ise Dane elektron mikroskopunda Avustralya antijeni serumu ile reaksiyona giren ve kendi adıyla anılan viral partikülleri göstermiştir. 1979'da HBV deoksiribonükleik asit (DNA) yapısı çoğaltılarak nükleotid dizisi çıkarılmıştır. Sonraki yıllarda virüs DNA'sı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır.

Özellikle son 40 yıldaki gelişmeler virüsün tanı, tedavi ve korunmasında önemli katkılar sağlamıştır. Bu sayede HBV'den korunmak için 1981 yılında plazma kökenli aşı kullanıma sunulmuştur. 1986 yılından itibaren ise daha güvenli olan rekombinant aşılardan kullanılmaya başlanmıştır (1).

2.1.2. Virüsün Yapısı

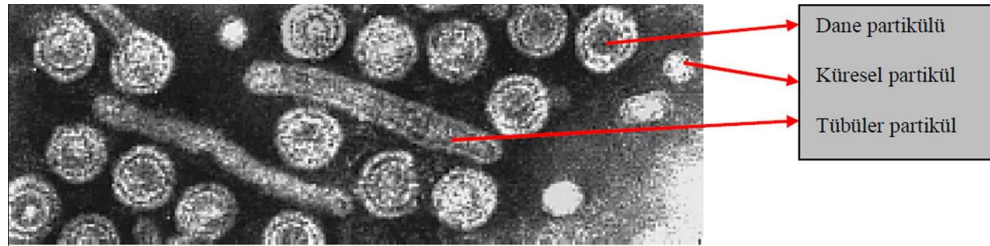
HBV; Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirus cinsinde yer alan, hepatotropik, zarflı, kısmi çift sarmallı çembersel DNA'ya sahip olan bir virüsdür. Genomu 3020-3220 nükleotidden oluşur (2).

HBV içeren serumdan hazırlanan preparatlar elektron mikroskopunda incelendiğinde üç farklı tip partikül gözlenmiştir (Şekil 1 ve 2).

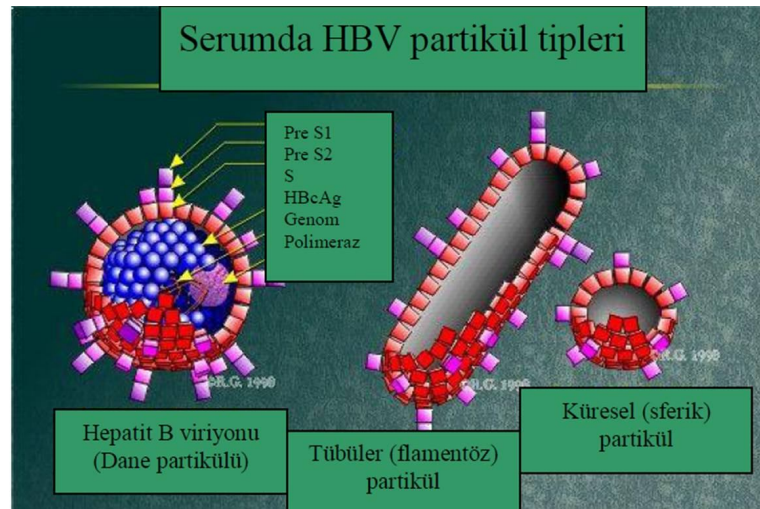
1-Dane partikülleri: Tam bir viriyon yapısında olan enfeksiyöz Dane partikülleri ortalama 42 nm (40-48 nm) çapında ve küresel formdadır. Bir adet sirküler ve kısmi çift sarmallı DNA, DNA polimeraz, kapsid ve zarftan oluşur

2-Küresel (sferik) partiküller: Yaklaşık 22 nm (16-25 nm) çapında, nükleik asit içermeyen ve enfeksiyöz olmayan yapılardır.

3-Tübüler (filamentöz) partiküller: Yaklaşık 22 nm çapında ve 200 nm uzunluğunda, nükleik asit içermeyen ve enfeksiyöz olmayan yapılardır (3,4).



Şekil 1. Serumda gözlenen HBV partiküllerinin elektron mikroskobu görüntüsü



Şekil 2. Serumda gözlenen HBV partikülleri

Her üç form da enfekte konak serumunda yüksek miktarda (200-500 mg/ml) saptanabilen ve hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) adı verilen ortak yüzey antijenine sahip olup immünojeniktir. Enfektif olmayan formlar daha fazla miktarda üretilir ve kanda dolaşan HBsAg'nin büyük kısmını 22 nm'lik küresel partiküller oluşturur (3). Enfektif olmayan partiküllerin antikoru ile oluşturdukları komplekslerin HBV ile enfekte kişilerde izlenen immünkompleks reaksiyonlarından sorumlu olduğu bilinmektedir (4).

2.1.2.1. Virüsün Genomik Organizasyonu

HBV; kısmen çift sarmallı, sirküler bir DNA molekülü taşır. DNA'nın molekül ağırlığı $2,3 \times 10^6$ dalton'dur. HBV-DNA uzun ve kısa olmak üzere iki adet iplikçikten meydana gelir. 3200 nükleotid taşıyan uzun iplikçik L veya negatif zincir, 1800-2700 nükleotid taşıyan kısa iplikçik ise S veya pozitif zincir olarak isimlendirilir. Genetik bilginin tamamı uzun sarmal üzerinde kodlanmıştır. HBV genomu; S, C, X ve P kısaltmaları ile gösterilen dört farklı proteini kodlayabilecek dört açık okuma çerçevesi dizisi (Open reading frame=ORF) şeklinde organize olmuştur (3, 4, 5).

1. S geni: Pre-S1, pre-S2 ve S bölgelerinden oluşup HBsAg'ni kodlayan gendir. Kodlamanın gen üzerindeki farklı başlangıç kodonlarından başlaması 3 farklı proteinin meydana gelmesine neden olur. HBsAg'ni değişik oranlarda bu kılıf proteinlerini içerir.

a. Okuma işlemi gen üzerindeki ilk kodondan başlarsa pre-S1+pre-S2+S bölgelerinin tümü okunacağından kılıfın büyük proteini sentezlenir (L protein: LHBs). LHBs en fazla Dane partiküllerinin yüzeyinde bulunur. Viryonun konak hücreye bağlanmasında L proteinin rolü önemlidir.

b. Okuma işlemi S geni üzerindeki ikinci kodondan başlarsa pre-S2+S bölgelerinin ürünü olan orta protein (M protein: MHBs) sentezlenir. Replikasyonun olmadığı durumlarda HBsAg içinde yer almaz. Bu nedenle pre-S2 antijeninin varlığı viral replikasyonun bir göstergesi olarak kabul edilir.

c.Okuma işlemi sadece S bölgesini içerir ise kılıfın küçük proteini (S protein: SHBs) sentezlenir. HBsAg'nin büyük kısmını oluşturan major protein olarak bilinir ve B lenfositleri için epitopik bölgeye sahiptir.

2. C geni: Pre-C ve C olmak üzere iki bölgeye ayrılan C geni antijenik özellikleri farklı iki değişik proteini kodlar. Okuma işlemi pre-C bölgesinden başlarsa hepatit B zarf antijeni (HBeAg), C bölgesinden başlarsa hepatit B kor antijeni (HBcAg) sentezlenmektedir. HBcAg sadece karaciğer hücresinde ve kanda Dane partikülü içinde bulunur.

3. P geni: P proteini veya polimeraz geni, viral genomun büyük bir kısmını kaplar. DNA bağımlı DNA polimeraz ve ribonükleik asit (RNA) bağımlı revers transkriptaz aktivitesindeki temel bir polipeptidi kodlar.

4. X geni: HBV genomunda yer alan en küçük gen bölgesidir. X geni ürünü olan 154 aminoasitlik Hbx proteini karaciğerde bulunan ve replikasyonda rol oynayan bir antijendir. Sitoplazmada mitojenik sinyal yolunu aktive etmekte, çekirdekte transkripsiyon faktörlerini etkileyerek hepatokarsinogenezi desteklemektedir (2, 6, 7).

2.1.2.2. Virüsün Replikasyonu

HBV ile enfekte hücreden günde 10^{11} - 10^{13} virüs salınır. Virüsün plazma yarı ömrünün 4,4 saat olduğu ve hepatosite girdikten sonra replikasyonun 17 saat – 1,5 gün kadar sürdüğü saptanmıştır (8). Vücuttaki virüs yükünün yaklaşık %50'si her gün yenilenmektedir. HBV ile enfekte hücrelerin yaşam sürelerinin 10-100 gün olduğu belirtilmiştir. HBV'nin tek kanıtlanmış replikasyon bölgesi hepatositlerdir(9).

1. Virüsün hücre içine girmesi : Replikasyonun ilk aşamasında, virüsün hedef hücreye bağlanarak iç kısımlara geçmesi söz konusudur. L-HBsAg'nin amino terminalinde bulunan pre-S1 proteini, genotiplere göre değişkenlik gösterir ve 108 ya da 119 aminoasit büyüklüğündedir. Hedef hücreye tutunmada önemli işlevi olan epitopları içerdiği saptanmıştır. L-HBsAg ve MHBsAg'de bulunan Pre-S2 proteini, 55 aminoasitten oluşur ve serum albuminine bağlanarak hepatosite bağlanmada albumini aracı olarak kullanır (10).

Fibronektin, transferrin reseptörü, apolipoprotein H, pre S2 glikan ve HBV bağlayan faktör gibi birçok hücrel ligand ise HBV'nün konak hücreye bağlanmasında rol alan doku faktörleri olarak belirlenmiştir (11,12).

Hedef hücreye bağlanma sonrası virüs zarfı ve hücre membranı arasında füzyon meydana gelir ve nükleokapsid sitoplazmaya salınır. Kapsidin parçalanması ile viral genomik DNA ve polimeraz çekirdeğe taşınır.

2. Transkripsiyon /viral RNA'ların sentezi: HBV viriyonları; tam negatif iplik ve kısmi tamamlanmış pozitif iplikli çembersel DNA genomu (relaxed circular DNA, rcDNA) taşır. Hücre çekirdeğine geçen rcDNA'nın kısa pozitif iplikçiği DNA polimeraz etkisi ile tamamlanır ve cccDNA (covalently closed circular DNA) meydana gelir. Bu basamak replikasyonun en önemli aşamasıdır. cccDNA oluşumu virüs inokülasyonundan sonraki ilk 24 saatte meydana gelir. Hepatosit çekirdeğinde oluşturulan cccDNA rezervuarı, HBV enfeksiyonunun persistansında en önemli faktördür. Konak hücre RNA polimerazının etkisiyle cccDNA'dan pregenom olarak tanımlanan mRNA'ların transkripsiyonu gerçekleşir.

3. Translasyon/viral proteinlerin sentezi: Meydana gelen mRNA'lardan translasyon sonucu virüsün yapısal proteinleri, DNA polimeraz ve revers transkriptaz gibi enzimler sentezlenir.

4. Kor oluşumu: Viral proteinler sentezlenirken hücre sitoplazması içinde bulunan pregenom, oluşan kor partikülü içine yerleşerek yeni DNA replikasyonunu başlatır.

5. Olgun infeksiyöz viriyonun (Dane partikülü) salınımı: Kılıf proteinleri kor kısmını çevreleyerek DNA polimerazın etkisini sürdürmesini önlerler ve pozitif zincirin sentezi tamamlanmadan kesintiye uğrar. Sonuçta meydana gelen kısmen çift sarmallı DNA molekülünü içeren viral partikül (Dane partikülü) konak hücrenin dışına çıkar (7,13,14).

2.1.2.3. Virüs Subtipleri ve Genotipleri

HBsAg; antijenik determinantlarına göre subtiplere ayrılır. HBsAg'nin tüm HBV kökenlerinde ortak olan "a" determinantından başka üç determinantı daha tanımlanmıştır. Bu determinantlar; "d" (lizin) , "y" (arjinin), "w" (lizin) , "r" (arjinin) ve "q" determinantlarıdır. Bu determinantların çeşitli kombinasyonları ile toplamda dokuz adet HBV antijenik subtipi tanımlanmıştır (15). S geninde olan mutasyonlar subtip değişikliklerine neden olabilmektedir. Farklı subtiplerle koenfeksiyon, tüm HBV subtiplerinde ortak olan "a" determinantı nedeniyle nadir olarak görülmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda subtip ayw2 saptanmıştır (15,16).

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucunda HBV genomları arasında farklılıklar olduğu saptanmış ve birbirlerine benzerlik oranları %92 ve daha fazla olan HBV suşları aynı grupta toplanarak coğrafi ve etnik orjine göre A-H arasında 8 farklı genotip belirlenmiştir. HBV genotipleri de subgenotiplere ayrılır. Genotip A, B, C, D'de beşer, genotip F'de ise dört subgenotip bildirilmiştir. Türkiye'de genotip D hakim olup, daha çok görülen subgenotip ise D2'dir (17).

Birden fazla genotiple oluşan enfeksiyonlar ve bu genotiplerin rekombinasyonları da bildirilmiştir. HBV genotiplerinin coğrafi dağılım farkları dışında klinik seyir ve virülans farkları olduğu düşünülmektedir. Batı Avrupa'da yaygın olan A ve D genotiplerinin araştırıldığı bir çalışmada, A genotipine bağlı enfeksiyonlarda kronikleşme oranının B genotipine göre daha yüksek olduğu ve A genotipinin daha ağır karaciğer hasarına yol açtığı gözlenmiştir (18). Tayvan'da yapılan bir çalışmada, B genotipinin 50 yaş altında hepatosellüler karsinom gelişimi ile, C genotipinin ise daha ağır karaciğer hastalığı ile ilişkisi bildirilmiştir (19).

2.1.2.4. Virüs Mutantları

HBV ile enfekte bireylerde; konağa ve virüse ait faktörlere ilave olarak nükleotid veya nükleozid analogları ile tedavi, uzun süre hepatit B immünoglobulin uygulanması ve hepatit B aşısı ile karşılaşma genetik heterojenite gösteren varyant virüsler topluluğunun oluşmasına neden olur. HBV'nin mutasyon hızı; her yıl 10 000

baz çifti için bir nükleotid olarak hesaplanmıştır. Bu mutasyon hızı diğer DNA virüslerinden 10-100 kat fazladır. Bu durum HBV'nin, RNA aracısı kullanarak revers transkripsiyonla replike olmasına bağlanmaktadır (16).

Sık görülen HBV mutantları sırasıyla:

1. Prekore/Kore mutasyonları

a. Prekor bölgesi mutasyonları: HBeAg negatif olup ağır karaciğer hastalığı ve aktif viremi olan hastalarda tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar, hastaların bazılarında precore/core geninde 1896. nükleotidde mutasyon (TGG/TAG) ile 'dur' kodonunun oluştuğu ve HBeAg sentezinin engellendiğini göstermiştir. 'HBeAg negatif' olarak adlandırılan bu varyant virüsler fulminan hepatit ve ağır kronik karaciğer hastalarında daha sık saptanmıştır (20,21).

b. Kor-promoter bölgesi mutasyonları: A1762T ve G1764A ikili mutasyonunda precore mRNA transkripsiyonu baskılanmakta ve HBeAg salınımı %70 oranında azalmaktadır. Dolayısıyla HBeAg negatif kronik hepatit B olgularına neden olan mutasyonlardır (22,16).

2. S geni mutasyonları

HBsAg'nin "a" antijenik determinantında glisinin arginine değişmesiyle sonuçlanan mutasyon, HBsAg'nin üç boyutlu yapısını değiştirerek anti-HBs'nin nötralizan etkisini ortadan kaldırır. Rekombinant HBsAg içeren aşı uygulanmış kişilerde HBsAg ve anti-HBs birlikteliği ile görülen bu mutant virüsler, aşı ile indüklendiği için "aşı kaçak mutantları" olarak tanımlanamaktadır. Karaciğer transplantları sonrasında HBV reenfeksiyonunu önlemek için uygulanan hepatit B hiperimmünglobulini kullanımı sırasında da 12 ay içinde hastaların %20'sinde "a mutantları" seçilmektedir (23,16).

2.1.2.5. Virüsün Dayanıklılığı

HBV zarflı bir virüs olmasına rağmen düşük pH, ısı, dondurma ve çözmeye dayanıklıdır. Bu özelliği virüsün kişiden kişiye bulaşımını kolaylaştırmaktadır.

HBV; 30-32°C' de en az altı ay, -20°C' da ise 15 yıl enfektivitesini korumaktadır. Serum içerisindeki virüsün enfektivitesi doğrudan kaynatmakla iki

dakikada, 121°C’da ve 0,5 Atm basınç altında 20 dakikada, 160°C’da kuru sıcak hava ile bir saatte kaybolmaktadır. HBsAg, %2,5 sodyum hipoklorit varlığında üç dakikada antijenitesini ve enfektivitesini yitirmektedir (15,16).

2.1.3. Epidemiyoloji

2.1.3.1 Hepatit B Virüsünün Bulaşma Yolları

HBV bulaşmasında en önemli kaynak enfekte bireylerin vücut sıvılarıdır. İnsan vücut sıvılarından kan, semen ve tükürük bulaşmada en önemli araçlardır. Doğrudan kandan türeyen eksüda, plevra ve periton sıvıları gibi vücut sıvıları serumda bulunan düzeylere benzer oranda virüs içerirler. Semen ve tükürüğün virus yoğunluğu aynı bireyin serumundakine göre 10^3 daha azdır. İdrar, dışkı, süt, ter, gözyaşı, vajinal salgı, beyin omirilik sıvısı ve kordon kanı potansiyel olarak enfeksiyöz kabul edilmekle birlikte bu sıvılarda virüs yoğunluğu çok düşüktür (2,7).

HBV başlıca enfekte vücut sıvılarının perkütan ya da permukozal temasıyla (parenteral temas), enfekte kişilerle cinsellik içermeyen yakın temasla (horizontal), cinsel temasla ve enfekte anneden bebeğe perinatal (vertikal) yolla bulaşır. Tablo 1’de bulaşma yollarına göre risk grupları özetlenmiştir (12).

Tablo1. HBV İnfeksiyonunun Bulaşma Yollarına Göre Risk Grupları

<p>Parenteral (perkütan) bulaşma</p> <ul style="list-style-type: none"> ●Çoğul transfüzyon yapılan hastalar ●Hemodiyaliz hastaları ●Tıbbi aletlerin kullanımı (endoskopi, yapay solunum cihazı, vb.) ●Damar içi uyuşturucu bağımlıları ●Dövme (tatuaj) yaptıranlar ●Sağlık personeli 	<p>Cinsel temasla bulaşma</p> <ul style="list-style-type: none"> ●Erkek eşcinseller ●HBV taşıyıcılarının cinsel partnerleri ●Fahişeler ●Çok partnerli heteroseksüeller
<p>Perinatal-vertikal bulaşma</p> <ul style="list-style-type: none"> ●HBV taşıyıcısı annenin bebekleri 	<p>Horizontal bulaşma</p> <ul style="list-style-type: none"> ●Sosyoekonomik düzeyin düşük ve hijyen şartlarının kötü olduğu topluluklar ●Anaokulu, kreş, yurt, kışla ve hapishane v.b. topluluklar ●Mental özürülüler

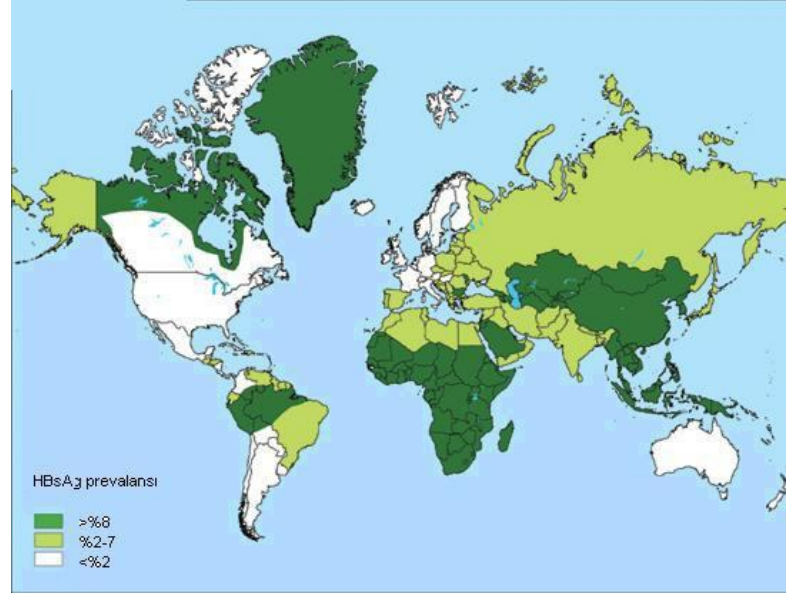
2.1.3.2. Hepatit B Virüsünün Prevalansı

Dünyada yaklaşık 2 milyar insan HBV ile karşılaşmış olup seropozitifdir. 400 milyon kişinin kronik HBV enfeksiyonlu, bunların yaklaşık %7-30'unun da HBV varyantları ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. HBV enfeksiyonu dünya genelinde yılda 500.000-1.200 000 ölüme neden olup, Asya, Afrika ve Pasifik kıyılarında en önemli 3 ölüm nedeninden biridir.

Türkiye'de 3.5 milyon insan HBV ile enfektedir. Ülkemizde HBV; kronik hepatitlerin etyolojisinde %56,4 oranında, karaciğer sirozunun ve hepatosellüler

karsinomun etyolojisinde ise sırasıyla % 45,9 ve % 42 oranında rol aldığı bildirilmiştir (6).

HBV enfeksiyonunun dünyadaki dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılık gösterir (Şekil 3). Bu bölgeler; HBsAg ve anti-HBs pozitifliği oranları, enfeksiyonun alınma yaşı ve virüsün en sık hangi yolla bulaştığı göz önünde bulundurularak düşük, orta, yüksek endemisite olarak sınıflandırılmıştır (24,25).



Şekil 3. Dünyada HBsAg prevalans haritası

Türkiye %6 (%3.9-12.5) prevalansla orta düzey endemik bölgeler arasında yer almaktadır. HBsAg pozitifliği en yoğun Güneydoğu bölgemizde bildirilmiştir. Ülkemizde yapılan epidemiyolojik çalışmalar HBV'nin çocukluk ve gençlik çağında aile veya toplum içinde horizontal yolla alındığını, 18-20 yaşlarında da toplumun taşıyıcılık oranına ulaştığını göstermektedir(24).

2.3.Patogenez

HBV enfeksiyonu sırasında virüsün karaciğerde direk sitopatik bir etki yapmadığı bilinmektedir. Farklı klinik yanıtın ortaya çıkmasında virüse ait

parametreler ile immün yanıtı etkileyen konağa ait parametreler arasındaki dengenin etkili olduğu düşünülmektedir (Tablo 2) (25).

Tablo 2. HBV Enfeksiyonunda klinik sonuçları etkileyen parametreler

Viral parametreler	İmmün yanıtı etkileyen konağa ait parametreler
<ul style="list-style-type: none"> ● İnokule olan virüs miktarı ● Viral replikasyonun kinetiği ● Viral yayılım yeteneği 	<ul style="list-style-type: none"> ● Enfeksiyonun kazanılma yaşı ● Genetik faktörler

Konağın HBV'e karşı geliştirdiği immün yanıt, karaciğerde oluşan hasarın ve virüsün elimine edilmesinin temel nedenidir. HBV enfeksiyonu süresince immün sistemin pek çok kolu harekete geçer.

2.1.4.1. Doğal İmmün Yanıt

Doğal immün sistem HBV enfeksiyonunun inkübasyon fazını takiben konak savunmasında ortaya çıkan ilk yanıttır. HBV enfeksiyonunun erken evrelerinde doğal immün yanıtlar; başlıca Toll-like reseptörler (TLRs) tarafından antijenlerin tanınması, tip 1 interferon sitokinlerinin salınması ve doğal öldürücü hücrelerin (Natural Killer, Natural Killer T ve invariant Natural Killer T) aktivasyonu ile ortaya çıkar (26).

Bu yanıtın oluşabilmesi için ilk aşamada multispesifik antijenlere göre doğal immün yanıtın daha fazla hedefi olan, "patojenle-ilişkili moleküler kalıplar" (pathogen-associated molecular patterns-PAMPs) olarak isimlendirilen ve mikroorganizmalarda korunmuş yapılar olarak bilinen komponentlerin (ssRNA, dsDNA, dsRNA vb.), hücre içinde yer alan "patojen tanıma reseptörleri" (pathogen recognition receptor-PRR) tarafından tanınması gerekir. PRR'ler doğal immün sistemin birçok efektör hücresi tarafından da sentezlenir. PRR'lerin; Toll-like reseptör(TLRs), mannoz bağlayıcı lektin (MBLs) ve peptidoglikan tanıma

reseptörleri gibi alt grupları vardır. TLRs 2, 4, 7 ve 9 HBV'nin doğal immün sistem tarafından algılanmasını sağlar(27,28).

Viral komponentler PRR'ler tarafından algılanınca hücre içinde proinflamatuvar nükleer faktör kappa B (NFκB) ve antiviral interferon (IFN) regülatör faktör 3 yolları aktive olur. Bu aktivasyon, tip 1 interferon yanıtının (IFN-α, -β, ve -γ) ve çeşitli proinflamatuvar mediatörlerin (TNFα, IL-1, IL-6) oluşmasına neden olur (27,28). İnterferonlar; viral antijenleri immün sisteme sunan MHC (Majör Doku uyum kompleksi - Major Histocompatibility Complex) sınıf I moleküllerinin ekspresyonunu arttırıp viral replikasyonu inhibe eden 2'5 A oligo adenilat sentetaz ve protein kinaz gibi proteinlerin ekspresyonuna yol açan ilgili genleri uyarırlar (29).

Doğal immün yanıtın sellüler kompartmanı içinde yer alan NK, NKT ve invariant NKT hücreleri, karaciğerde bulunan lenfositlerin %50'sini meydana getirir. Enfekte hücreleri MHC sınıf I ekspresyonu gerçekleşmeden çok önce tanırlar. IFNα/β, IL-12, IL-15, IL-7 ve glikolipid antijen tarafından aktive edilirler (30). Bu hücrelerin aktivasyonu; virüsle enfekte hücrelerin direkt ölümüne veya antiviral sitokinlerin (IFN-γ, TNF-α) üretimi ile birlikte hücre yıkımı olmaksızın viral replikasyonun inhibisyonuna neden olur. Ayrıca makrofaj, dendritik hücre, NK, B ve T lenfositleri invariant NKT hücreleri tarafından etkinleştirilir (31). Akut hepatit B enfeksiyonu olan hastalarda NK ve NKT hücrelerinin IFN-γ ve TNF-α üretimi, HBV replikasyon piki ile eşzamanlı gerçekleşirken, HBV spesifik T hücrelerinin ortaya çıkması viral pikin azalmaya başladığı 2.- 4.haftalarda gerçekleşir (32).

Yapılan çalışmalar HBV enfeksiyonu sırasında doğal immün yanıtların yeterli oluşmadığını desteklemektedir. Şempanze modelindeki akut HBV enfeksiyonu sırasında ortaya çıkan intrahepatik gen ekspresyon profili; HBV'nin adaptif immün yanıtlar oluşuncaya kadar sessiz bir virüs olarak etki ettiğini ve hücresel herhangi bir gen ekspresyonunu indüklemeden karaciğerde yayıldığını ortaya çıkarmıştır. HBV'nin relatif olarak doğal immün sistem tarafından fark edilmemesi virüsün replikasyon stratejisi olarak değerlendirilebilir (31). Bu stratejiyi destekleyecek şekilde akut HBV ile enfekte hastalarda enfeksiyonun prelinik fazında tip 1 interferon düzeyleri çok düşük saptanmıştır (33). HBV tarafından IFN yanıtlarının yeterli düzeyde uyarılmamasının sebebi; virüs replikasyonun nükleokapsid içinde meydana gelerek viral genomun hücresel PRR'ler tarafından algılanmamasıdır(34).

Doğal tip 1 IFN cevabının eksikliğine rağmen yetişkin hastaların çoğunda HBV enfeksiyonu kontrol altına alınabilmektedir. Çünkü HBV; Kupfer hücrelerini, NK ve NKT gibi doğal immün sistem hücrelerini aktive edebilmektedir. Sonuç olarak HBV tip 1 IFN yanıtlarından kaçabilmeyi başarmış olsada akut enfeksiyon sırasında doğal immün sistemin diğer kolları tarafından kontrol altına alınabilmektedir (27).

2.1.4.2. Adaptif İmmun Yanıt

Adaptif immün yanıt B ve T lenfositleri aracılığıyla gerçekleşir. Doğal immün yanıtların oluşmasından sonra indüklenir ve HBV tarafından kodlanan spesifik antijenik epitoplara hedefler. Primer enfeksiyon sonlandıktan sonrada reenfeksiyona karşı patojene spesifik koruyucu immüneyi sağlar (27).

Hüresel İmmun Yanıt

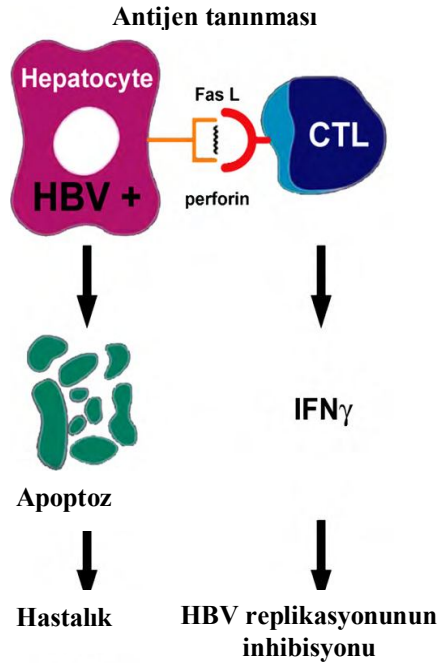
HBV spesifik T hücreleri akut, kronik ve iyileşme ile sonuçlanan HBV enfeksiyonunda inkübasyon fazından birkaç hafta sonra tespit edilir. T hücreleri sitokin profillerine göre tip 1 (IL-2, IFN- γ); tip 2 (IL-4, 5, 10 ve 13); tip 3 (transforming growth factor β [TGF β]); tip 0 (IFN- γ ve IL-4); Tr1 (IL-10) ve Th-17 (IL-17) olarak sınıflandırılabilirler (27).

CD4 T hücreleri; MHC sınıf II molekülleri ile sunulan ekzojenik peptid antijenleri tanır. MHC sınıf II molekülleri, özelleşmiş belirli immün hücrelerde (dendritik hücre, makrofaj, B lenfosit vb.) bulunurken hepatositlerde bulunmazlar. Bu nedenle CD4 T hücreleri hepatositler tarafından aktive edilmezler (27). Yapılan çalışmalar HBV enfeksiyonu sırasında profesyonel antijen sunan hücreler tarafından aktifleştirilen erken CD4 T hücre yanıtlarının CD8 T (sitotoksik T lenfosit) lenfositlerin indüklenmesinde anahtar rol oynadığını göstermiştir (31).

Akut HBV enfeksiyonu sırasında HBcAg için güçlü CD4 T hücre yanıtı oluşurken HBsAg için daha zayıf bir yanıt meydana gelir. Ayrıca Th (yardımcı =helper) yanıtları B lenfositlerinin anti-HBs üretimini indükler. Ancak HBsAg için oluşan Th yanıtı zayıf olduğundan indükleme HBcAg için oluşan Th hücreleri tarafından gerçekleşir(29). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, hastalarda virüsün saptanabilir düzeylere ulaştığı anda veya öncesinde eş zamanlı gelişen erken HBV

spesifik CD4 T hücre yanıtlarının klinik iyileşme ile ilişkili olduğunu desteklemektedir(31) . Sonuç olarak antiviral immün yanıtların CD4 T hücreleri tarafından regüle edildiği düşünülmektedir(27).

HBV enfeksiyonu sırasında gelişen karaciğer hasarının patogenezinde ve virüsün eliminasyonunda HBV spesifik CD8 T hücre yanıtları konağa ait en etkin savunma sistemini oluşturur. CD8 T hücreleri endojen olarak sentez edilen peptid antijenlerini birçok hücrede ve hepatositlerde bulunan MHC sınıf I molekülleri aracılığıyla tanır (27). HBV spesifik CD8 T hücreleri tarafından HBV'nin birçok bölgesi hedeflenebilirken baskın yanıt, virüsün kontrolü ile ilişkilendirilmiş HBV kore antijeni içindeki HLA -A2 ile sınırlı epitopa (HBc18-27) karşı gelişir (35). CTL yanıtları Th1 yönünde polarize olmuş hücreler tarafından sentezlenen sitokinler ile özellikle IL-2, IL-12, IL-18 ve IFN- γ tarafından stimule edilir (29). Stimule olan HBV spesifik CD8 T hücreleri enfekte hepatositler üzerine iki yönlü bir mekanizmayla etki eder (Şekil 4).



Şekil 4. HBV spesifik CD8 T hücrelerinin hepatositler üzerindeki çift yönlü etkisi

Sitopatik ve nonsitopatik etki viral klirens için en önemli basamaktır. CTL'ler hepatosit membranı ile etkileşime girerek hepatosit apoptozunu indüklerken sitokin salınımı (IFN- γ) ile de viral replikasyonu inhibe ederler. IFN- γ salınımı ile

hepatositlerde HBV RNA içeren kapsidlerin sitoplazmada ve proteozomlarda toplanması engellenir. Viral nükleokapsidler hepatosit sitoplazmasından uzaklaştırılır ve viral RNA'lar nükleus içinde destabilize edilir (31). Sitopatik etki ise CTL membran yüzeyindeki FasL geninin aktive olup çoğalmasıyla başlar. Artmış FasL hepatosit yüzeyindeki Fas ile bağlanır ve apoptoz indüklenir. Apoptozdaki ikinci yol ise Perforin/granzim ile meydana gelir. CTL'nin uyarılması ile perforin içeren granüllerde sekresyon meydana gelir. Açığa çıkan perforin hepatosit membranında porlar açarak granzimin içeri alınmasına ve hücreyi apoptoza götürecektir kaspaz (proteaz) kaskadının aktive olmasına neden olur (30). Sonuç olarak güçlü poliklonal ve multispesifik CTL yanıtlarının HBV enfeksiyonunda viral klirens ve klinik iyileşme ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Humoral İmmün Yanıt

HBV enfeksiyonunda B Lenfositler, immünglobulin üretmek için Th2 yönünde polarize olmuş hücreler tarafından aktive edilirler (36). Buna karşın HBcAg'i, T hücrelerinden hem bağımlı hem de bağımsız olarak virüs spesifik B lenfositlerini indükleyerek anti-HBc antikorlarını oluşturabilir (37).

HBV'e spesifik antijen ve antikorlar HBV enfeksiyonunun farklı evrelerinde ortaya çıkarlar (36). HBV'nün hücreden hücreye yayılımını antijenlerle kompleks oluşturup dolaşımdan uzaklaştırarak veya kompleman sistemini aktive edip hücre lizisini indükleyerek sağlarlar (37). Akut HBV enfeksiyonu sırasında C1q ve C3 metabolizmasının artması kompleman sisteminin etkisini göstermektedir (29). Bu mekanizmanın CTL yanıtına göre HBV enfeksiyonunun rezolüsyonuna daha az katkıda bulunduğu çünkü nötralizan antikorların HBV enfeksiyonunun daha geç evrelerinde ortaya çıktığı düşünülmektedir (37). Dolayısıyla nötralizan antikorların HBV enfeksiyonunun rezolüsyonundan sonra geride kalan az sayıdaki enfekte hücreden virüs yayılımını engellediği daha muhtemeldir (31).

Sonuç olarak hepatit B virüsü sitopatik etki göstermemektedir. Aşamalı olarak ortaya çıkan doğal ve immün yanıtlar virusun klirensi ile beraber hepatosellüler zedelenmenin başlıca nedenidir.

2.1.4.3. Karaciğer Hasarının İmmünopatogenezi

Karaciğerin non-inflamatuvar koşullar altında immünotoleran bir organ olduğu görüşü hakimdir. Çünkü antijen sunan hücrelerin fonksiyonlarını düzenleyen ve T hücrelerini baskılayan IL-10 ve TGF- β gibi sitokinler karaciğerde lokal olarak üretilmektedir (34). HBV enfeksiyonunda virüsün çeşitli komponentleri ile tetiklenen konakçının immün cevabı hepatosellüler hasara yol açmaktadır. Bu süreçteki ilk adım CTL'ler tarafından antijenlerin tanınması ve hepatosit apoptozunun indüklemesidir (30). Hepatosit apoptozu; Fas, TNF- α reseptör -1 ve TNF ilişkili apoptozu-indükleyen ligand-1 (TRAIL-1) reseptörü gibi farklı ölüm reseptörlerinin HBV ile enfekte hepatositler üzerinde açığa çıkması ve HBV spesifik CTL'ler tarafından salınan ilgili ligandların bu reseptörlere bağlanması ile gerçekleşir (29). Apoptotik hepatositlerden ve virüs spesifik CTL'lerden oluşan nekroinflamatuvar odak formasyonuna birçok inflamatuvar hücrede katılır. Lökositlerin toplanması kemokin bağımlı bir basamaktır. Polimorfonükleer hücreler (PMN); CTL'ler tarafından antijenlerin tanınması ile birlikte enfekte dokuda ilk toplanan hücrelerdir. PMN'ler tarafından üretilen matriks metalloproteinazları ise antijen non-spesifik mononükleer hücrelerin toplanmasını sağlar (30).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, trombositlerin CTL'ler tarafından indüklenen hepatosellüler hasarda rol alabileceği ileri sürülmüştür. Karaciğer içinde bulunan nekroinflamatuvar odakta trombosit kümeleri tespit edilmiştir. Trombositlerin selektif olarak azaltılması intrahepatik HBV spesifik CTL'in azalmasına ve hepatosellüler hasarda sonlanmaya neden olmuştur (30).

HBV enfeksiyonuna karşı etkili bir konak savunması için immün sistemin doğal ve adaptif kollarının birbirleriyle entegre şekilde çalışması şarttır. Eğer bu sistemde bir aksama gerçekleşir ise akut yanıt yetersiz kalır ve enfeksiyon kronikleşir, optimal düzeyden az olan inflamatuvar yanıt sebebiyle de hepatik fibrosiz aktive olur.

2.1.4.4. Hepatit B Virüs Enfeksiyonunda Doğal Seyir

Virüsün hepatosite girmesinden sonra immünolojik yapıların belirlediği dört evre gelişir.

Evre 1 (İmmüntoleran Faz): Viral replikasyon gerçekleşmesine rağmen immünotolerans nedeniyle hepatosellüler hasar ortaya çıkmaz. HBsAg, HBeAg ve HBV-DNA yüksek titrelerde saptanırken, transaminaz seviyeleri normaldir. Sağlıklı erişkinlerde bu evre iki-dört hafta sürerken vertikal yolla enfeksiyonu alan çocuklarda yıllarca sürebilir.

Evre 2 (İmmünklirens Faz): İmmün sistemin viral replikasyonu kontrol etme dönemidir. Th1 yanıtları baskın olmakla birlikte IFN- γ , IL-2 ve TNF- α gibi sitokinler yüksek miktarda salgılanmaktadır. Karaciğerde nekroinflamatuvar olaylar oluşur ve klinik belirtiler ortaya çıkar. HBsAg, anti-HBc IgM/IgG pozitif ve transaminazlar yüksektir. Bu evre üç şekilde sonlanabilir:

- 1.HBV enfeksiyonunun tam rezolüsyonu
- 2.HBsAg inaktif taşıyıcılığı
- 3.Kronik aktif hepatit

Erişkin hastaların çoğunda immünaktif faz üç-dört hafta sürerken, kronik taşıyıcılar 10 yıldan uzun bir süre bu evrede kalabilir. Hastalık siroz ve hepatosellüler karsinom ile sonuçlanabilir.

Evre 3 (Non-replikatif Faz): Konağın güçlü immün yanıtına karşı viral replikasyonun belirgin azalması ile başlar. Serumda HBeAg kaybolur ve anti-HBe serokonversiyonu gözlenir. Hepatosit genomuna entegre olan S geni nedeniyle HBsAg bir süre daha pozitif kalır. İmmün yanıtların azalması nedeniyle karaciğer inflamasyonunda azalmıştır.

Evre 4 (İmmunite fazı): HBsAg'e karşı anti-HBs oluşması ile konağın koruyucu immün yanıtı gelişmiştir. HBsAg kaybolmuştur. Duyarlı testlerle HBV DNA serumda tespit edilemez, ancak halen hepatositlerde bulunabilir (38, 39).

Hepatit B enfeksiyonunun immünoklirens fazından sonra bazı hastalarda inaktif taşıyıcılık veya kronik hepatit gelişmesinin mekanizması tam olarak

bilinmemektedir. Konağa ve virüse ait bazı faktörlerin HBV persistansına neden olabileceği düşünülmektedir.

2.1.4.5. Hepatit B Virüs Persistansının Fiziopatogenezi

A.Viral Faktörler

1.Viral inokulasyon miktarı

Yakın zamanda yapılmış çalışmalar inoküle olan HBV miktarının virüsün yayılma kinetiğini ve gelişen immünolojik yanıtları etkilediğini göstermiştir(40). Şempanze modelinde; 10^4 ve 10^1 genom eşuvalan aralığındaki virüs dozunun konak-virüs etkileşimini virüsün persiste etmesi yönünde değiştirdiğini ve buna karşılık yüksek dozların viral eliminasyonu sağladığı tespit edilmiştir (31).

2. Viral peptidlere bağlı immüntolerans

HBV enfeksiyonunun başlangıcında, TLR'ler aracılığıyla doğal immün yanıtın tetiklenmesine neden olan MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein 88) sinyal iletim molekülünün ekspresyonunun virüs tarafından engellenmesi viral persistansla ilişkilidir. Konak için tehlike göstergesi olan bu sinyallerin eksikliği, IFN sisteminin aktive edilmemesi ve antijen prezentasyonunun viral antijenlere karşı tolerans veya anergi gelişimini indüklemesi ile sonuçlanır.

HBsAg'i yüksek serum düzeylerinde tolerojen bir molekül gibi davranarak enfekte hepatositlerin immünojenik olarak elimine edilmesine engel olur. Kronik olarak enfekte hastalarda HBsAg spesifik CD8 T hücre düzeyinin çok düşük olması veya hiç olmaması bunu desteklemektedir (31).

HBeAg; HBV enfeksiyonu veya replikasyonu için gerekli değildir. Ancak HBeAg'e ve HBcAg'e spesifik CD4 T hücrelerinin azalmasına neden olarak immün yanıtları regüle edebilir. Bu regülasyon, enfekte hepatositlere karşı antikor gelişiminin ve CTL yanıtının azalmasına neden olarak HBV enfeksiyonunun kronikleşmesine katkıda bulunur (29). Ayrıca HBeAg varlığı, monositler üzerinde TLR2 ekspresyonunun azalmasına neden olarak TNF- α yapımını azaltabilir. Serokonversiyon (HBeAg→HBeAb) gelişmesiyle birlikte IL-4/IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin yapımının azaldığı, IL-12 ve IFN- γ düzeylerinde artış

olduğu ve CD8 T hücrelerinin fonksiyonlarını geri kazandıkları gösterilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmalar kronik HBV enfeksiyonunda HBeAg tarafından Th1 yanıtının değiştirildiğini buna karşın HBeAg kaybında hepatosellüler hasarla sonuçlanan güçlü CD4 ve CD8 T hücre yanıtlarına neden olduğunu göstermiştir.

NK hücreleri TRAIL-1 aracılığıyla HBV ile enfekte olmuş hepatositleri yok eder. HBcAg'nin fazla miktarda ekspresyonu TRAIL ile indüklenen hepatosit apoptozunu azaltarak kronik hepatit gelişimine katkıda bulunur (32).

HBV X protein ise transkripsiyonel bir transaktivatördür. Aşırı miktarda sentezlenmesi sellüler proteozom aktivitesini inhibe ederek antijen işlenmesini ve sunumunu engelleyebilir (31). Bununla birlikte yakın zamanda yapılmış bir çalışma HBx proteininin NF- κ B'nin (DNA transkripsiyonunu kontrol eden protein kompleksi) durumuna göre hepatosit içinde pro-apoptotik veya anti-apoptotik olabileceğini göstermiştir (41).

3.Viral kaçış mutasyonları

HBV'nin genetik heterojeniteye neden olan replikasyon mekanizması (revers transkriptazı) yüksek mutasyon oranına sahip 'quasispecies' denilen alt türlerin oluşmasına neden olabilir. Bu türlere bağlı olarak ortaya çıkan; Th, CTL veya antikor tanıma epitoplarındaki viral kaçış mutasyonları, virüsün konak tarafından tanınmasını ve elimine edilmesini engelleyebilir (29). Kronik hepatit B hastalarında HBV genomundaki 1896. nükleotidde meydana gelen mutasyon sonucu Guanin-Adenin değişimi nedeniyle prekor proteinin sentezinin gerçekleşmemesi serokonversiyona sebep olur ki bu immunogenetik seleksiyonun en iyi kanıtıdır (37).

B.Konakla ilişkili faktörler

1.Adaptif immun yanıtların bozulması

HBV spesifik CD8 T hücrelerinin kollapsı kronik hepatit B ile ilişkili olarak gösterilmiş en dikkat çekici immün yanıttır. Yakın zamanda yapılmış bir çalışmada pro-apoptotik protein olan Bim'in (Bcl 2 interacting mediator of cell death) kronik hepatit B hastalarında arttığı ve HBV spesifik CD8 T hücrelerinin azalmasına yol açtığı ileri sürülmüştür (42).

Kronik hepatit B hastalarında görülen diğer bir ortak karakteristik özellik HBV spesifik T hücrelerinin tükenmesidir. Tükenme genel olarak IFN- γ üretme

yeteneğinde azalma, stimülasyonu takiben çoğalamama veya sitolitik özelliğın kaybolmasını içerir.

HBV spesifik CD8 T hücre tükenmesinin altında yatan mekanizmaların tam olarak anlaşılmaması ile birlikte dendritik hücre fonksiyonlarında bozulma, Regülatör T (Treg) hücrelerinin anormal artışı ve inhibitör-kostimulatör sinyal yollarının aktivasyonu sorumlu mekanizmalar olarak görünmektedir (32).

Dendritik hücreler (DC) profesyonel olarak antijen sunan hücrelerdir. Antijene spesifik T hücrelerini uyarırlar ve potansiyel sitokin üretimi yaparlar. Dolaşımda bulunan iki major DC popülasyonunu miyeloid DC (mDC) ve plasmosit DC (pDC) oluşturur. mDC'ler Th1 yanıtlarını arttırıp, IL-12 ve IL-15 ile NK hücrelerini uyarırlar. pDC'ler IFN- γ üreterek antiviral ve immünmodulatör etki gösterirler. Her iki DC popülasyonunda karaciğerde bulunur (36). Yapılan çalışmalarda kronik hepatit B enfeksiyonu olan hastalarda DC'lerin fonksiyonlarının bozulduğu ve bu durumun spesifik T hücre yanıtlarını suprese ederek viral persistansı güçlendirdiği gösterilmiştir (32).

Treg hücreleri timik orjinli olup CD4 T hücrelerinin bir alt grubunu oluştururlar. HBV spesifik T hücrelerinin proliferasyonlarını ve fonksiyonlarını inhibe ederek viral klirensi sınırlandırırlar. Yapılan çalışmalarda kronik hepatit B enfeksiyonu olan hastalarda Treg hücrelerinin arttığı gösterilmiştir (34).

HBV spesifik T hücrelerinin aktivasyonundaki ilk basamak T hücre reseptörlerinin kendi peptidleri ile etkileşimidir. Bununla beraber, T hücrelerinde eksprese edilen ekstra reseptörler aracılığıyla oluşan kostimulatör sinyaller HBV spesifik T hücre yanıtlarının niteliğini belirler. Programlanmış hücre ölüm reseptörü 1 (PD-1) adı verilen yapılar ligandları (PD-L1) ile bağlandığında T hücrelerinin proliferasyonu ve sitokin sekresyonu inhibisyona uğrar (36). Yapılan çalışmalarda kronik hepatit B enfeksiyonunda yüksek antijen düzeylerine maruz kalarak tükenen HBV spesifik T hücrelerinde PD1 reseptörlerinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca bu reseptörlerin blokajı HBV spesifik T hücrelerinin efektör fonksiyonlarını yeniden kazanmasını sağlamıştır (36,43).

Yakın zamanda yapılmış iki çalışmada mannoz bağlayıcı lektin (MBL) ile kronik hepatit B enfeksiyonu arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. MBL doğal immün sistemde PRR olarak fonksiyon gösterir. MBL düzeyinin düşük olduğu hastalarda

viral persistansın, karaciğer fibrozisinin ve hepatosellüler karsinomun daha sık geliştiği bulunmuştur. İn vitro olarak da MBL'nin doz bağımlı olarak HBsAg'nini bağladığı gösterilmiştir (44, 45).

2. Serum faktör (Solübl Faktör)

Bazı çalışmalarda kronik hepatit B enfeksiyonu olan hastaların serumlarında T lenfositler tarafından üretilen ve selektif olarak B lenfositlerin anti-HBs üretimini suprese eden maddeler tespit edilmiştir. Solübl faktör olarak isimlendirilen bu moleküllerin HBV enfeksiyonunda kronikleşme ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (29).

3. Anti-idiotip yanıt

Anti-idiotip olarak isimlendirilen moleküller, antikorların değişken bölgelerine karşı sentezlenen antikorlar olup immün yanıtın sınırlandırılmasını veya arttırılmasını sağlarlar. Yapılan bir çalışmada HBV enfeksiyonunun persiste ettiği hastaların %70 ile %80'de anti-idiotip antikorlara rastlanmıştır. Bu veriler immün yanıtların anti-idiotipik modülasyonunun viral persistansı belirleyici bir faktör olduğunu desteklemektedir (29).

4. Cinsiyet ve hormonal faktörler

Yetişkin yaşlarda HBV ile karşılaşan bireylerde kronikleşme kadınlara göre erkeklerde daha sıktır. Bunun sebebinin hormonal olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda HBV genomu içinde glukokortikoidlere duyarlı bir maddenin bulunduğu, diğer çalışmalarda ise HBsAg gen ekspresyonunun seks steroidleri ve glikokortikoidler tarafından regüle edildiği gösterilmiştir (29).

5. Genetik Duyarlılık

HBV enfeksiyonu ile ilişkili olarak yapılan çalışmalar klinik sonuçların konağın genotipik özellikleri tarafından belirlendiğini desteklemektedir. Bir dizi çalışmada HBV enfeksiyonunun kronikleşmesi ile ilişkili olan polimorfizimler tespit edilmiştir. MHC sınıf II alelleri DRB1*1302, DRB1*02 ve DRB1*04 HBV enfeksiyonunun persistansında direnç ile ilişkili bulunurken, DRB1*07 persistansa duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir (29).

2.1.5. Klinik

2.1.5.1. Akut Hepatit B Enfeksiyonunda Klinik

Akut HBV enfeksiyonunun inkübasyon periyodu 60-180 gündür. Klinik bulgular enfeksiyonun alındığı yaş, virüsün genetik yapısı, eşlik eden bir başka heterotropik virüs enfeksiyonunun varlığı ve konakçının immün durumu gibi pek çok sebebe bağlı olarak değişiklik gösterir.

Akut hepatitin başlangıç semptomları nonspesifiktir. Halsizlik, yorgunluk, iştahsızlık, bulantı, kusma ve sağ üst kadranda künt ağrı en belirgin semptomlardır. Preikterik dönem olarak bilinen bu evre 3-10 gün sürer. İkterik döneme geçişle birlikte bu bulgular düzelirken sarılık, hafif kaşıntı, idrar renginde koyulaşma ve dışkı renginde açılma gözlenir. Fizik muayenede nonspesifik bulgulara rastlanabileceği gibi sarılık, hassasiyetin eşlik ettiği hepatomegali (%10), splenomegali (%5) ve lenfadenopati (%5) saptanabilir.

Akut hepatit B enfeksiyonu erişkin hastalarda çoğunlukla iyileşme ile sonuçlanır. Uzamış klinik seyirde hepatit D virusu ile koenfeksiyon ve kronikleşme hatırd tutulmalıdır. Fulminan hepatit akut HBV enfeksiyonunun seyri sırasında diğer olası bir durumdur. %0,1 civarında görülebilen bu klinik tabloda ikter başladıktan sonra 2 hafta içerisinde veya semptomları takiben ilk 8 hafta içerisinde gelişen hepatik ensefalopati fulminan hepatitin ilk bulgusu olabilir (38).

2.1.5.2. Kronik Hepatit B Enfeksiyonunda Klinik

Akut enfeksiyon sonrası altı aydan uzun süreli HBsAg pozitifliği kronik hepatit B'nin göstergesidir. Bağışık sistemi yeterli olan erişkinlerle kıyaslandığında (\leq %1) perinatal veya çocukluk döneminde alınan enfeksiyonun kronikleşme olasılığı (sırasıyla %90 ve %20-30) son derece yüksektir (39).

Kronik hepatit B genellikle sessiz bir hastalıktır. Tanı, donör olarak kan verme veya rutin kan tetkikleri sırasında tesadüfen HBsAg pozitifliğinin bulunması ile konur.

Kronik hepatit B’de en sık görülen semptom yorgunluk ve halsizliktir. Beraberinde özellikle akut alevlenmeler sırasında iştahsızlık, bulantı, üst karın bölgesinde rahatsızlık hissi ve kas-eklem ağrısı gibi nonspesifik şikayetler bulunabilir. Ayrıca hastalarda anksiyete başta olmak üzere uyku bozukluğu ve depresyon görülebilir (5).

Kronik hepatit B enfeksiyonunun en önemli komplikasyonları sırasıyla hepatorenal sendrom, siroz ve hepatosellüler karsinomdur. Olguların %15-20’de 5 yıl içerisinde siroz, sirozlu hastaların da %20’de hepatosellüler karsinom saptanır. HBsAg kaybının görülme olasılığı ise yılda %1-2 civarındadır (38).

2.1.5.3. Laboratuvar Bulguları

Akut HBV enfeksiyonunda laboratuvar testleri genellikle normaldir. Bazen orta derecede azalmış hemoglobin ve hematokrit değerlerine rastlanabilir. Lökosit sayımında granülositopeni ve relatif lenfositoz olabilir. Serum total bilirubini %10 düzeyini geçmez (46).

Akut viral hepatitin esas göstergesi serum transaminaz seviyelerindeki hızlı artıştır. Transaminaz artışı semptomlar başlamadan önce meydana gelir ve semptomların birinci haftasında en yüksek düzeye ulaşır. ALT artışı AST’den daha yüksektir. Alkalen fosfataz düzeyleri hafif artabilir veya normaldir. Serum albumin, globulin ve protrombin zamanı genellikle normal olup fulminan hepatit gelişiminde protrombin zamanı 17 saniyenin üzerine çıkabilir (4).

HBV enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısında ise serolojik ve moleküler yöntemler kullanılır.

A. Serolojik tanı yöntemleri

HBV’nun serolojik tanısı, virüs tarafından kodlanan antijen ve bu antijenlere karşı konak savunma mekanizması tarafından oluşturulmuş antikorların saptanmasına dayanır. HBsAg’ye karşı anti-HBs, HBeAg’ye karşı anti-HBe ve

serumda serbestçe dolaşmayan HBcAg'ye karşı anti-HBc saptayabildiğimiz belirteçlerdir (47).

Akut HBV enfeksiyonu sırasında virüse ait ilk saptanan antijen HBsAg'dir. Semptomlar ortaya çıkmadan 3-5 hafta önce serumda saptanmaya başlar ve 3 ay sonra kaybolur. 6 aydan uzun süre pozitifliği hastalığın kronikleştiğini düşündürür. Serumda HBsAg ortadan kaybolduktan sonra genellikle üç ay sonra beliren anti-HBs antikorları iyileşmeyi ve kalıcı immüniteyi gösterir. Akut dönemde anti-HBs antikorlarının daha erken oluştuğu ancak HBsAg miktarının çok fazla olması nedeniyle oluşan immünkomplekslerin antikorları maskeleyiği düşünülmektedir. HBsAg'nin ortadan kaybolduğu ve anti-HBs antikorlarının ortaya çıkmadığı dönem pencere dönemi olarak adlandırılır. Akut HBV enfeksiyonu dışında hepatit B ile aşılama sonrası, hepatit B immünglobulin verilmesi, kan transfüzyonu veya anneden bebeğe pasif transfer ile de anti-HBs tespit edilebilir. (4, 46).

Aktif viral replikasyonun ve enfektivitenin göstergesi olan HBeAg, HBsAg'den birkaçgün sonra pozitif olur. ALT pikinden hemen sonra kaybolur, ancak 10 haftadan daha uzun bir süre serumda bulunursa kronikleşmenin bulgusu olarak değerlendirilir. HBeAg'nin kaybolması ile anti-HBe antikorları ortaya çıkar. Anti-HBe düşük enfektiviteyi ve hastalığın iyileşeceğini işaret eder. Ancak prekor bölgesinde mutasyon sonucu oluşan mutant suşların meydana getirdiği enfeksiyonda anti-HBe pozitif olmasına rağmen aktif viral replikasyon ve enfeksiyon tablosu devam etmektedir (47).

HBcAg erken dönemde hızla spesifik antikorları ile birleştiğinden serumda saptanması güçtür. Serolojik tanıda; HBsAg saptandıktan kısa süre sonra anti-HBs ortaya çıkmadan önce saptanan anti-HBc antikorları kullanılır. Anti-HBc Ig M ve G semptomlarla beraber ortaya çıkar. Anti-HBc Ig M 6-8 ay sonra tespit edilmezken, anti-HBc Ig G hayat boyu pozitif kalır. Anti-HBc Ig M antikorunun en önemli özelliği akut HBV enfeksiyonu için altın standart olarak kabul edilmesi ve pencere döneminde ölçülebilir tek belirteç olmasıdır. Diğer önemli özelliği ise kronik enfeksiyonun akut alevlenmeleri sırasında düşük titrede de olsa pozitifleşmesidir. Akut HBV ile kronik HBV'nin akut alevlenmesinin ayrımında anti-HBc Ig M'nin 7-8S formunun kronik enfeksiyonda, 19S formunun ise akut enfeksiyonda baskın olması önemlidir (48).

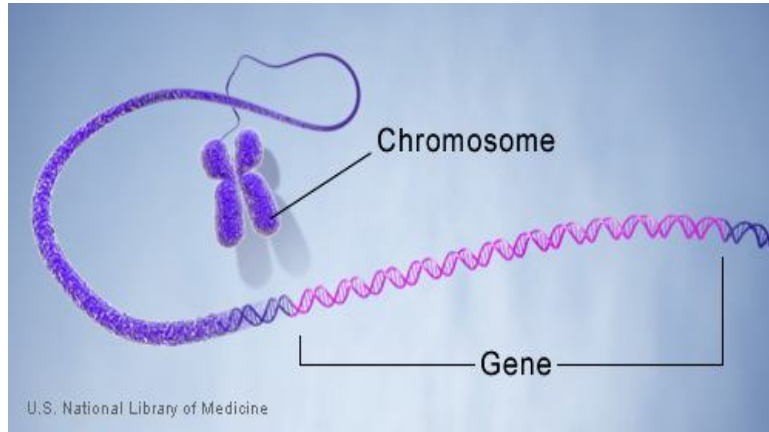
B.Moleküler tanı yöntemleri

HBV-DNA viral replikasyonun en hassas göstergesidir. HBV DNA testleri; erken tanıda, anti-viral tedavi etkinliğinin izlenmesinde, olağan dışı serolojik profillerin değerlendirilmesinde ve farklı HBV genotiplerinin saptanmasında son derece faydalıdır (47).

2.1.6. Genetik Varyasyonlar ve Polimorfizm

Genetik özelliklerimiz hücre çekirdeği içinde bulunan 23 çift kromozomda taşınır. İnsan genomunun yaklaşık 22000 civarında gen içerdiği bilinmektedir. Bu kompleks yapıya genom denir. Gen kalıtımın temel fiziksel ve işlevsel birimidir (49).

Her insan kromozomunda tek ve devamlı bir DNA çift sarmalı bulunmaktadır. Nukleustaki her kromozom, uzun, doğrusal (lineer) bir çift DNA molekülüdür. Bir kromozomdaki DNA molekülü bazik kromozomal proteinler olan histon proteinleri ve heterojen asidik non-histon proteinleri ile kompleks halinde bulunurlar. Fonksiyonel bir ürünü oluşturmak için gerekli olan kromozomal DNA dizisi "Gen" olarak tanımlanmaktadır. Bu ürün bir polipeptit veya fonksiyonel RNA molekülü olabilir (Şekil 5) (50).



Şekil 5. Kromozom-DNA-Gen ilişkisi

DNA; kimyasal olarak nükleotid olarak adlandırılan birimlerden oluşan 2 uzun polimer yapının sarmal oluşturmasıyla meydana gelir. Nükleotidler DNA'nın temel yapı birimidir. Şeker, fosfat ve baz gruplarından oluşur. Bazlar adenin (A), timin (T),

sitozin (C) ve guanin (G)'dir. Bu bazların yanı sıra atipik bazlar da DNA molekülünde bulunabilmektedir. DNA'da, nükleotidler bir iplik oluşturacak şekilde polimerler meydana getiriler. Bu iplikte her zaman adeninin karşısına timin, sitozinin karşısına guanin nükleotidi gelir. Genler; değişik sayılarda baz çiftinden meydana gelen özel dizilerdir. Bir gende ortalama 3000 nükleotid vardır. Sonuç olarak kromozomlar DNA'ları, DNA' lar da genetik özellikleri belirleyen genleri taşır (Şekil 6) (50, 51).



Şekil 6. Kompleks canlıdan en basit genetik moleküle geçişin şematizasyonu

Tüm insanların gen diziliminin %99'u birbirinin aynısıdır. Gen dizilimindeki %0,1'lik farklılık yani diğer adıyla genetik varyasyon, insanlar arasındaki çeşitliliğin nedenini açıklar.

Genetik varyasyonlar polimorfizimler ve mutasyonlar olarak iki ana grup altında ele alınır. Polimorfizimler mutasyonlardan popülasyonda daha yüksek varyant aleller olarak bulunmaları ile ayrılırlar. Mutasyonlar sıklıkla hastalık nedeni olarak değerlendirilirken polimorfizimler hastalıklara yatkınlık nedeni olarak değerlendirilirler (52).

Polimorfizimlerin DNA replikasyonu sırasında oluşan hatalar sonucu meydana geldikleri düşünülmektedir. Etnik ve coğrafi farklılıklar gösterirler. Genel olarak polimorfizimler 3 grupta incelenir (53).

1. Tek nükleotid polimorfizimleri
2. Mikrosatellit tekrarları
3. İnsersiyon ve delesyonlar

En sık görülen polimorfizm grubu Tek Nükleotid Polimorfizmidir (SNP-Single Nucleotide Polymorphism). Belirli bir baz pozisyonunda meydana gelen tek nükleotid değişiklikleridir. Tüm genetik varyasyonların %90'ını oluşturur. SNP'ler; hastalıklara yatkınlık ve ilaç etkinliği konularında major etkiye sahiptirler. Etki mekanizmaları iki başlık altında değerlendirilir:

- 1-Sessiz SNP'ler: Gen fonksiyonlarını etkilemezler. SNP'lerin çoğu bu gruba dahildir.

2-Protein fonksiyonunu etkileyen SNP'ler:

- **Direkt etki:** Aminoasit dizisini değiştirirler.
- **İndirekt etki:** Regülatör dizinin fonksiyonunu değiştirirler.

Popülasyonlar arasında görülen polimorfik varyasyonlar, hastalıklara karşı gelişen duyarlılık, direnç ve prognoz gibi parametreleri etkileyebilirler. Epidemiyolojik ve biyomedikal araştırmalar, farklı popülasyonlarda hasta bireyler ve sağlıklı kontroller arasında bulunan en sık polimorfizm tipi olan SNP farklılıklarını ortaya koymaktadır. Bu çalışmalar ile çeşitli hastalıklara özğü SNP profilleri belirlenmiştir. Günümüzde bu profiller kullanılarak hastalıklara yatkınlık taraması yapmak mümkündür (49).

SNP'lerin tespit edilmesinde moleküler yöntemler kullanılır. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction [PCR]) gibi nükleik asit amplifikasyonuna dayalı bir çok farklı teknik bu amaçla kullanılmaktadır.

2.1.7. Real-Time PCR

PCR, 1985 yılında Cetus adlı biyoteknoloji firmasında çalışan Kary Mullis adlı araştırmacı tarafından bulunmuştur (54).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, DNA'nın hedef bölgesinin in vitro çoğaltılması işlemidir. Bu teknik ile DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını yapmak mümkündür. PCR tekrarlanan 3 basamak şeklinde gerçekteşir.

-İlk basamak DNA'nın denatürasyonudur. 94-95°C'ye ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır (denatürasyon).

-İkinci basamak, primerlerin bağlanmasıdır (annealing). Ortama konmuş ve sadece çoğaltılmak istenen DNA bölgesine özgül iki primer, sıcaklığın (50-70°C'a) düşürülmesiyle, ilk basamakta ayrılmış olan kalıp DNA'nın özgül oldukları bölgelerine bağlanırlar.

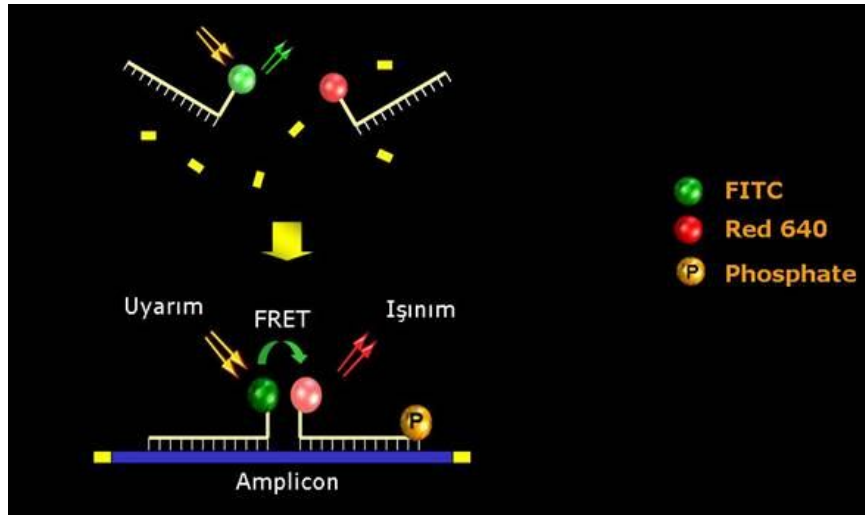
-Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır (sentez = extension). Ortama konmuş ve optimum sentez sıcaklığı 72-74°C olan *Thermus aquaticus* (*Taq*) polimerazı (ya

da ısıya dayanıklı başka polimerazlar) bu ısıda hedef DNA'ya yapışmış primerlerin 3' ucundan başlayarak istenen DNA bölgesinin sentezini yapar.

Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgül DNA parçası çoğaltılarak iki katına çıkarılmış olur. Yeni sentezlenen DNA da bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır ve bu DNA parçaları geometrik olarak artar (54).

Higuchi ve arkadaşları, oluşturdukları PCR ürünlerini tarayan bir sistem geliştirmişlerdir (55). Gen ifadesi analizini değiştiren bu metod ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngülerini sağlamak için kullanılan cihazların hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi Gerçek-zamanlı PCR (Real time PCR) olarak adlandırılan yeni bir yöntemin geliştirilmesini sağlamıştır. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen bu sistem yakın bir zamanda uygulamaya konulan popüler bir metoddur (56).

Gerçek-zamanlı PCR; floresan isaretili özgün probların kullanılarak floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle de hem kalitatif hem de kantitatif sonuçlar elde edilir (Şekil 7) (57).



Şekil 7. Hibridizasyon prob yöntemi ve FRET şematizasyonu

Gerçek-Zamanlı PCR Teknolojisinin Üstünlükleri

- Floresan boyalar sayesinde eş zamanlı olarak sonuçlar alınabilir. Her döngü sonunda oluşan ışınlar sayesinde bilgi eş zamanlı olarak ekrana yansır.

- Sonuç almak için ikinci bir tekniğe ihtiyaç yoktur (Agoroz jelde yürütme gibi). Real Time PCR teknolojisinde örnekler makineye yüklendikten sonra sonuç alınabilmektedir.
- Sonrasında gerekli olan teknikler nedeni ile konvansiyonel PCR'da havanın ısıtılıp soğutulmasına bağlı olarak 4-6 saat içinde işlem gerçekleşirken, Real Time PCR ile yaklaşık 40 dakika içinde sonuç alınabilmektedir.
- Kapalı bir sistem olmasından ve ikinci bir tekniğe ihtiyaç olmamasından dolayı kontaminasyon riski çok azdır.
- Diziye özgü mutasyonu yada normal diziyi tanıyan proplar kullanıldığından özgün olmayan ürün (hedef bölge) elde edilmez.
- Çok yüksek teknik duyarlılığa ve hassasiyete sahiptir (58, 59,60, 61).

Gerçek-Zamanlı PCR Teknolojisinin Sınırlamaları

- Kullanılan malzemelerin maliyetinin yüksek olması.
- Sadece bilinen mutasyonları taraması (61)

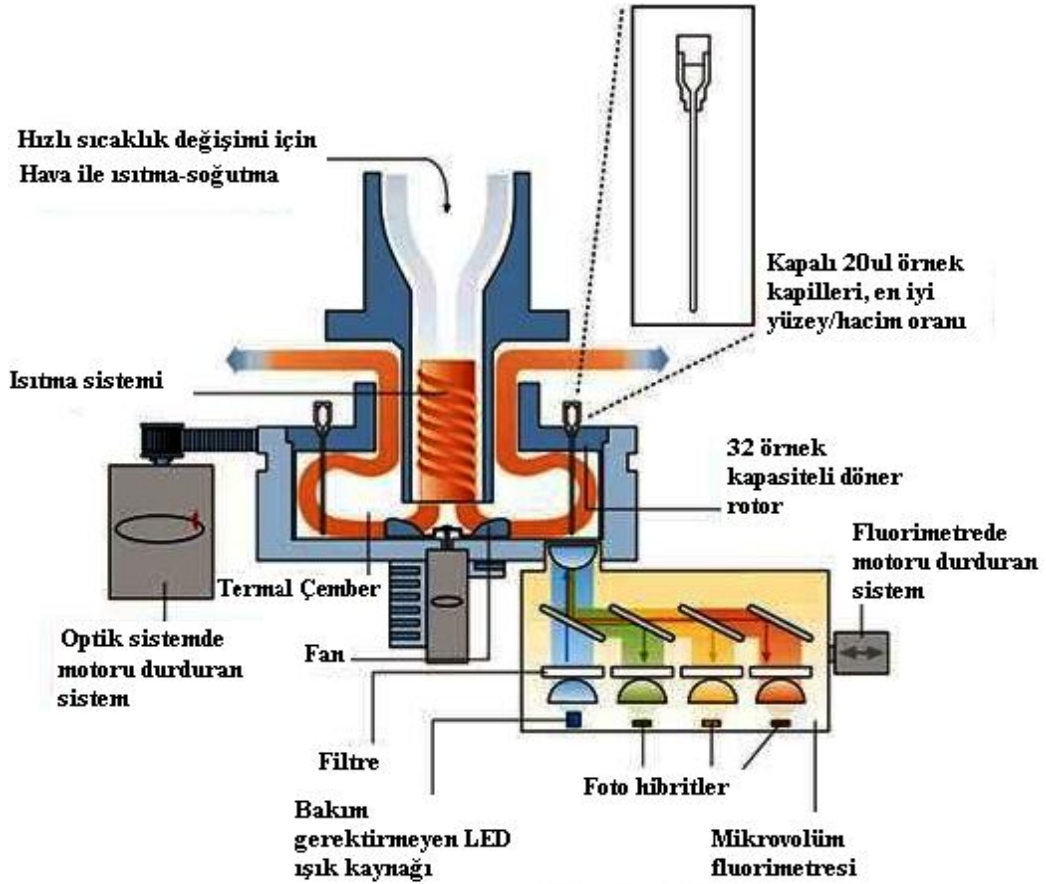
Araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan çeşitli real-time PCR cihazları mevcuttur. Bu cihazlar birbirlerinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile ayrılırlar (59).

Light Cycler Real-Time PCR Sistemi

Light Cycler Real-Time PCR Sistemi (Roche, Mannheim, Almanya) 32 örnekle çalışan eş zamanlı olarak sonuç gösteren bir cihazdır (Şekil 8). Sıcaklık döngülerini hava akımı sayesinde gerçekleştirir. 530, 640 ve 705nm olmak üzere üç farklı dalga boyunda ölçüm yapmaktadır (Şekil 9). Farklı floresan boyalar işaretlenerek farklı genlere aynı anda bakılabilmektedir. Floresan boyalar sayesinde PCR döngülerinin her birinin sonunda ekrana bilgi yansınmasıyla eş-zamanlı bir yöntemdir. Sıcaklık iletiminin eşit olarak dağıtılabilmesi amacıyla 20µl hacimli borosilikat kapiller tüpler kullanılır. Bu kapiller tüpler yüzey alanını genişleterek tepkime alanını artırır (60).



Şekil 8. Lightcycler Real –Time PCR Cihazı



Şekil 9. Light Cycler PCR cihazının kısımları

2.1.8. Sitokinler

Sitokinler; doğal ve adaptif immün yanıtların oluşumunda immün hücreler arasındaki etkileşimleri sağlayarak inflamatuvar yanıtları regüle eden peptid veya glikoprotein yapısındaki maddelerdir. Fizyolojik açıdan sitokinler hücreler arası mesaj ileten biyolojik mediatörler olarak tanımlanabilir. İlk sitokin 1957 yılında Isaacs ve Lindenmann tarafından keşfedilen interferondur (62).

2.1.8.1. Sitokinlerin Genel Özellikleri

- Çözünür peptid ve glikoprotein yapısında maddelerdir.
- 20 ile 30kD büyüklüğündedirler.
- Biyolojik olarak 10^{-10} ve 10^{-15} molar konsantrasyonlarda aktiftirler.
- Birçok farklı hücre tipi tarafından sentezlenebilir ve salınabilirler.
- Sitokin salınımı kısa, kendini sınırlayan bir olgudur ve öncül molekül olarak depolanmaz.
- Etkilerini otokrin (doğrudan salgılandığı hücre üzerinde), parakrin (salgılandıkları hücrenin çevresindeki hücreler üzerine) ve endokrin (sistemik) olarak gösterirler.
- Sitokinler pleiotropik (bir sitokinin farklı tip hücrelere etki edebilmesi), redundant (farklı sitokinlerin aynı etkileri gösterebilmesi), sinerji (birbirlerinin etkilerini artırabilmeleri) ve antagonist (birbirlerinin etkilerini azaltabilmeleri) etkiler gösterirler.
- Sentezlenmeleri ve hedef hücreleri etkilemeleri stimülasyonla (antijen vb.) olur.
- Sitokinlerin etkileri, hedef hücrelerdeki spesifik membran reseptörlerine bağlanmaları ile başlar.
- Sitokinlere verilen yanıtların çoğu hücrelerde yeni mRNA ve protein sentezini gerektirmektedir (63).

2.1.8.2. Sitokinlerin Sınıflandırılması

Sitokinler yapılarına ve fonksiyonlarına göre altgruplara ayrılırlar (64).

A. Hematopoietin ailesi

- IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-21
- IL-17 ailesi (IL-17 ve IL-25)
- Granülosit makrofaj koloni stimule edici faktör (GM-CSF)
- Granülosit koloni stimule edici faktör (G-CSF)

B. İnterferon ailesi

- Tip 1 interferonlar [IFN α , β , δ , κ , ω , ι , IL-28A (IFN λ 2), IL-28B (IFN λ 3) ve IL-29 (IFN λ 1)]
- İnterferon- γ
- İnterlökin-10
- İnterlökin-10 ailesi [İnterlökin -19, -20, -22, -24 and -26]

C. Beta Trefoil yapısındaki sitokinler

- İnterlökin-1 ailesi [IL-1F1, F2]
- İnterlökin-1 reseptör antagonisti [IL-1F3]
- İnterlökin-18 [IL-1F4]
- İnterlökin-1 ailesi [F5 -F10]
- Fibroblast büyüme faktörü (FGF)
- Hepatosit büyüme faktörü (HGF)

D. Tümör Nekroz Faktör ailesi

- Lenfotoksinler
- Tümör Nekroz Faktör

E. Tirozin Kinaz Reseptör ailesi

- Makrofaj koloni stimule edici faktör (M-CSF)
- Kök hücre faktörü
- Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)

F.Kemokinler

İlk iki sistein rezidüsünün pozisyonuna göre C, CC, CXC ve C3XC olmak üzere 4 gruba ayrılırlar.

C→Lenfotaktin (Th ler için kemotaktik)

CX→Makrofaj migrasyonunu inhibe eden faktör (MIP-1, MIP-2), Eotaxin

CXC→IL-8, Endothelial cell-derived neutrophil attractant-78 (ENA-78), Inducible protein 10 (IP-10)

C3XC→ Nörotaktin

G. Transforme Edici Büyüme Faktör (TFG) ailesi

- TGF
- İnhibin/aktivin ailesi
- Kemik morfogenetik proteinler

2.1.8.3. Sitokinlerin Etki Mekanizması

Sitokinler hücre yüzeyinde yer alan spesifik reseptörlere bağlanarak etki gösterirler. Tüm sitokin reseptörleri ekstrasellüler bölge ve sitoplazmik bölge olarak iki ana birimden oluşur. Sitokin reseptörleri beş grupta toplanabilir:

1. Tip I sitokin reseptörleri: Hematopoetin reseptörler olarak da isimlendirilirler. IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, GM-CSF, G-CSF tarafından kullanılırlar.

2. Tip II sitokin reseptörleri : Tip I reseptörler gibi 2 sisteinli bölge içeririler. IFN α/β , IFN γ ve IL-10 tarafından kullanılırlar.

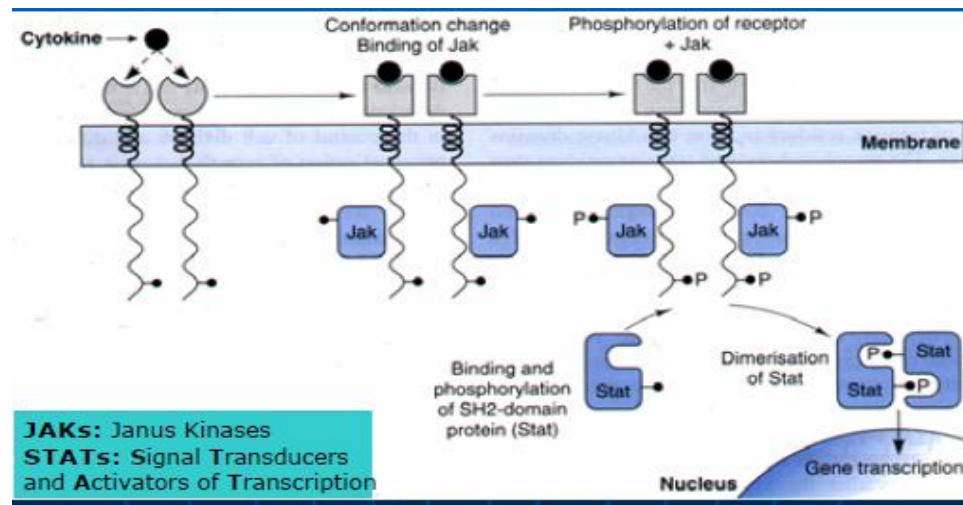
3. İmmunglobulin süper ailesi: Tip I ve II reseptörlerden farklı bir sinyal ileti sistemi kullanırlar. IL-1 ve M-CSF tarafından kullanılırlar.

4. TNF reseptörleri

5. Transmembran reseptörler: Serpentin reseptörler olarak da isimlendirilirler. Kemokinler tarafından kullanılırlar (63).

Sitokinler reseptörlere bağlandıktan sonra çeşitli sinyalizasyon yollarını aktive ederler. Otuzdan fazla sitokin, büyüme faktörü ve protein tarafından kullanılan JAK (tirozin rezidülerini fosforile eden kinaz[Just Another Kinaz]) - STAT (Sinyal İletici

ve Transkripsiyon Faktörleri [Signal Transducers and Activators of Transcription]) yolağı, son dönemlerde keşfedilmiş önemli sinyal yollarından biridir (Şekil 10). Günümüzde 4 farklı JAK ve 7 farklı STAT molekülü tanımlanmıştır. Birçok doku ve hücrede ekspres edilirler. Değişik sitokin gruplarının değişik STAT ve JAK'ları aktive ettikleri bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda STAT 1 defekti sonucu IFN cevabının kaybolmasının antimikrobiyal defansın zayıflamasına ve IFN direncinin ortaya çıkmasına neden olduğu anlaşılmıştır (65).



Şekil 10. Sitokin reseptörlerinin sinyal iletim mekanizmasının şematizasyonu.

Sitokinler enfeksiyon hastalıklarının patogenezinde önemli bir yere sahiptir. Sitokin cevabı optimum düzeyde oluşursa konak lehine aşırı veya yetersiz düzeyde oluşursa etken lehine sonuçlar ortaya çıkabilir (66).

HBV enfeksiyonunda immünoregülatör sürecin şekillenmesinde belirli sitokinlerin rolü olduğu düşünülmektedir. Antiviral cevabın indüklenmesinde merkezi bir role sahip olan CD4 T lenfositler salgıladıkları baskın sitokin profiline göre iki alt gruba ayrılır. Th1 hücreleri; IFN γ gibi ana fonksiyonu özellikle hücre içi mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlara karşı fagosit aracılı savunmayı uyarmak olan belli bir sitokin grubunu salgılayan hücrelerdir. Th2 hücreleri ise IL-4 ve IL-5 gibi ana fonksiyonu eozinofil/mast hücre aracılı immün reaksiyonları uyarmak ve Th1 hücrelerini baskılamak olan belli bir sitokin grubunu salgılayan hücrelerdir. HBV enfeksiyonunda Th1 sitokin (IL-2, IFN γ , TNF α) profili baskınsa viral

çoğalma etkin bir şekilde inhibe edilebilir ancak Th2 tip sitokinler (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13) baskınsa virüsün konakçıda kalması kolaylaşır ve hastalık kronikleşir. Sonuç olarak Th1 ve Th2 sitokin yanıtları arasındaki denge fibrozis veya siroz ile sonuçlanan inflamatuvar karaciğer hastalığında anahtar mekanizmadır (67, 68).

2.1.8.4. Hepatit B Enfeksiyonu ve Sitokin Polimorfizimi

Hücrel ve humoral immün yanıt ile yakından ilişkili olan HBV enfeksiyonunda immün yanıtı oluşturan sitokin profilinin, virüsün oluşturacağı hastalık tipini ve sonucunu belirlemede oldukça önemli olduğu bilinmektedir (69). Doğal sitokin yanıtını etkileyen ve bireyler arasında sitokin üretiminde ve/veya kapasitesinde varyasyonlara sebep olan esas faktör genetik varyasyonlardır (66). Bu kapsamda, sitokin gen polimorfizimleri enfeksiyon hastalıklarına duyarlılığı, hastalığın şiddetini ve klinik sonucunu etkileyen önemli bir mekanizmadır. HBV enfeksiyonu ile ilişkili sitokinler ve ilgili polimorfizimler birçok çalışmada değerlendirilmiştir.

TNF α ; monosit, makrofaj ve kupffer hücrelerinden sentezlenir. HBV replikasyonunu HBV mRNA'nın yıkımını arttırarak inhibe etmektedir. Birçok çalışmada -238. ve -308. pozisyondaki TNF α gen polimorfizimlerinin TNF α 'nın ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir. Araştırmacıların farklı coğrafik bölgelerde yaptıkları çalışmalarda, TNF α -308 A/G veya A/A genotipleri HBV enfeksiyonunda iyileşme ile ilişkili bulunup, TNF α -308 G/G genotipi ise kronik hepatit B için risk faktörü olarak değerlendirilmiştir (70, 71, 72).

IFN γ ; antiproliferatif ve antiviral etkili olup primer olarak lökositlerden salınır. IFN γ geninin +874. ve +2109. pozisyonlarındaki baz değişimi ile ilişkili polimorfizimlerin hepatit B enfeksiyonuna duyarlılıkta önemli bir risk faktörü olabileceğini gösteren çalışmalar vardır (73, 74).

IL-10; aktif Th2, CD8+T hücreler, β hücreler, monosit ve keratinositlerden salınır. Sıklıkla TGF- β ile uyumlu çalışarak aktif T hücrelerinden salınan sitokinleri inhibe ederler. Yapılan çalışmalarda IL-10'nun proksimal promotor bölgesindeki

-592., -627., -819., ve -1082.ci pozisyonlardaki polimorfizimlerin IL-10 üretimini etkilediği, dolayısıyla bu varyasyonlarla kronik hepatit B'ye ilerleyiş arasında ilişki olduğu rapor edilmiştir (69).

IL-17; 1993 yılında Rouver ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olup yeni bir T yardımcı hücre alt grubu olarak bilinen Th17 hücrelerinden salınan proinflamatuvar bir sitokindir. Hepatositlerde antiapoptotik molekülleri arttırarak ve sitotoksik T lenfositlerin hedef hücreleri yıkmasını engelleyerek HBV'nin varlığını devam ettirmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (75, 76, 77, 78).

IL-18; makrofaj ve keratinositlerden salınan IFN γ ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin salınımını arttıran bir sitokindir. Hepatit B virüsü'nü non-sitopatik olarak inhibe ettiği, IFN- α/β salınımını arttırarak ve intrahepatik NK hücreleri aktive ederek hepatit B virüs replikasyonunu önlediği bilinmektedir. Yapılan klinik araştırmalar, IL-18'in serum düzeyi ile hepatit B enfeksiyonunun şiddeti arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda birçok çalışma IL-18 geninin promotor bölgesinin -137. ve -607. pozisyonlarındaki polimorfizimlerin, kronik hepatit B enfeksiyonuna duyarlılıkla yakından ilişkili olduğunu rapor etmiştir (79, 80).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Çalışma Grupları ve Materyal

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği'ne başvuran ve hepatit B enfeksiyonu tanısını alan hastalar, çalışmanın olgu grubunu oluşturmuştur. Olgu grubu, serolojik durumları ve kronik hepatit B tanı kriterleri göz önüne alınarak “doğal bağışık”, “inaktif taşıyıcı” ve “kronik aktif hepatit” olarak gruplandırılmıştır. Hepatit B virüsü ile karşılaşmamış sağlıklı bireyler kontrol grubunu oluşturmuştur. Çalışmaya dâhil edilen kontrol ve olgu grubuna ait bireylerden alınan periferik venöz kan örnekleri, çalışma materyali olarak kullanılmıştır.

3.2. Genomik DNA Ekstraksiyonu

Çalışma grubunu oluşturan bireylerden antikoagulanlı tüplere alınan periferik venöz kan örneklerinden genomik DNA ekstraksiyonu, ticari kit yardımı ile (HighPure PCR Template Preparation Kit, Roche) yapılmış ve uygulama basamakları aşağıda verilmiştir:

- Antikoagulanlı tüplere alınan periferik venöz kan örneklerinden 200 µl kan örneği 1.5ml'lik steril ve DNA'az içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Örneklerin her birine, kitle birlikte sağlanan 200 µl Bağlanma Tamponu ve oda ısısında çözünmüş Proteinaz K eklendi.
- Örnekler 72°C' ye getirilen su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Her tüpe 100 µl isopropanol eklendi ve mikropipet yardımı ile karıştırıldı. Toplama tüplerinin her birine örnek sayısı kadar kolon yerleştirildi.
- Hazırlanan karışım toplama tüplerine aktarıldı ve 8000 rpm'de 1dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri atıldı ve kolonlar yeni toplama tüplerine alındı.

- Her tüpe, kitle birlikte sağlanan 500 µl İnhibitör Uzaklaştırma Tamponu eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri atıldı ve kolonlar yeni toplama tüplerine alındı.
- Her tüpe, kitle birlikte sağlanan 500 µl Yıkama Tamponu eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri atıldı ve kolonlar yeni toplama tüplerine alındı.
- Her tüpe tekrar 500 µl Yıkama Tamponu eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüplerinde bulunan sıvı uzaklaştırıldı ve rezidüe yıkama tamponunu tamamen uzaklaştırmak için ek santrifüj işlemi uygulandı (13.000 rpm'de 1 dk).
- Toplama tüpleri atıldı ve kolonlar 1.5 ml'lik ependorflara alındı.
- Her tüpe 72°C de bekleyen 100 µl Elüsyon Tamponundan eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- İzole edilen DNA örnekleri, real-time PCR analizinde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.3. Sitokin Gen Polimorfizimlerinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi

TNF α , IFN γ , IL-10, IL-17, ve IL-18 sitokinlerine ait genlerde gözlenen tek nükleotid polimorfizimleri (SNP'ler) için National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, NCBI) veri tabanında tanımlanan bölgeler kullanıldı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) (Tablo 3).

Tablo 3. TNF- α , IFN γ , IL-10, IL-17 ve IL-18 SNP'leri ve lokalizasyonları

Gen	SNP Lokalizasyonu	SNP "accession number"
TNF- α	-308	rs1800629
IFN- γ	+874	rs2430561
IL-10	-592	rs1800872
IL-10	-1082	rs1800896
IL-17	Exon 3/3'UTR	rs1974226
IL-17	Exon 3	rs763780
IL-18	-137	rs187238
IL-18	-607	rs1946518

TNF α , IFN γ , IL-10, IL-17, ve IL-18 sitokin genlerine özgün SNP analizleri için kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin dizaynı yapıldı ve sentezletildi (TIB Molbiol, Berlin, Almanya). Çalışmada kullanılan primer setleri ve hibridizasyon prob dizilimleri Tablo 4-11'de verilmiştir.

Tablo 4. TNF- α -308 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5' → 3')

TNF- α -308	
Primer sense	5'- CCTgCATCCTgTCTggAAgTTA - 3'
Primer antisense	5'- CTgCACCTTCTgTCTCggTTT - 3'
Prob 1	5'- AACCCCGTCCCATgCCCC - 3'-FL*
Prob 2	**640-5'-CAAAACCTATTgCCTCCATTTCTTTTggggAC- 3'

*FL: Fluoresin, ** 640: LightCycler Red 640 Fluorasan boya.

Tablo 5. IFN- γ +874 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5' → 3')

IFN- γ +874	
Primer sense (internal işaretli primer)	5'- TCACAATTgACTTTATTCTXTACAAC- 3'
Primer antisense	5'- gCCTTCCTgTAGggTATTATTATA- 3'
Prob 1	5'- TGTGTGTGTGAGATTTGATTTTGT- 3'-FL*

Tablo 6. IL-10 -592 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5' → 3')

IL-10 -592	
Primer sense	5'- ggTgAgCACTACCTgACTAgC- 3'
Primer antisense	5'- CCTAggTCACAgTgACgTgg- 3'
Prob 1	5'- AgCCTggAACACATCCTgTgACCCC- 3'-FL*
Prob 2	**640-5'- CCTgTCCTgTAggAAgCCAgTCTC- 3'

Tablo 7. IL-10 -1082 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5' → 3')

IL-10 -1082	
Primer sense	5'- CTCgCTgCAACCCAACTggC- 3'
Primer antisense	5'- ATggggTggAAgAAgTTgAA- 3'
Prob 1	5'- ggATAggAggTCCCTTACTTTCTCTTACC - 3'- FL*
Prob 2	**640-5'- CCCTACTTCCCCTCCCAA - 3'

Tablo 8. IL-17 3'UTR SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5' → 3')

IL-17 3'UTR	
Primer sense	5'- CCTggCTTCTgTCTgATCAA- 3'
Primer antisense	5'- TTgggCTgACCTTTTCTCAT- 3'
Prob 1	5'- ACTTAAAgTTCATTCTgCCCCA - 3'-FL*
Prob 2	**640-5'- CAgCTCCTTTCTgggTTgTggT - 3'

Tablo 9. IL-17 Ekzon 3 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5' → 3')

IL-17 Ekzon 3	
Primer sense	5'- CTTTCCAgTTggAgAAggTgCT- 3'
Primer antisense	5'- AgggAATTgggggTCAGAC- 3'
Prob 1	5'- TCTTACTgCACACggTggATgA- 3'-FL*
Prob 2	**640-5'- gTgACgCAggTgCAgCCAACAgTCA- 3'

Tablo 10. IL-18 -137 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5' → 3')

IL-18 -137	
Primer sense	5'- AgTggCAGAggATACgAg- 3'
Primer antisense	5'- AAgAgATACTCAGAAAgAggTACA- 3'
Prob 1	5'- TCATgAAATCTTTTCTTCCgTAAAgT- 3'-FL*
Prob 2	**640-5'- ggggCTCTgTgCCTTCCAAAA- 3'

Tablo 11. IL-18 -607 SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri (5' → 3')

IL-18 -607	
Primer sense	5'- TTCATAAACTTCTTTATCTgCTg- 3'
Primer antisense	5'- CCCTAAATATATgTATCCTTAAATTg- 3'
Prob 1	5'- gAAAgTgTAAAAATTATTACATAAAATTCT - 3'-FL*
Prob 2	**640-5'- ATgATggTATCCgTgTggCTTg - 3'

SNP analizi için LightCycler 2.0 gerçek-zamanlı PCR sistemi (Roche, Almanya) kullanıldı. Dizayn edilen primer-prob setleri kullanılarak gerçek-zamanlı PCR protokolünün optimizasyon çalışmaları yapıldı. Optimizasyon çalışmaları ile hem amplifikasyon hem de erime eğrisi analizleri için protokoller belirlendi. Öncelikle hedef bölge çoğaltıldı ve sonrasında amplikonun identifikasyonu erime eğrisi analizi (melting curve analysis) ile yapıldı (LightCycler yazılım programı,

versiyon 4.05). Tablo 12-14'de optimize edilen gerçek-zamanlı PCR reaksiyon karışımları yer almaktadır.

Tablo 12. TNF- α -308 SNP analizine özgün reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim	Final konsantrasyon
PCR - grade su	10.4 μ l	-
MgCl ₂	1,6 μ l	3 mM
Primer sense	1 μ l	0,5 μ M
Primer antisense	1 μ l	0,1 μ M
Prob 1 (FL)	1 μ l	0,225 μ M
Prob 2 (LC 640)	1 μ l	0,225 μ M
Master karışım*	2 μ l	1 X
DNA örneği	2 μ l	-
Toplam hacim	20 μ l	

* Reaksiyonu karışımı için "LightCycler HybProbe Master" kiti kullanıldı. Master karışımı: FastStart Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, MgCl₂ ve dNTP karışımından oluşmaktadır.

Tablo 13. IFN- γ +874 SNP analizine özgün reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim	Final konsantrasyon
PCR - grade su	10,4 μ l	-
MgCl ₂	1,6 μ l	3 mM
Primer sense	1 μ l	0,5 μ M
Primer antisense	1 μ l	0,1 μ M
Prob 1 (FL)	1 μ l	0,225 μ M
Master karışım*	2 μ l	1 X
DNA örneği	2 μ l	-
Toplam hacim	20 μ l	

* Reaksiyonu karışımı için "LightCycler HybProbe Master" kiti kullanıldı. Master karışımı: FastStart Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, MgCl₂ ve dNTP karışımından oluşmaktadır.

Tablo 14. Diğer SNP analizlerine özđün reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim	Final konsantrasyon
PCR - grade su	10,4 µl	-
MgCl ₂	1,6 µl	3 µM
Primer sense	1 µl	0,5 µM
Primer antisense	1 µl	0,5 µM
Prob 1 (FL)	1 µl	0,045 µM
Prob 2 (LC 640)	1 µl	0,045 µM
Master karışım*	2 µl	1 X
DNA örneği	2 µl	-
Toplam hacim	20 µl	

* Reaksiyonu karışımı için “LightCycler HybProbe Master” kiti kullanıldı. Master karışımı: FastStart Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, MgCl₂ ve dNTP karışımından oluşmaktadır.

PCR-grade su, MgCl₂, primerler, problar ve Master karışımı (FastStart Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, nükleotid karışımı ve 10 mM MgCl₂) belirtilen sıra ile ve belirtilen miktarlarda karıştırıldıktan sonra, 18 µL hacimde olacak şekilde kapillere aktarıldı. Kapillere aktarılan her reaksiyon karışımı üzerine 2 µL DNA örneği eklendi. Negatif kontrol örneğinde DNA örneği yerine 2 µL “PCR-grade” su kullanıldı. Toplam 20 µL reaksiyon karışımı içeren kapillerler, karusel yardımı ile gerçek-zamanlı PCR ile hedef bölgenin çoğaltılması ve SNP analizi için LightCycler 2.0 gerçek-zamanlı PCR sistemine yerleştirildi. Tablo 15-22’de gerçek-zamanlı PCR protokolleri yer almaktadır.

Tablo 15. TNF- α -308 SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü*					
Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
	1		95 °C	10 dk	
Amplifikasyon					
		Denatürasyon	95 °C	6 sn	-
	45	Annealing	62 °C	10 sn	Tek
		Ekstensiyon	72 °C	22 sn	-
Erime eğrisi			95 °C	20 sn	-
			85 °C	0 sn	-
			40 °C slope=0.2°C/sn	20 sn	-
			85 °C	0 sn	Step
Soğutma					
	1		40 °C	30 sn	-

Tablo 16. IFN- γ +874 SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü*					
Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
	1		95 °C	10 dk	
Amplifikasyon					
		Denatürasyon	95 °C	10 sn	-
	40	Annealing	51 °C	8 sn	Tek
		Ekstensiyon	72 °C	5 sn	-
Erime eğrisi			95 °C	20 sn	-
			85 °C	0 sn	-
			40 °C slope=0.2°C/sn	20 sn	-
			85 °C slope=0.5°C/sn	0 sn	Sürekli
Soğutma					
	1		40 °C	30 sn	-

Tablo 17. IL-10 -592 SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü*					
Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
	1		95 °C	10 dk	
Amplifikasyon					
		Denatürasyon	95 °C	10 sn	-
	40	Annealing	55 °C	10 sn	Tek
		Ekstensiyon	72 °C	17 sn	-
Erime eğrisi			95 °C	0 sn	-
			55 °C	30 sn	-
			85 °C slope=0.2°C/sn	0 sn	Sürekli
Soğutma					
	1		40 °C	30 sn	-

Tablo 18. IL-10 -1082 SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü*					
Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
	1		95 °C	10 dk	
Amplifikasyon					
		Denatürasyon	95 °C	10 sn	-
	40	Annealing	60 °C 55 °C (slope=0.2°C/sn)	10 sn 1 sn	Tek
		Ekstensiyon	72 °C	10 sn	-
Erime eğrisi			95 °C	0 sn	-
			45 °C	30 sn	-
			75 °C slope=0.2°C/sn	0 sn	Sürekli
Soğutma					
	1		40 °C	30 sn	-

Tablo 19. IL-17 3'UTR SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü*					
Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
	1		95 °C	10 dk	
Amplifikasyon					
		Denatürasyon	95 °C	10 sn	-
	35	Annealing	56 °C	10 sn	Tek
		Ekstensiyon	72 °C	10 sn	-
Erime eğrisi			95 °C	0 sn	-
			49 °C	30 sn	-
			85 °C slope=0.2°C/sn	0 sn	Sürekli
Soğutma					
	1		40 °C	30 sn	-

Tablo 20. IL-17F Ekzon 3 SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü*					
Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
	1		95 °C	10 dk	
Amplifikasyon					
		Denatürasyon	95 °C	10 sn	-
	40	Annealing	56 °C	10 sn	Tek
		Ekstensiyon	72 °C	10 sn	-
Erime eğrisi			95 °C	0 sn	-
			40 °C	30 sn	-
			85 °C slope=0.2°C/sn	0 sn	Sürekli
Soğutma					
	1		40 °C	30 sn	-

Tablo 21. IL-18 -137 SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü*					
Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
	1		95 °C	10 dk	
Amplifikasyon					
		Denatürasyon	95 °C	10 sn	-
	40	Annealing	51 °C	10 sn	Tek
		Ekstensiyon	72 °C	12 sn	-
Erime eğrisi			95 °C	0 sn	-
			40 °C	30 sn	-
			85 °C slope=0.2°C/sn	0 sn	Sürekli
Soğutma					
	1		40 °C	30 sn	-

Tablo 22. IL-18 -607 SNP analizi için gerçek- zamanlı PCR protokolü*					
Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
	1		95 °C	10 dk	
Amplifikasyon					
		Denatürasyon	95 °C	10 sn	-
	35	Annealing	51 °C	10 sn	Tek
		Ekstensiyon	72 °C	12 sn	-
Erime eğrisi			95 °C	1 dk	-
			55 °C	30 sn	-
			45 °C	30 sn	-
			40 °C	2 dk	-
			75 °C slope=0.2°C/sn	0 sn	Sürekli
Soğutma					
	1		40 °C	30 sn	-

* Gerçek-zamanlı PCR Protokolü; Pre-inkübasyon: Enzim aktivasyonu ve kalıp DNA'nın denatürasyonu, Amplifikasyon: Hedef bölgenin primerler yardımı ile çoğaltılması, Erime eğrisi: Amplikona ait genotipin belirlenmesi (SNP analizi), Soğutma: Sistemde yer alan rotorun ve termal haznenin soğutulması basamaklarını içermektedir.

Optimize edilen protokollerde belirtilen reaksiyon koşullarına göre, primerler kullanılarak hedef SNP'yi içeren DNA fragmanları çoğaltıldı. Amplikonların varlığı, özgün hibridizasyon prob setleri kullanılarak floresan artışı ile belirlendi. Özetle sistemdeki floresan değeri şu şekilde ölçülmektedir: Özgün hibridizasyon prob seti, çoğalan hedef bölgede yer alan dizilerle hibridize olabilen iki farklı oligonükleotitten oluşmaktadır. Bir prob, 5'-ucunda "LightCycler Red 640-N-hydroxy-succinimide ester (Red 640-NHS ester)" (alıcı boya) ile işaretlidir ve 3'-ucu fosforilasyonla modifiyedir. Diğer probun ise 3'-ucu fluoresin (donör boya) ile işaretlidir. İki prob, hedef DNA'da birbirlerine oldukça yakın hibridize olduklarında (1-5 nt), gerçek-zamanlı PCR sisteminin mavi ışık kaynağı donör boyayı (fluoresin) harekete geçirir ve uzun bir dalga boyunca yeşil floresan ışığı saçılır. Donör ve alıcı boyalar birbirlerine çok yakın olduklarında, saçılan bu enerji ikinci hibridizasyon probundaki alıcı boyayı harekete geçirir ve farklı bir dalga boyunda ışık saçılır. "Floresan Rezonan Enerji Transferi" (FRET) olarak adlandırılan bu enerji transferi, iki prob arasındaki mesafeye bağlıdır.

Amplikonların varlığının belirlenmesinden sonra, amplikonların identifikasyonu için, yani SNP analizi için, erime eğrisi analizleri yapıldı. Bu

aşamada, öncelikle sistemin ısısının arttırılmasına (örneğin 95°C'ye çıkmasına) olanak sağlandı. Daha sonra ısı düşürüldü ve tekrar artması sağlandı (örneğin 40°C'den 95°C'ye çıkartıldı) ve ısı artışı sırasında her 0.1°C'de sistemde var olan floresan için okuma yaptırıldı. Gerçek-zamanlı PCR sistemi yazılım programı ile her bir örneğe ait 640 nm dalga boyunda ölçülen floresanın negatif türevini ısıya göre değerlendiren ve amplicona ait erime derecesini (T_m) gösteren grafikler elde edildi. SNP genotiplendirmesinde, erime eğrisi analizi ile işaretli prob ve amplicon arasındaki tek bir mismatch'ın erime derecesini önemli oranda azaltacaktır gerçeğinden yararlanılmaktadır. Dolayısıyla stabilize mismatch içeren prob/amplicon hibridleri ile mükemmel eşlesen prob/amplicon hibridlerinin erime dereceleri kolaylıkla gözlemlenebilir ve karşılaştırılabilir. Çalışmada analiz edilen SNP'ler için prob dizaynları bazı SNP'ler için normal genotipe bazı SNP'ler için polimorfik genotipe özgün yapıldığından, erime derecelerine göre normal homozigot genotip, heterozigot ve polimorfizime özgün homozigot genotip ayrımı yapılmıştır.

3.4. İstatistiksel Analiz

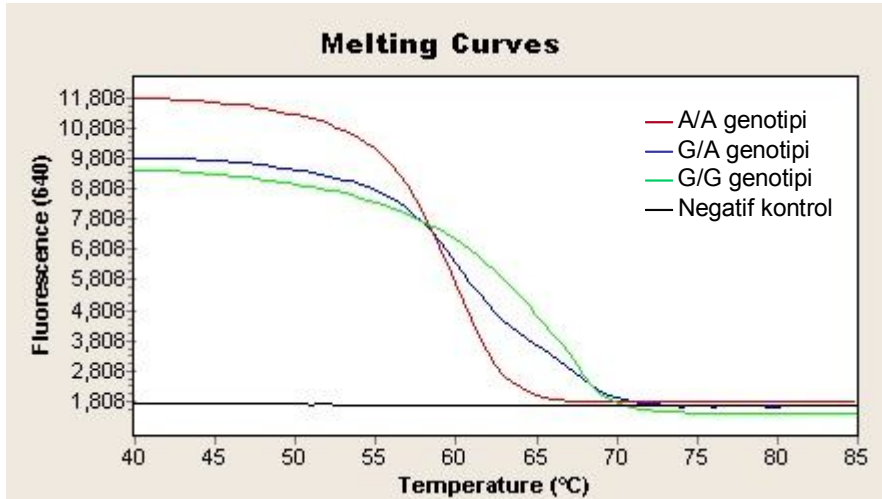
TNF α , IFN γ , IL-10, IL-17, ve IL-18 sitokin gen polimorfizimlerinin gruplar arasındaki dağılımı hesaplama ile yapıldı. İstatiksel analizler için SPSS 15.0 Windows paket programı kullanıldı. Sitokinlere ait gen polimorfizimleri ile olgu grupları arasındaki ilişki Ki-Kare ve Fischer exact test ile değerlendirildi. Testler sonucu elde edilen p değerleri 0,05 den küçük ise anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

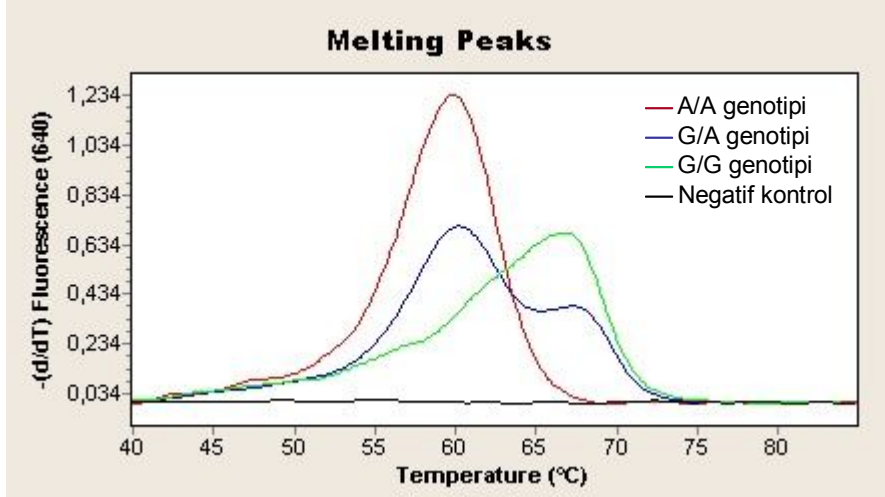
Çalışmadaki TNF α , IFN γ , IL-10, IL-17, ve IL-18 sitokin genlerine ait SNP analizleri aşağıdaki şekil ve grafiklerde sunulmuş olup SNP dağılımlarının inaktif hepatit B taşıyıcılarında, kronik aktif hepatit B'li hastalarda, doğal bağışık ve sağlıklı bireylerden oluşan gruplardaki karşılaştırmalı sonuçları ise Tablo 23'de verilmiştir.

1. TNF- α -308 SNP Analizi

TNF- α -308 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisi analizleri sırası ile Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.



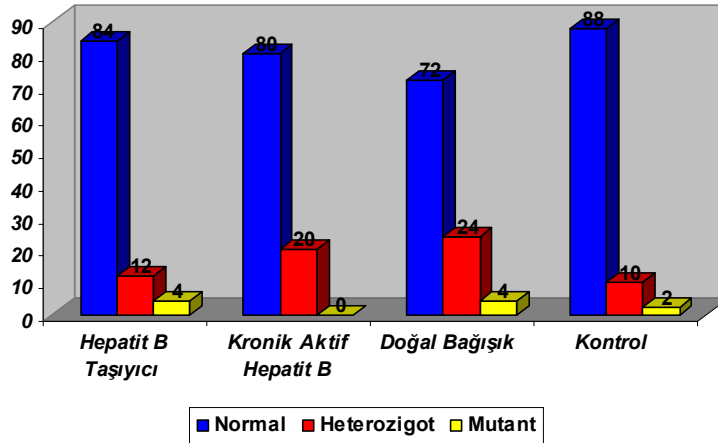
Şekil 11. TNF- α -308 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi



Şekil 12. TNF- α -308 SNP'ne özgün erime eğrisi

TNF- α -308 SNP'ne özgün genotip dağılımı olgu grupları arasında değerlendirildiğinde, G/A genotipi ve A/A genotipleri (polimorfik) en sık doğal bağışık gruptaki bireylerde tespit edilmiştir (Grafik 1).

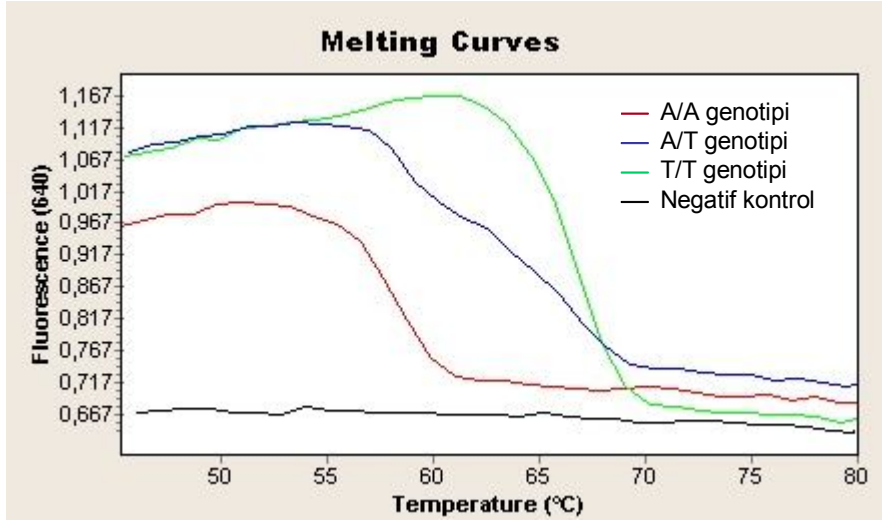
Grafik 1. TNF- α -308 SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı



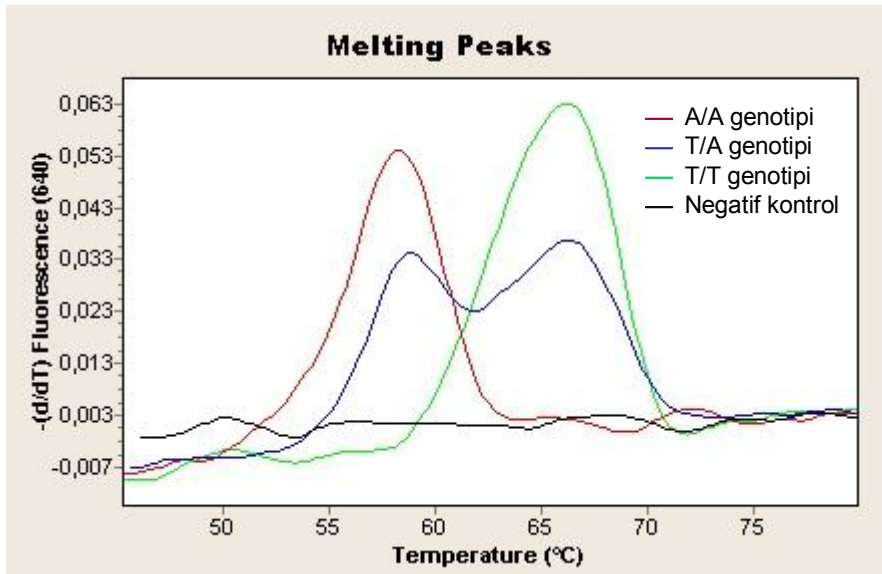
Olguların klinik yanıt ile TNF- α -308 SNP'i açısından karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,597$).

2. IFN- γ +874 SNP Analizi

IFN- γ +874 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisi analizleri sırası ile Şekil 13 ve 14'te gösterilmiştir.



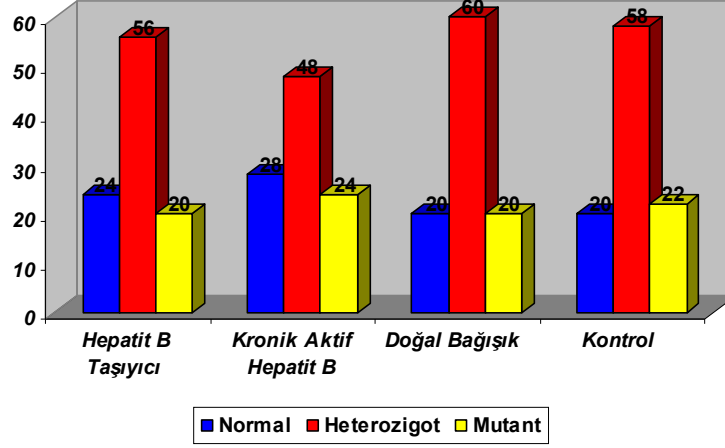
Şekil 13. IFN- γ +874 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi



Şekil 14. IFN- γ +874 SNP'ne özgün erime eğrisi

IFN- γ +874 SNP'ne özgün genotip dağılımı olgu grupları arasında değerlendirildiğinde, doğal bağışık grupta T/A genotipi, kronik aktif hepatit grupta A/A genotipi (polimorfik) daha sık tespit edilmiştir (Grafik 2).

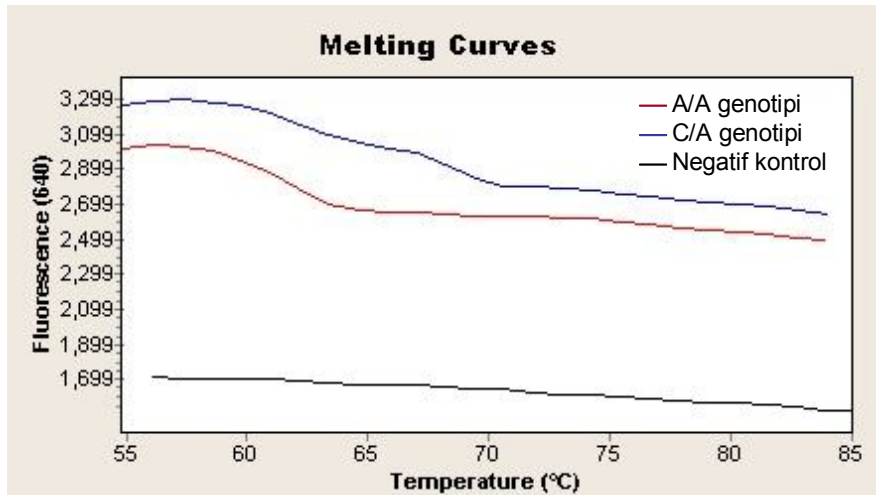
Grafik 2: IFN- γ +874 SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı



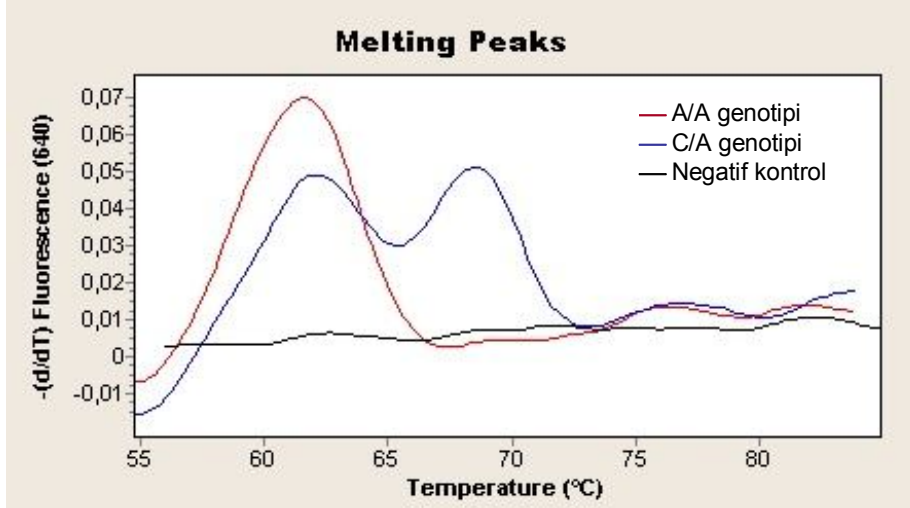
Olgu grupları klinik yanıt ile IFN- γ +874 SNP'i açısından karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,788$).

3. IL-10 -592 SNP Analizi

IL-10 -592 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisi analizleri sırası ile Şekil 15 ve 16'da gösterilmiştir.



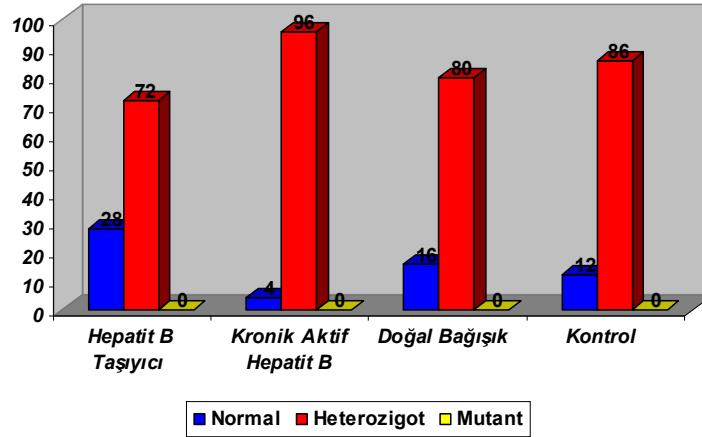
Şekil 15. IL-10 -592 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi



Şekil 16. IL-10 -592 SNP'ne özgün erime eğrisi

IL-10 -592 SNP'i genotip dağılımı olgu grupları arasında değerlendirildiğinde, kronik aktif hepatit grubunda C/A genotipi, hepatit B taşıyıcılarında ise C/C genotipi (wild-type) daha sık tespit edilmiştir (Grafik 3).

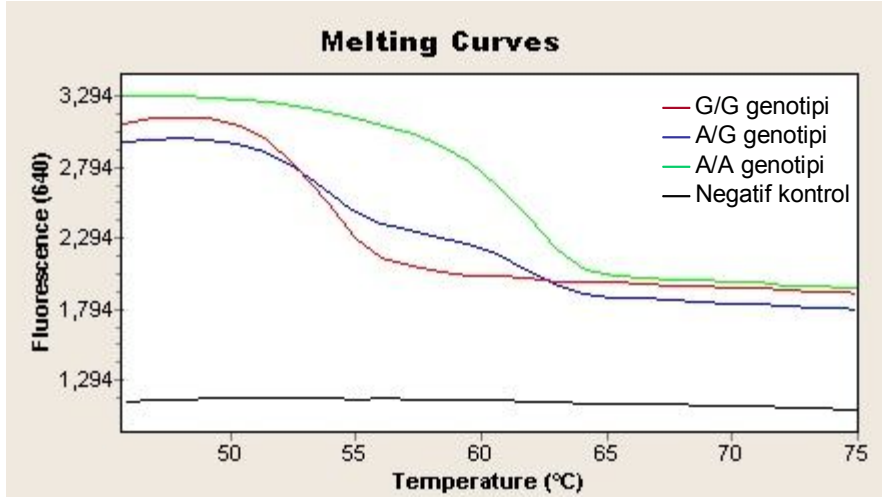
Grafik 3. IL-10 -592 SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı



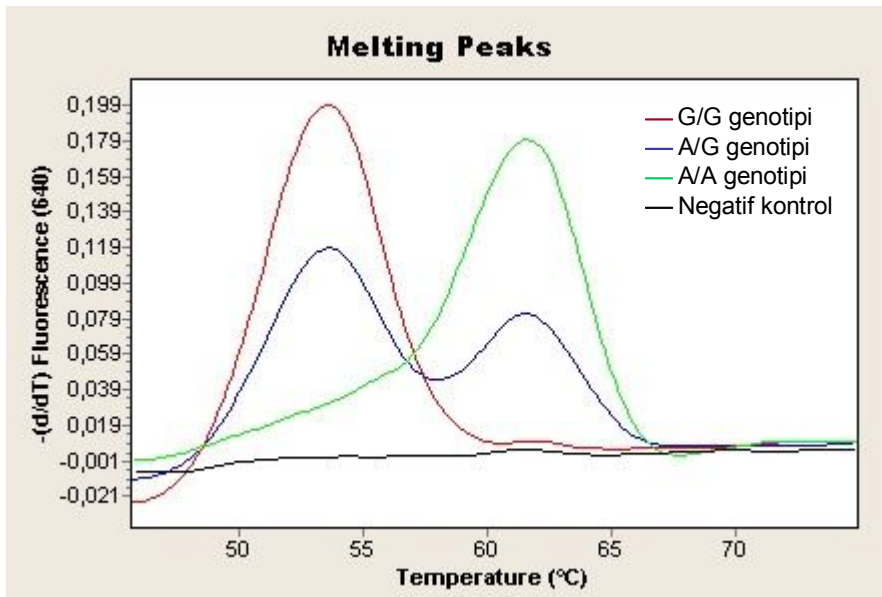
Olgu grupları klinik yanıt ile IL-10 -592 SNP'i açısından karşılaştırıldığında ise, kronik aktif hepatitli grup ile C/A genotipi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,049$).

4. IL-10 -1082 SNP Analizi

IL-10 -1082 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisi analizleri sırası ile Şekil 17 ve 18'de gösterilmiştir.



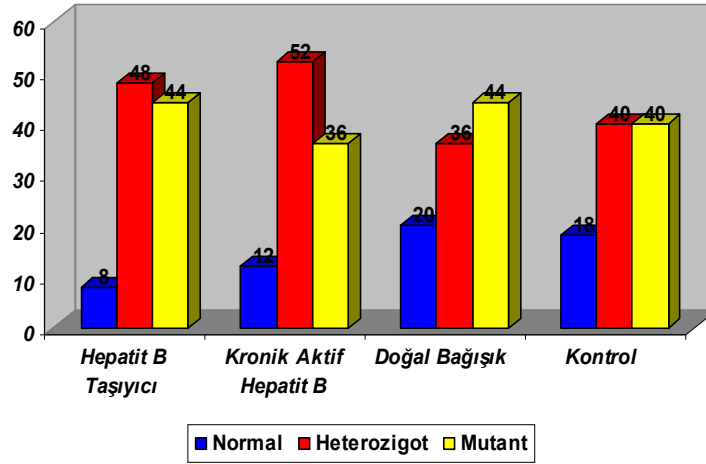
Şekil 17. IL-10 -1082 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi



Şekil 18. IL-10 -1082 SNP'ne özgün erime eğrisi

IL-10 -1082 SNP'ne özgün genotip dağılımı olgu grupları arasında değerlendirildiğinde, kronik aktif hepatit grubunda A/G genotipi, hepatit B taşıyıcılarında ve doğal bağışık grupta ise G/G genotipi daha sık tespit edilmiştir (Grafik 4).

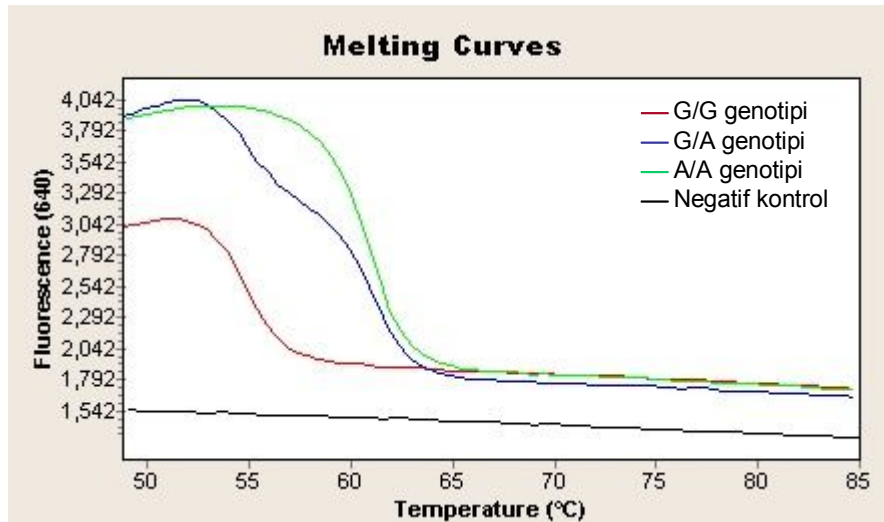
Grafik 4. IL-10 -1082 SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı



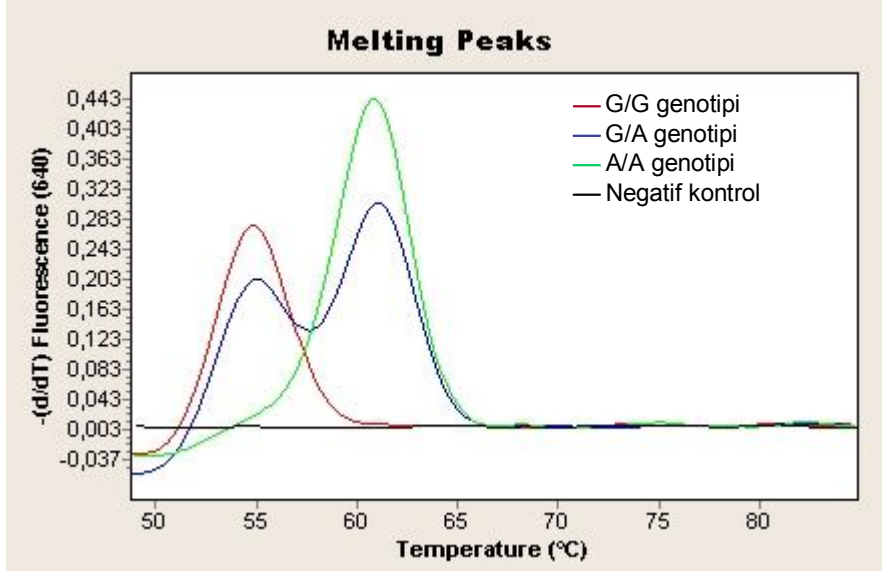
Olgu grupları klinik yanıt ile IL-10 -1082 SNP'i açısından karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,361$)

5. IL-17 3' UTR SNP Analizi

IL-17 3'UTR SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisi analizleri sırası ile Şekil 19 ve 20'de gösterilmiştir.



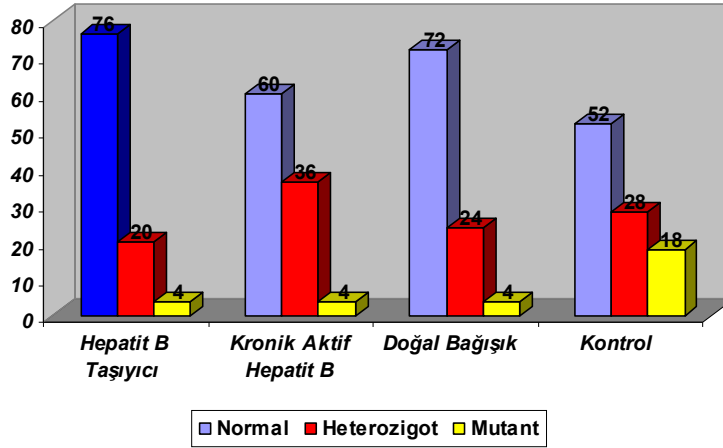
Şekil 19. IL-17 3'UTR SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi



Şekil 20. IL-17 3'UTR SNP'ne özgün erime eğrisi

IL-17 3' UTR (Ekzon 3) SNP'i genotip dağılımı olgu grupları arasında değerlendirildiğinde, hepatit B taşıyıcılarında G/G genotipi (wild-type), kronik aktif hepatit grubunda G/A genotipi, ve kontrol grubunda ise A/A genotipi daha sık tespit edilmiştir (Grafik 5).

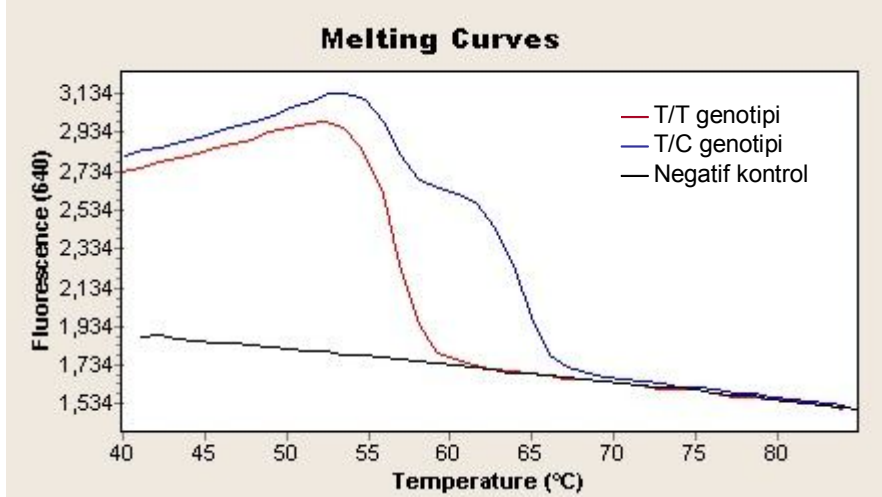
Grafik 5. IL-17 3' UTR SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı



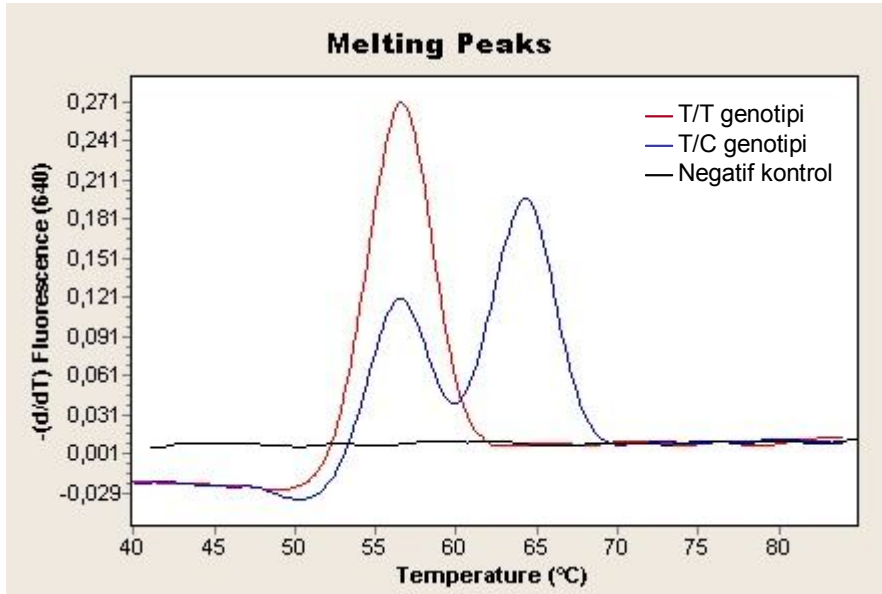
Olgu grupları klinik yanıt ile IL-17 3' UTR SNP'i açısından karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,933$).

6. IL-17 Ekzon 3 SNP Analizi

IL-17 Ekzon 3 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisi analizleri sırası ile Şekil 21 ve 22'de gösterilmiştir.



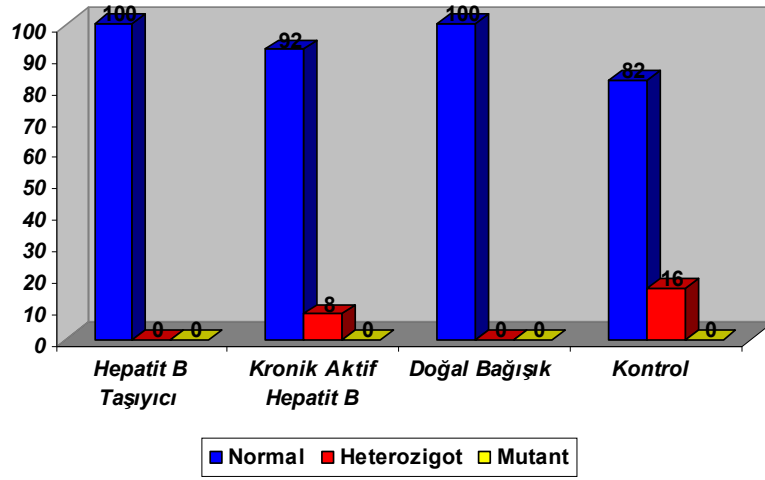
Şekil 21. IL-17 ekzon 3 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi



Şekil 22. IL-17 ekzon 3 SNP'ne özgün erime eğrisi

IL-17 Ekzon 3 SNP'i genotip dağılımı olgu grupları arasında değerlendirildiğinde, hepatit B taşıyıcılarında ve doğal bağışık grupta T/T genotipi (wild-type) kontrol grubunda ise C/C genotipi daha sık tespit edilmiştir (Grafik 6).

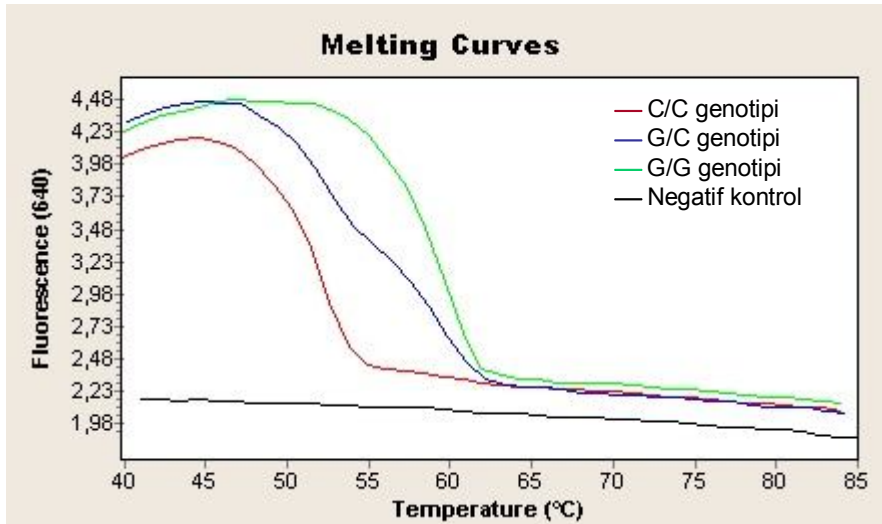
Grafik 6. IL-17 Ekzon 3 SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı



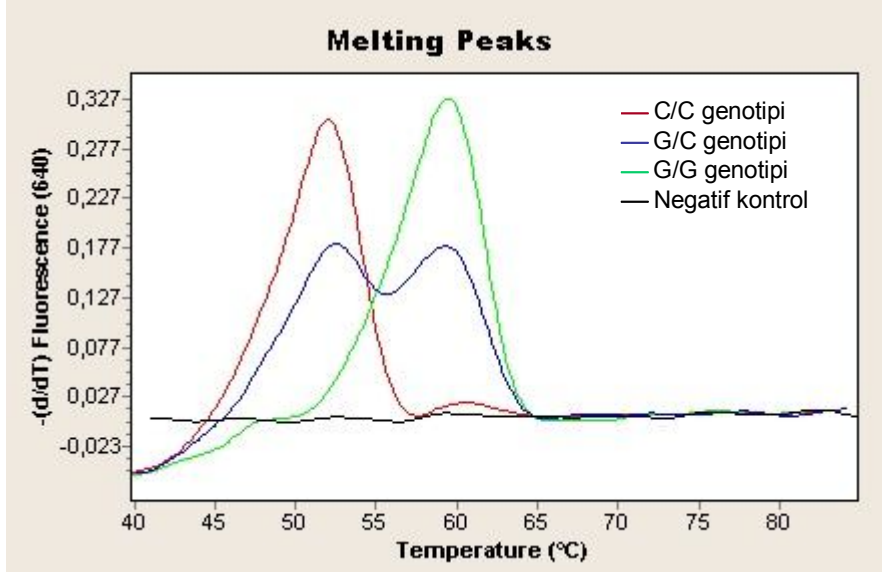
Olgu grupları klinik yanıt ile IL-17 Ekzon 3 SNP'i açısından karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,550$).

7. IL-18 -137 SNP Analizi

IL-18 -137 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisi analizleri sırası ile Şekil 23 ve 24'te gösterilmiştir.



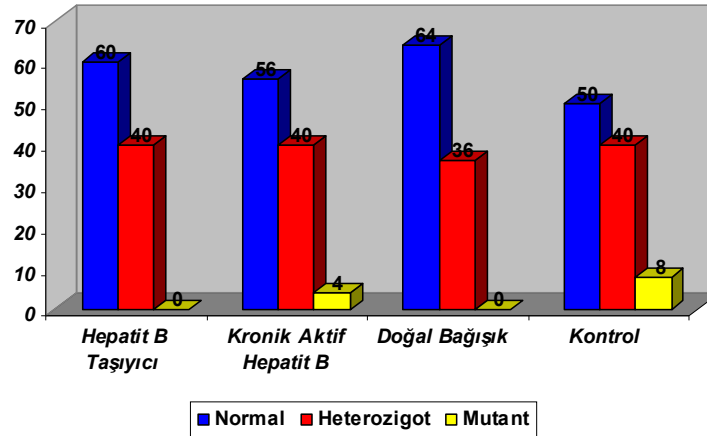
Şekil 23. IL-18 -137 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi



Şekil 24. IL-18 -137 SNP'ne özgün erime eğrisi

IL-18 (-137) sitokinine ait polimorfizimlerin genotip dağılımı olgu grupları arasında değerlendirildiğinde, doğal bağışık grupta G/G genotipi (wild-type) hepatit B taşıyıcılarında ve kronik aktif hepatit grubunda G/C genotipi ve kontrol grubunda ise C/C genotipi daha sık tespit edilmiştir (Grafik7).

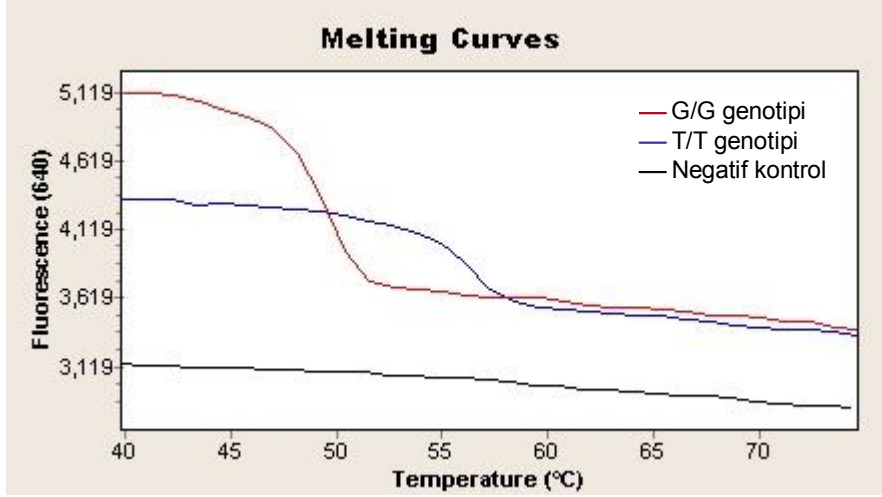
Grafik 7. IL-18 -137 SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı



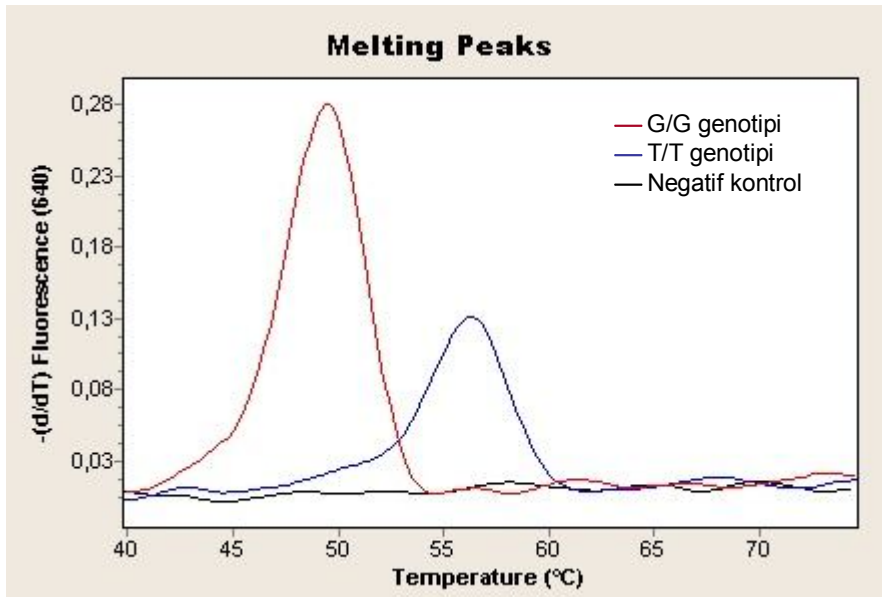
Olgu grupları klinik yanıt ile IL-18 -137 SNP'i açısından karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,716$).

8. IL-18 -607 SNP Analizi

IL-18 -607 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisi analizleri sırası ile Şekil 25 ve 26'da gösterilmiştir.



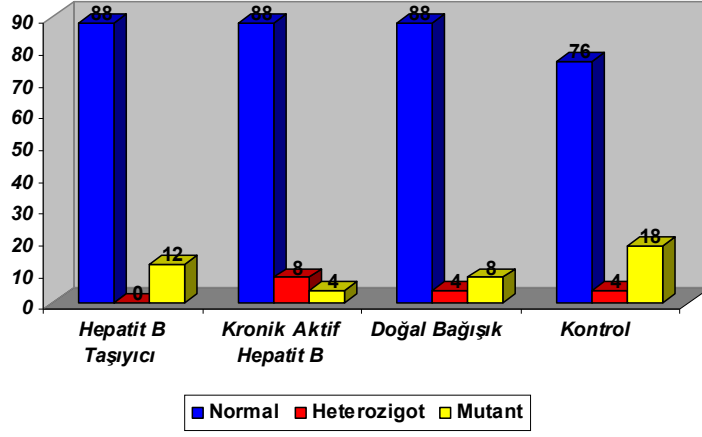
Şekil 25. IL-18 -607 SNP'ne özgün amplifikasyon eğrisi



Şekil 26. IL-18 -607 SNP'ne özgün erime eğrisi

IL-18 -607 SNP'ine özgün genotip dağılımı olgu grupları arasında değerlendirildiğinde, kronik aktif hepatit grubunda T/G genotipi ve kontrol grubunda ise G/G genotipi daha sık tespit edilmiştir (Grafik8).

Grafik 8. IL-18 -607 SNP'nin gruplar arasındaki dağılımı



Olgu grupları klinik yanıt ile IL-18 -607 SNP'i açısından karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=1,000$).

Tablo 23. Sitokin genlerine özgün SNP'lerinin çalışma gruplarına göre dağılım oranları

<i>SNP genotipleri</i>	<i>HEPATİT B TAŞIYICI GRUBU</i>	<i>KRONİK AKTİF HEPATİT B GRUBU</i>	<i>DOĞAL BAĞIŞIK GRUBU</i>	<i>KONTROL GRUBU</i>
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
TNF-α -308				
G/G genotipi (wild-type)	21 (84)	20 (80)	18(72)	44 (88)
G/A genotipi	3 (12)	5 (20)	6(24)	5 (10)
A/A genotipi	1(4)	-	1(4)	1(2)
IFN-γ +874				
T/T genotipi (wild-type)	6 (24)	7(28)	5 (20)	10 (20)
T/A genotipi	14 (56)	12 (48)	15 (60)	29 (58)
A/A genotipi	5 (20)	6 (24)	5 (20)	11 (22)
IL-10 -592				
C/C genotipi (wild-type)	7 (28)	1 (4)	4 (16)	6 (12)
C/A genotipi	18 (72)	24 (96)	20 (80)	43 (86)
A/A genotipi	-	-	-	-
IL-10 -1082				
A/A genotipi (wild-type)	2 (8)	3 (12)	5 (20)	9 (18)
A/G genotipi	12 (48)	13 (52)	9 (36)	20 (40)
G/G genotipi	11 (44)	9 (36)	11 (44)	20 (40)
IL-17 3'UTR				
G/G genotipi (wild-type)	19 (76)	15 (60)	18 (72)	26 (52)
G/A genotipi	5 (20)	9 (36)	6 (24)	14 (28)
A/A genotipi	1(4)	1 (4)	1 (4)	9 (18)
IL-17 Ekzon 3				
T/T genotipi (wild-type)	25(100)	23 (92)	25(100)	41(82)
T/C genotipi	-	2 (8)	-	8 (16)
C/C genotipi	-	-	-	-
IL-18 -137				
G/G genotipi (wild-type)	15 (60)	14 (56)	16 (64)	25 (50)
G/C genotipi	10 (40)	10 (40)	9 (36)	20 (40)
C/C genotipi	-	1 (4)	-	4 (8)
IL-18 -607				
T/T genotipi (wild-type)	22 (88)	22 (88)	22 (88)	38 (76)
T/G genotipi	-	2 (8)	1 (4)	2 (4)
G/G genotipi	3 (12)	1 (4)	2 (8)	9 (18)

5. TARTIŞMA

HBV enfeksiyonu kendiliğinden iyileşme, asemptomatik enfeksiyon, kronik aktif hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinoma gibi oldukça farklı klinik seyirler göstermektedir (16). Bireyler arasında ortaya çıkan değişken sonuçlar viral faktörler ile konağın immün sistemi arasındaki etkileşimlere bağlıdır (25).

Hücrel ve humoral immün yanıt ile ilişkili bu kompleks hastalıkta sitokinlerin virüsün oluşturacağı hastalık tipini ve sonucunu belirlemede oldukça önemli oldukları düşünülmektedir (67). Doğal sitokin cevabını etkileyen ve bireyler arasında sitokin üretiminde varyasyonlara sebep olan faktörlerin başında sitokinlere ait genlerde tanımlanan polimorfizimler gelmektedir. Sitokin gen polimorfizimi; enfeksiyon hastalıklarına duyarlılığı, hastalığın şiddetini ve klinik sonucu etkileyen önemli bir mekanizma olarak tanımlanmaktadır (69).

HBV enfeksiyonu sırasında başta CD4 T lenfositler olmak üzere birçok immün efektör hücreden sitokin salınımı olur. Bu sitokinlerin fibrozis ve siroz ile sonuçlanan inflamatuvar karaciğer hastalığında anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (76). Günümüzde dünyanın değişik bölgelerinde farklı etnik gruplar üzerinde yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, hepatit B enfeksiyonunun immünopatogenezinde önemli rol oynayan sitokinlerle ilişkili genetik varyasyonlar oldukça dikkat çekicidir.

TNF- α ; hepatit B virüsünün replikasyonunu hepatit B virüsüne ait mRNA'nın yıkımını arttırarak inhibe etmektedir. TNF- α promotor bölgesindeki tek nükleotid polimorfizimleri ile hepatit B enfeksiyonu arasındaki ilişki birçok çalışmada değerlendirilmiştir. Kim ve ark. 1400 koreli olguda TNF- α 308A/G veya A/A ve TNF- α 863C/C polimorfizimlerinin hepatit B enfeksiyonunda iyileşme ile ilişki olduğunu tespit etmişlerdir (81). Ülkemizde Baştürk ve ark. yaptıkları çalışmada TNF α -308 G/G polimorfiziminin hem hepatit B taşıyıcılarında hem de kronik hepatitli olgularda daha yüksek olduğunu ve TNF- α polimorfizimlerinin hepatit B enfeksiyonunun yetersiz inhibisyonuyla ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (71). Miyazoe ve ark. yaptıkları bir çalışmada ise TNF- α promotor gen polimorfizimleri ile hepatit B enfeksiyonunun progresyonu arasında ilişki olmadığını rapor

etmişlerdir (69). Bu çalışmada da TNF- α -308 sitokinine ait polimorfizimler genotip dağılımı açısından değerlendirildiğinde hepatit B enfeksiyonunda iyileşme ile ilişkili olduğu düşünülen G/A genotipi ve A/A genotipi en sık doğal bağışık gruptaki bireylerde tespit edilmiştir. Buna karşın Miyazoe ve ark.'nın sonuçlarıyla benzer şekilde klinik yanıt ile polimorfizimler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Sitokin ağının kompleks yapısının, incelenen popülasyonun sınırlı sayıda olmasının, farklı popülasyonlardaki sitokin gen çeşitliliğinin (etnik farklılıklar) ve hepatit B virüsüne ait olası genotip farklılıklarının çalışmalar arasındaki uyumsuzluğu açıklayabileceğini düşünmekteyiz.

IFN- γ ; Th1 grup sitokin olarak T hücrelerinin farklılaşmasında, anti-proliferatif, anti-tümör ve anti-viral aktiviteler göstererek tüm immün cevapların modülasyonunda önemli bir rol oynar. Pravica ve ark. IFN- γ +874 T/T genotipinin yüksek miktarda IFN- γ üretimi ile, IFN- γ +874 A/A genotipinin ise düşük miktarda IFN- γ üretimi ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (82). Ben-Ari ve ark. IFN- γ +874 A/A genotipinin düşük düzey IFN- γ üretimi ile ilişkili olduğunu ve IFN- γ polimorfizimleri ile kronik hepatit B gelişmesi arasında korelasyonun bulunduğunu rapor etmişlerdir (73). Cheong ve ark. yaptıkları 614 olguyu içeren daha geniş çaplı bir çalışmada ise IFN- γ +874 polimorfizimi ile hepatit B enfeksiyonunun kronikleşmesi arasında ilişki bulunmamıştır (83). Bu çalışmada IFN- γ +874 polimorfizimi genotip dağılımına göre değerlendirildiğinde; yüksek miktarlarda IFN- γ üretimi ile ilişkili olan T/A genotipi doğal bağışık grupta, düşük miktarda IFN- γ üretimi ile ilişkili olan A/A genotipi ise kronik aktif hepatit grubunda daha sık tespit edilmiştir. Buna karşın Cheong ve ark. yaptıkları çalışmaya benzer şekilde klinik yanıt ile IFN- γ +874 polimorfizimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

IL-10; Th2 hücreler tarafından üretilir ve IFN- γ , IL-2 ve TNF- α gibi Th1 hücreler tarafından üretilen proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe ederek hücrel immün yanıtların kontrolünde kritik bir rol oynar (84). IL-10'un proksimal promotör bölgesinde yer alan polimorfizimlerin IL-10'un üretimini etkilediği gösterilmiştir. -1082 GG genotipi yüksek düzey, -1082 GA genotipi orta düzey ve -1082 AA genotipi düşük düzey IL-10 üretimi ile ilişkilendirilmiştir (85). Hepatit B aşısına karşı gelişen immün yanıtta, hepatit B taşıyıcılarında gelişen anti-HBe

serokonversiyonunun derecesi ve devamlılığında, hepatit B ile ilişkili hepatosellüler karsinomda IL-10 promotor polimorfizimlerinin etkileri gösterilmiştir (86). Cheong ve ark. yaptıkları çalışmada IL-10 -592 C/C genotipinin doğal bağışık grupta kronik hepatitli gruba göre daha yüksek oranda olduğunu ve IL-10 -592A alelinin varlığı ile hepatit B enfeksiyonunun kronikleşmesi arasında ilişki olduğunu rapor etmişlerdir (83). Miyazoe ve ark. yaptıkları çalışmada IL-10'un düşük üretimi ile ilişkili olan -819. ve -592. pozisyonlarındaki A/T genotip polimorfizimlerinin ilerleyici kronik karaciğer hastalığıyla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (69). Gao ve ark. yaptıkları çalışmada IL-10 -1082 AA genotipinin hepatit B ve hepatit C enfeksiyonunun devamlılığıyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (87). Ben-Ari ve ark. yaptıkları çalışmada ise IL-10 polimorfizimleri ile kronik hepatit B enfeksiyonu arasında ilişki tespit edilememiştir (73). Ülkemizde yapılan bir çalışmada da Bilkay ve ark. IL-10 polimorfizimleri ile hepatit B enfeksiyonunun klinik sonuçları arasında ilişki olmadığını rapor etmişlerdir (71). Bu çalışmada olgu grupları klinik yanıt ile IL-10 polimorfizimleri açısından karşılaştırıldığında hepatit B enfeksiyonunun kronikleşmesi ile ilişkili olduğu düşünülen IL-10 -592 A/C genotipi kronik aktif hepatitli grupta daha sık tespit edilmiş olup klinik gidiş ile IL-10 polimorfizimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmuştur. Bu sonuçlar Cheong ve Miyazoe tarafından yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumludur. Farklı etnik gruplar arasında aynı polimorfizimlerin farklı klinik sonuçlara sebep olmasının nedeni hepatit B enfeksiyonunun kompleks immünopatogeneze ve farklı topluluklar içinde mevcut olan genetik heterojeniteye bağlı olabilir. Yapılan çalışmalarda hastaların demografik özelliklerinin farklı olması da değişik klinik sonuçların ortaya çıkmasının nedeni olarak gösterilebilir.

IL-17; 1993 yılında Rouver ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olup yeni bir T yardımcı hücre alt grubu olarak bilinen Th17 hücrelerinden salınan proinflamatuvar bir sitokindir. Birçok sitokin ve kemokinin salınımını arttırabilmesi en önemli biyolojik fonksiyonudur. Yakın zamanda yapılmış çalışmalar IL-17'nin kronik enfeksiyonlarda önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Hepatositlerde antiapoptotik molekülleri arttırarak ve sitotoksik T lenfositlerin hedef hücreleri yıkmasını engelleyerek HBV'nin varlığını devam ettirmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (75, 76, 77). Jiang ve ark. yaptıkları çalışmada kronik aktif hepatit

B' li hastalarda Th17 hücrelerinin seviyesinin arttığı ve serum ALT düzeyleri ile bu artış arasında korelasyon olduğu, dolayısıyla kronik aktif hepatit B patogeneğinde Th17 hücrelerinin rol alabileceği rapor edilmiştir (88). Xu ve ark. yaptıkları çalışmada IL-17 düzeyinin hepatit B virüsü ile ilişkili karaciğer hastalıklarında özellikle de karaciğer sirozunda artış gösterdiği ve IL-17'nin hepatit B virüsüne bağlı gelişen karaciğer fibrozisinin patofizyolojisinde rol alabileceği bildirilmiştir. Ayrıca IL-8 indüksiyonuna bağlı olarak IL-17 aracılığıyla karaciğerde nötrofillerin toplanmasının, hepatosit zedelenmesinin altında yatan potansiyel mekanizmalardan biri olabileceği bu çalışmada rapor edilmiştir (89).

IL-17 polimorfizimleri ve hepatit B enfeksiyonu arasındaki ilişki ise ilk defa bu çalışmada değerlendirilmiştir. Kronik aktif hepatit grubunda IL-17A 3'UTR G/A genotip polimorfizimi, kontrol grubunda ise IL-17F Ekzon 3 T/C genotip polimorfizimi yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar IL-17F Ekzon 3 T/C genotip polimorfiziminin düşük miktarda IL-17 üretimi ile ilişkili olduğunu, IL-17A 3'UTR G/A genotip polimorfiziminin ise yüksek miktarda IL-17 üretimi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Dolayısıyla artmış IL-17 üretimine neden olan IL-17A 3'UTR G/A genotip polimorfizimi hepatit B enfeksiyonunun kronikleşmesi ile ilişkili olabilir. Buna karşın sonuçların istatistiksel olarak değerlendirmesinde klinik sonuçlar ile polimorfizimler arasında korelasyon saptanmamıştır. Hepatit B enfeksiyonu ile IL-17 arasındaki ilişkiyi araştıran sınırlı sayıda yapılmış çalışmaların bazıları IL-17 sitokin düzeyi ile hepatit B enfeksiyonuna bağlı gelişen karaciğer fibrozis arasında ilişki olduğunu desteklerken (88, 89) diğer çalışmalar akut hepatit B enfeksiyonu ile yoğun karaciğer inflamasyonu arasında ilişki olduğunu desteklemektedir (90). Sonuç olarak IL 17 sitokininin ilişkili olduğu klinik form ile ilgili net bir görüş birliğinin olmaması nedeniyle çalışmaya ileri evre karaciğer hastası olguların ve akut hepatit B gelişmiş olguların dahil edilmemesi sonuçlarımız ile ilişkili olabilir.

IL-18; primer olarak aktive monosit ve makrofajlar tarafından sekrete edilen proinflamatuvar bir sitokin olup ilk önce interferon gamma indükleyici faktör olarak isimlendirilmiştir. Virüslere ve hücre içi patojenlere karşı doğal ve adaptif immün yanıtlarda önemli rol oynar. Viral klirenste esas role sahip CD8 T hücrelerini ve NK hücrelerini aktive eder (80). Kimura ve ark. yaptıkları bir çalışmada, tek doz 10µgr

rekombinant mürin IL-18'nin hepatit B virüsü ile enfekte transgenik farelere verilmesinin, karaciğerde hepatit B virüs replikasyonunu nonsitopatik yolla inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. IL-18'in antiviral etkisi esas olarak, intrahepatik yerleşimli T hücrelerini ve NK hücrelerini interferon gamma üretimi için aktive etmesiyle gerçekleşmektedir (79). Giedraitis ve ark. tarafından IL-18 geninin promotor bölgesinde bulunan -607A/C ve -137G/C polimorfizimlerinin, IL-18 üretim kapasitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (91). Migita ve ark. yaptıkları çalışmada IL-18 geninin promotor bölgesinin -607. pozisyonundaki AA genotipi ve -137. pozisyonundaki C aleli polimorfizimlerinin inaktif hepatit B taşıyıcılarında, ilerleyici kronik karaciğer hastalığı olanlara göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu rapor edilmiştir (92). Zhang ve ark. yaptıkları çalışmada IL-18 geninin promotor bölgesindeki -137. pozisyonunda C aleli taşımanın hepatit B enfeksiyonuna karşı koruyuculuk sağladığını ve -607. pozisyonda AA genotipinin varlığının da hepatit B DNA replikasyonunun inhibisyonuyla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (93). Hirankarn ve ark. yaptıkları çalışmada ise IL-18 sitokininin promotor bölgesinin -137. pozisyonundaki polimorfizimlerle klinik gidiş arasında ilişki tespit edilmemiştir (80). Bu çalışmada IL-18'in -137. pozisyonundaki polimorfizimlerin genotip dağılımı olgu grupları arasında değerlendirildiğinde hepatit B taşıyıcıları ile kronik aktif hepatit grubunda G/C genotipi, kontrol grubunda da C/C genotipi daha sık tespit edilmiştir. Kontrol grubunda C/C genotipinin yüksek bulunması, IL-18 sitokininin C/C genotipinin HBV enfeksiyonunda koruyuculuk sağladığını ileri süren çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir. Buna karşın olgu grupları, klinik yanıt ile IL-18(-137) ve IL-18(-607) polimorfizimi açısından karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak korelasyon bulunmamıştır. Sonuçlar Hirankarn tarafından yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumludur.

Hepatit B enfeksiyonunun bireyler arasında farklı klinik sonuçlara yol açmasının etiolojisinde immünogenetik etkileşimler önemli bir basamaktır. Yapılan çalışmaların bir kısmı hepatit patogenizinde yer alan sitokinlere ait gen polimorfizimlerinin hepatit B enfeksiyonunda önemli bir prediktif ve/veya prognostik belirteç olabileceğini desteklerken, diğer çalışmalar bu görüşü desteklememektedir. Çalışmaların sonuçlarının farklı olması; sitokin ağının kompleks yapısı, incelenen popülasyonun sınırlı sayıda olması ve hastaların

demografik özelliklerinin değişken olması ile ilişkili olabilir. Sonuç olarak sitokinlerin genetik profillerinin klinik yanıtta etkisinin ortaya çıkarılması, HBV ile enfekte olan hastalarda klinik gidişin önceden tespit edilmesine olanak sağlayarak, tanı ve tedavide yeni yaklaşımlara destek olacaktır. Kronik hepatit B enfeksiyonunun tedavisindeki yan etkiler ve maliyet dikkate alındığında klinik progresyonunun ön görülebilmesi, tedavi planlanan hastaların belirlemede klinisyenleri yönlendirecektir. Ayrıca kompleks bir mekanizmaya sahip olan ve dünya genelinde yaygınlığı bilinen hepatit B enfeksiyonunun immunopatogenezinin anlaşılması kapsamında ilgili sitokinlere ait gen polimorfizimlerinin belirlenmesi, tanı ve/veya tedavi protokollerine yeni ufuklar sağlayacaktır. Bu nedenle hepatit immünopatogeneziyle ilişkili sitokinlere ait gen polimorfizimleri ile klinik gidiş arasındaki korelasyonu araştıran çok merkezli ve geniş kitleleri içine alan çalışmaların ülkemizde yapılması gerekmektedir.

ÖZET

Hepatit B Virüsü ile Enfekte Olan Hastalarda Klinik Gidiş ile TNF α , IFN γ , IL-10, IL-17, ve IL-18 Gen Polimorfizimleri Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi

Hepatit B Virüsü ile karşılaşan bazı hasta gruplarında enfeksiyon kontrol altına alınırken diğerlerinde asemptomatik taşıyıcılıktan siroz veya hepatosellüler karsinoma kadar değişen klinik sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Hücresel ve humoral immün yanıt ile yakından ilişkili bu kompleks hastalıkta sitokinlerin, virüsün oluşturacağı hastalık tipini ve sonucunu belirlemede oldukça önemli olduğu rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda bireyler arasındaki klinik yanıtların farklılığı, sitokin üretiminde veya kapasitesinde varyasyonlara neden olan ilgili genlerde tanımlanan polimorfizimlere bağlanmıştır. Farklı etnik gruplar arasında yapılan çalışmalar klinik sonuçlar ile sitokin gen polimorfizimleri arasında ilişki olduğunu desteklerken diğer çalışmalar bu görüşü desteklememektedir. Hepatit B enfeksiyonunun immünopatogenezinin anlaşılmasındaki zorluklardan kaynaklanan nedenlerle tam bir görüş birliği sağlanamasa da hepatit B enfeksiyonuna karşı oluşan konak immün yanıtındaki dinamik etkileşimler güncelliğini korumaya devam etmektedir.

Bu projede, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğine Eylül 2009 - Mart 2010 tarihleri arasında başvurarak hepatit B enfeksiyonu tanısı alan 75 hasta ile hepatit B virüsü ile karşılaşmamış bireylerin oluşturduğu 50 kişilik kontrol grubuna ait periferik venöz kan örnekleri kullanılmıştır. Bu örneklerden DNA izolasyonu yapılarak TNF α , IFN γ , IL-10, IL-17 ve IL-18 ile ilişkili gen polimorfizimleri real-time PCR ile belirlenmiştir. Kronik aktif hepatit B hasta grubunda IL-10 (-592) gen polimorfizimi ile hepatit B enfeksiyonunun kronikleşmesi arasında korelasyon belirlenirken ($p=0.049$) TNF α , IFN γ , IL-17 ve IL-18 gen polimorfizimleri ile klinik gidiş arasında korelasyon belirlenmemiştir.

Bu sonuçlar, hepatit B enfeksiyonunun bireyler arasında farklı klinik yanıtlara yol açmasının sebeplerinden biri olarak ilgili sitokinlere ait gen polimorfizimlerinin rol oynayabildiğini göstermiştir. Ayrıca dünyanın farklı bölgelerinde değişik ırklar arasında yapılan çalışmaların sonuçları ile karşılaştırıldığında ülkemizde çok merkezli ve geniş kitleleri içine alan çalışmalara ihtiyaç olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Hepatit B enfeksiyonu, gen polimorfizimleri, gerçek-zamanlı PCR, TNF α , IFN γ , IL-10, IL-17, IL-18,

SUMMARY

The Determination of Relation Between TNF α , IFN γ , IL-10, IL-17, IL-18 Gene Polymorphisms and Clinical Course of Patient Which Infected with Hepatitis B Virus.

While the infection can be gotten under the control in certain patient groups which are come down with Hepatitis B virus, in the others, different clinic results are appear like asymptomatic transporter, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. It had been reported that cytokines are thought to be very important in determining the type of disease and in the results induced by virus at this complex illness which is closely related with cellular and humoral immunity. Limited number of study had been showed that, differences of clinic response between the individuals had been associated with polymorphism which is identified in related gene that cause of variation on production and capacity of cytokine. While some of studies that performed among the varied ethnic groups in the different region of the world are supporting the correlation between clinic results and cytokine gene polymorphism, the other part of study are not supporting. Ever if a consensus had been created due to hardness of understanding the immunopathogenesis of Hepatitis B, dynamic interactions that is being due to host immune responses against Hepatitis B and detection of mechanism that is be exposed the different clinic result are be continues to keep up to date.

This project was included 50 patients that was turned to Süleyman Demirel University Research Hospital, Polyclinic of Infection Diseases and was diagnosed Hepatitis B, and peripheral vein blood specimens belongs to 75 control groups which are infected Hepatitis B. Gene polymorphisms associated with TNF α , IFN γ , IL-10, IL-17 and IL-18 was determined by DNA isolation from specimens. It had been detected that there is a correlation between IL-10(-592) gene polymorphism and chronicity of hepatitis b infection in the chronic active hepatitis B patient group ($p=0.049$) but, there is no correlation between TNF α , IFN γ , IL-17, IL-18 gene polymorphisms and clinical prognosis.

These results were revealed that one of the reasons for different clinic response to infection of hepatitis B among the individuals is gene polymorphism belong to cytokine. Moreover, before pass the clinical using and application this study was also revealed that when compared with studies performed among different races in varied region of world, there are needed the studies with multi center and involved wide crowd in our country.

Key Words: Hepatitis B infection, TNF α , IFN γ , IL-10, IL-17, IL-18, gene polymorphisms, real-time PCR.

KAYNAKLAR

1. Dündar İH, İnal S. Geçmişten Günümüze Viral Hepatitler. In: Tabak F, Balık İ, Tekeli E (Eds). *Viral Hepatit 2005*. 1. Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2005:10-20.
2. Mehmet K. Hepatit B Virüsü. In: Tekeli E, Balık İ (Eds). *Viral Hepatit 2003*: 1.Baskı. Ankara: Viral hepatitle Savaşım Derneği, 2003: 90-91.
3. Christoph S, William SM. Hepatitis B Virus Biology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64(1):51-68.
4. Chisari FV, Ferrari C. Viral Hepatitis. In: Nathanson N, Ahmed R, Brinton MA (Eds). *Viral Pathogenesis*. 2 nd Ed. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1997:745-778.
5. Robinson WS. Hepatitis B virus and hepatitis D virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th Ed. New York: Churchill Livingstone, 2005:1652-1685.
6. Birengel S, Tekeli E. Kronik Hepatit B'de Epidemiyolojik, Virolojik, Fizyopatolojik ve Klinik Özellikler, Tanımlamalar. In: Köksal İ, Leblebicioğlu H (Eds). *Kronik Viral Hepatitlerin Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar*. 1. Baskı. Ankara: Bilimsel Tıp, 2007:11-21.
7. Badur S. Hepatit A, B ve D Virusları In: Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S (Eds). *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*. 1. Baskı. Ankara: Güneş, 2004:175-202.
8. Murray JM, Purcell RH, Wieland SF. The half-life of hepatitis B virions. *Hepatology* 2006; 44:1117-1121.
9. Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:4398-4402.
10. Seyec JL, Chouteau P, Cannie I. Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity. *J Virol* 1998; 72:5573-5578.
11. Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 2007; 13:22-38.
12. Akçam FZ. Hepatit B Virüsü Enfeksiyonu. *Sted*. 2003;12 (6):211-214.
13. Cooper A, Paran N, Shaul Y. The earliest steps in hepatitis B virus infection. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1614(1):89-96.
14. Ustaçelebi Ş, Ergünay K. Hepatit B virusunun moleküler virolojisi In: Tekeli E, Balık İ, Tabak F (Eds). *Viral hepatit 2007*. 1. Baskı. Ankara: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2007: 96-107.
15. Horvat RT, Tegtmeier GE. Hepatitis B and D viruses. In: Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th Ed. Washington DC: ASM, 2008:1641-1659

16. Özacar T. Hepatit B virusu. In:Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp, 2008:1882-1904.
17. Sünbül M, Leblebicioglu H. Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. *World J Gastroenterol*. 2005;11:1976-1980.
18. Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999; 6:299-304.
19. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118:554-559.
20. Friedt M, Gerner P, Lausch E, Trubel H. Mutations in the basic core promotor and the precore region of hepatitis B virus and their selection in children with fulminant and chronic hepatitis B. *Hepatology* 1999; 29:1252-1258.
21. Lok AS, Akarca U, Greene S. Predictive value of precore hepatitis B virus mutations in spontaneous and interferon-induced hepatitis B e antigen clearance. *Hepatology* 1995;21:19-24.
22. Bozkaya H. High rate of mutations in the hepatitis B core gene during the immune clearance phase of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1996;24:32-37.
23. Sheldon J, Rodes B, Zoulim F, Bartholomeuzs A . Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2006; 13: 427-34.
24. Taşyaran MA. HBV Enfeksiyonu epidemiyolojisi. In:Tekeli E. Balık İ (Eds). *Viral Hepatit 2003*: 1.Baskı. Ankara: Viral hepatitle Savaşım Derneği, 2003:121-128.
25. Bertoletti A, Kennedy P, Gehring Adam J. Role of the Immune Response in Hepatitis B. In: Gershwin EM, Vierling E, John M, Manns MP (Eds). *Liver Immunology*.5 th Ed. New Jersey: Human Press, 2007;179-193.
26. Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin.Liver Dis*. 2007; 27:339-350.
27. Chang KM. Hepatitis B and the Immune System. *Curr Hepatitis Rep*. 2010; 9:205–213.
28. Ratnam D, Visvanathan K. New concepts in the immunopathogenesis of chronic hepatitis B: the importance of the innate immune response. *Hepatol Int* 2008; 2:12–18.
29. Thursz RM, Thomas CH. Pathogenesis of chronic hepatitis B. In: Thomas H, Lemon S, Zuckerman A (Eds). *Viral hepatitis*. 3th Ed. Massachusetts: Blackwell Publishing. 2005:308-322.
30. Guidotti GL, Chisari VF. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2006; 1:23-61.
31. Chisari VF, Isogawa M, Wieland FS. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathologie Biologie*. 2010; 58:258-266.

32. Wang SF, Zhang Z. Host immunity influences disease progression and antiviral efficacy in humans infected with hepatitis B virus. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009; 3(5):499-512.
33. Dunn C, Peppas D, Khanna P. Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. *Gastroenterology.* 2009;137: 1289-1300.
34. Boonstra A, Woltman MA, Janssen LAH. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Best Practise&Research Clinical Gastroenterology.*2008; 22(6):1049-1061.
35. Webster GJ, Reignat S, Brown D. Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J Virol.* 2004; 78:5707–5719.
36. Tsai TH, Tsai HT, Lu MT, Yang CC. Immunopathology of Hepatitis B Virus Infection. *International Reviews of Immunology.* 2008; 27:427-446.
37. Mondelli UM. Immunopathogenesis of Viral Hepatitis. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology.* 2000;18:141-165.
38. Taşyaran MA. Hepatit B Enfeksiyonunda Klinik In: Tekeli E, Balık İ, Tabak F (Eds). *Viral Hepatit 2007.* 1. Baskı. Ankara: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2007:118-119.
39. Çelik İ, Akbulut A. Kronik Hepatit B ve Delta Hepatitinin Doğal Seyri. In: Köksal İ, Leblebicioğlu H (Eds). *Kronik Viral Hepatitlerin Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar.* 1. Baskı. Ankara: Bilimsel Tıp, 2007: 25-39.
40. Asabe S, Wieland FS, Chattopadhyay KP, Roederer M, Engle ER, Purcell HR, Chisari VF. The Size of the Viral Inoculum Contributes to the Outcome of Hepatitis B Virus Infection. *Journal of Virology.* 2009;9652–9662.
41. Clipping AJ, Gearhart TL, Bouchard MJ. Hepatitis B virus X protein modulates apoptosis in primary rat hepatocytes by regulating both NF-κB and the mitochondrial permeability transition pore. *J. Virol.* 2009; 83:4718-4731.
42. Lopes AR, Kelam P, Das A. Bim-mediated deletion of antigen specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection. *J Clin Invest.* 2008;118:1835-1845.
43. Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, Amadei B, Vincenzo DP, Giuberti T. Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Specific T-Cell Dysfunction in Chronic HBV Infection. *Journal of Virology.* 2007;81(8); 4215–4225.
44. Chong WP, To YF, Ip WK, Yuen MF, Poon TP, Wong WH. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005; 42:1037–1045.
45. Thio CL, Mosbruger T, Astemborski J, Greer S, Kirk GD, O'Brien SJ. Mannose binding lectin genotypes influence recovery from hepatitis B virus infection. *J Virol.* 2005;79:9192–9196.
46. Özsan M. HBV Enfeksiyonunda Mikrobiyolojik Tanı. In: Tekeli E, Balık İ, Tabak F (Eds). *Viral hepatit 2007.* 1. Baskı. Ankara: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2007:124-134.

47. Servoss JC, Friedman LS. Serologic and molecular diagnosis of hepatitis B virus. *Infect Dis Clin N Am*. 2006; 20: 47-61.
48. Kurt H. Hepatit B Virus İnfeksiyonu. In: Tekeli E, Balık İ (Eds). *Viral Hepatit 2003*. 1. Baskı. Ankara: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2003: 129-134.
49. Pearson H. Genetics: what is a gene? *Nature*. 2006; 441: 398-401.
50. Nussbaum RL., McInnes RR., Willard HF., Boerkoel CF. In: Thompson&Thompson, *Genetics in Medicine*, 6th ed. Saunders, 2001.
51. Gregory SG, Barlow KF, McLay KE. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature*. 2006; 441: 315-321.
52. Griffiths JFA. Genetic variation. In: Griffiths JFA, Miller HJ, Suzuki DT, Lewontin CR, Gelbart MW (Eds). *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th Ed. New York: W. H. Freeman, 2000: 110-133.
53. Devrim KA, Kaya N. Genetik Polimorfizm ve Mikrosatelitler. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 2004; 10(2): 215-220.
54. Eroğlu C. Tüberküloz tanısında PCR. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun: 2003; 312-316.
55. Hugichi R, Focklern C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*. 1993; 11 (9):1026-1030.
56. Lay J M, Wittwer TC. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem*. 1997; 43(12):2262-2267.
57. Klein D. Quantification Using Real-Time PCR Technology Applications. *Trend Mol Med*. 2002; 8 (6):257-260.
58. Nauck M, Wieland H, Marz W. Evaluation of the Roche Diagnostics LightCycler-Apo B 3500 Mutation Detection Kit. *Chem Lab Med*. 2000; 38(7):667-671.
59. Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2007; 27:763-767.
60. Caplin EB, Rasmussen PR, Bernard SP, Wittwer TC. LightCycler Hybridization Probes. Roche Molecular Biochemicals. 1999; 1: 5-8.
61. Klein D. Quantification Using Real-Time PCR Technology Limitations. *Trends Mol Med*. 2002; 8(6):260-264.
62. Kılıçturgay K. İmmünolojiye Giriş. In: Kılıçturgay K (Eds). *İmmünoloji*. 2.Basım. Bursa: Güneş Kitabevi, 1991: 1-150.
63. Deniz G. Sitokin salgılanması ve sitokin reseptörlerinin ekspresyonu. In: Camcıoğlu Y, Deniz G (Eds). *Temel İmmünoloji*. 1. Baskı. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, 2007:93-94.

64. Secombes JC, Kaiser P. The phylogeny of cytokines. In: Thomson WA, Lotze TM (Eds). *The Cytokine handbook*. 4th Ed. North Yorkshire: Academic Press, 2003:57-85.
65. Sente EB. Cytokine signaling. In: Thomson WA, Lotze TM (Eds). *The Cytokine handbook*. 4th Ed. North Yorkshire: Academic Press, 2003:85-103.
66. Oppenheim JJ, Ruscetti FW. Cytokines. In: Parslow TG, Stites DP, Terr AI (Eds). *Medical Immunology*. 10th Ed. International Edition: Mc Graw-Hill Companies, 2001: 148-166.
67. Falasca K, Ucciferri C, Dalessandro M. Cytokine Patterns Correlate with Liver Damage in Patients with Chronic Hepatitis B and C. *Ann Clin Lab Sci* 2006; 36:144-150.
68. Kamal S, Ismai MI, Shaker H, Moustafa H. Serum and Intrahepatic Cytokine Patterns in Hepatitis B and C. *Egypt J Med Lab Sci*. 2003; 12:1-13.
69. Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiya Y, Kitajima K, Nakao K, Daikoku M, Yatsunami H, Koga M, Yano M, Eguchi K. Influence of Interleukin-10 Gene Promoter Polymorphisms On Disease Progression in Patients Chronically Infected with Hepatitis B Virus *Gastroenterol*. 2002; 97: 2086-2092.
70. Du T, Guo XH, Zhu XL, Li JH, Lu LP, Gao JR, Gou CY, Li Z, Liu Y, Li H. Association of Tnf-Alpha Promoter Polymorphisms with the Outcomes of Hepatitis B Virus Infection in Chinese Han Population. *J Viral Hepat*. 2006; 13: 618-624.
71. Baştürk B, Karasu Z, Kılıç M, Ulukaya S, Boyacıoğlu S, Oral B. Association of Tnf-Alpha -308 Polymorphism with the Outcome of Hepatitis B Virus Infection in Turkey. *Infect Gene Evol*. 2008; 8:20-25.
72. Jeng JE, Tsai JF, Chuang LY, Ho MS, Lin ZY, Hsieh MY, Chen SC, Chuang WL, Wang LY, Yu ML, Dai CY, Chang JG. Tumor Necrosis Factor-Alpha 308.2 Polymorphism is Associated with Advanced Hepatic Fibrosis and Higher Risk for Hepatocellular Carcinoma. *Neoplasia*. 2007; 9:987-992.
73. Ben-Ari Z, Mor E, Papo O, Kfir B, Sulkes J, Tambur AR, Tur-Kaspa R, Klein T. Cytokine Gene Polymorphisms in Patients Infected with Hepatitis B Virus. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98: 144-150.
74. Liu M, Cao B, Zhang H, Dai Y, Liu X, Xu C. Association of Interferon-Gamma Gene Haplotype in The Chinese Population with Hepatitis B Virus Infection. *Immunogenetics*. 2006; 58:859-864.
75. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity*. 2004; 21: 467-476.
76. Antonyam AM, Numasaki M. Interleukin-17 Family. In: Thomson WA, Lotze TM (Eds). *The Cytokine handbook* 4th Ed. North Yorkshire: Academic Press, 2003: 475-503.
77. Hou W, Seok KH, Byung SK. Th17 cells enhance viral persistence and inhibit T cell cytotoxicity in a model of chronic virus infection. *J. Exp Med*. 2009; 2: 313-328.

78. Arababadi KM, Pourfathollah AA, Jafarzadeh A, Hassanshahi G. Serum Levels of IL-10 and IL-17A in Occult HBV-Infected South-East Iranian Patients. *Hepatitis Monthly* 2010; 10(1): 31-35.
79. Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-18 Inhibits Hepatitis B Virus Replication in the Livers of Transgenic Mice. *J Virol.* 2002; 76: 10702-10707.
80. Hirankarn N, Manonom C, Tangkijvanich P, Poovorawan Y. Association of Interleukin-18 Gene Polymorphism (-607a/A Genotype) with Susceptibility to Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Tissue Antigens.* 2007; 70: 160-163.
81. Kim YJ, Lee HS, Yoon JH, Kim CY, Park MH, Kim LH, Park BL, Shin HD. Association of Tnf-Alpha Promoter Polymorphisms with the Clearance of Hepatitis B Virus Infection, *Hum Mol Genet.* 2003;12: 2541-2546.
82. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson V. A Single Nucleotide Polymorphism in the First Intron of the Human Ifn-Gamma Gene: Absolute Correlation with A Polymorphic Ca Microsatellite Marker of High Ifn-Gamma Production. *Hum Immunol.* 2000; 61: 863-866.
83. Cheong JY, Cho SW, Chung SG, Lee JA, Yeo M, Wang HJ, Lee JE, Hahm KB, Kim JH. Genetic Polymorphism of Interferon-Gamma, Interferon-Gamma Receptor, and Interferon Regulatory Factor-1 Genes in Patients with Hepatitis B Virus Infection. *Biochem Genet.* 2006; 44: 246-255.
84. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and Related Cytokines and Receptors. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 929-979.
85. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson V. An Investigation of Polymorphism in the Interleukin-10 Gene Promoter. *Eur J Immunogenet.* 1997; 24: 1-8.
86. Lu YL, Wu X, Huang HL, Dai LC. Allele Polymorphisms of Interleukin-10 and Hepatitis B, C Virus Infection. *Chin Med J.* 2010; 123:1338-1344.
87. Gao QJ, Liu DW, Zhang SY, Jia M, Wang LM, Wu LH, Wang SY, Tong LX. Polymorphisms of Some Cytokines and Chronic Hepatitis B And C Virus Infection., *World J Gastroenterol.* 2009; 15: 5610-5619.
88. Jiang G, Ye Y, Xie X, Yu J, Zhou L, Xie H, Zhang W, Wu J, Zheng S. Involvement of Th17 and Th1 effector responses in patients with hepatitis B. *J Clin Immunol.* 2010;30(4):546-555.
89. Xu Y, Du WJ, Qin LY, Xing ZZ, Qin XH, Chen SJ. Expression of Interleukin-17 in Hepatitis B Related Liver Fibrosis. 2009;25;133-135.
90. Yasumi Y, Takikawa Y, Endo R, Suzuki K. Interleukin-17 As A New Marker Of Severity of Acute Hepatic Injury. *Hepatol Res.* 2007; 37: 248-254.
91. Giedraitis V, He B, Huang WX, Hillert J. Cloning and Mutation Analysis of the Human IL-18 Promoter: A Possible Role of Polymorphisms in Expression Regulation. *J Neuroimmunol.* 2001;112: 146-152.

92. Migita K, Sawakami-Kobayashi K, Maeda Y, Nakao K, Kondoh S, Sugiura M, Kawasumi R, Segawa O, Tajima H, Machida M, Nakamura M, Yano K, Abiru S, Kawasaki E, Yatsuhashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Interleukin-18 Promoter Polymorphisms and the Disease Progression of Hepatitis B Virus-Related Liver Disease. *Transl Res.* 2009; 153: 91-96.
93. Zhang PA, Wu JM, Li Y, Yang XS. Association of Polymorphisms of Interleukin-18 Gene Promoter Region with Chronic Hepatitis B in Chinese Han Population. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 1594-1598.