

T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HEPATİT B HASTALARINDA REGÜLATÖR T
HÜCRE VE SEKRETE ETTİĞİ SİTOKİN
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR. YEŞİM TUYJİ TOK

DOÇ. DR. ASLI GAMZE ŞENER
YRD. DOÇ. DR. AYŞEGÜL AKSOY GÖKMEN

İZMİR
NİSAN-2017

**T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HEPATİT B HASTALARINDA REGÜLATÖR T HÜCRE
VE SEKRETE ETTİĞİ SİTOKİN DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. YEŞİM TUYJİ TOK**

**DOÇ. DR. ASLI GAMZE ŞENER
YRD. DOÇ. DR. AYŞEGÜL AKSOY GÖKMEN**

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2016-TDU-TIPF-0014 proje numarası ile desteklenmiştir.

**İZMİR
NİSAN-2017**

T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HEPATİT B HASTALARINDA REGÜLATÖR T HÜCRE VE
SEKRETE ETTİĞİ SİTOKİN DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

TEZİ HAZIRLAYAN
Dr. Yeşim TUYJİ TOK

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma tarafımızca incelenerek her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aslı Gamze ŞENER

İKÇÜ Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Yrd. Doç. DR. Ayşegül AKSOY GÖKMEN

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye: Prof. Dr. Aydan ÖZKÜTÜK

İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof.Dr. Galip AKHAN
Tıp Fakültesi Dekanı

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim sürecinde değerli deneyimlerini, bilgilerini ve emeğini esirgemeyen, kendileriyle çalışmaktan kıvanç duyduğum başta tez danışmanım Doç. Dr. Aslı Gamze ŞENER olmak üzere saygıdeğer hocalarıma;

Tez olarak sunduğum bu çalışmanın gerçekleşmesi aşamasında her zaman danışabildiğim, desteğine ve yardımına başvurduğum değerli hocam Prof. Dr. Selçuk KAYA'ya;

Mesleki olarak daha kıdemli olmasına rağmen kendisini tanıma fırsatı bulduğum zaman içinde, güvenilir iyi bir dost da edindiğimi hissettiren sevgili meslektaşım Yard. Doç. Dr. Ayşegül AKSOY GÖKMEN'e;

Önce insan sonra da hekim olarak yetişmemde büyük emekleri geçmiş olan, kendime örnek aldığım ilkokuldan üniversite sonuna kadarki tüm hocalarıma;

Ailemden fazla zaman geçirdiğim, birlikte çalışmaktan büyük zevk duyduğum değerli mesai arkadaşlarıma;

Hayatımın her safhasında sonsuz fedakarlığı ve sevgisiyle hep yanımda olan anneme ve hem eşim hem en yakın arkadaşım Uzm Dr. Toygun TOK'a yürekten teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|--------------|
| ÖNSÖZ | V |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | VIII |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | XI |
| TABLolar DİZİNİ | XII |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 2 |
| 2.1. Epidemiyoloji | 2 |
| 2.2. HBV'nin Genel Özellikleri | 3 |
| 2.3. HBV'nin Yapısı ve Proteinleri | 3 |
| 2.4. HBV Genom Organizasyonu | 4 |
| 2.5. Hepatit B Mutasyonlarının Tanısal ve Klinik Önemi | 7 |
| 2.6. Hepatit B Serolojisi, Kantitatif Serolojik Testler ve Avidite | 8 |
| 2.7. Atipik Serolojik Profiller | 13 |
| 2.8. Moleküler Tanı | 15 |
| 2.9. Hepatit B Kliniği ve Evrelemesi | 16 |
| 2.10. İmmün Sistem ve T regülatör Hücreleri | 19 |
| 2.11. Hepatit B Patogenezi ve İmmunolojisi | 27 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 33 |
| 3.1. Etik Kurul ve Proje Destek Onayı Bilgileri | 33 |
| 3.2. Hasta Seçimi ve Hasta Grubu Materyalleri | 33 |
| 3.3. Kan alımı ve örnek hazırlanması | 34 |
| 3.4. Flow sitometrik ölçüm | 34 |
| 3.5. Kantitatif IL-10 sitokin ölçümü | 36 |
| 3.6. İstatistiksel değerlendirme | 37 |
| 4. BULGULAR | 38 |

| | |
|---------------------|----|
| 5.TARTIŞMA VE SONUÇ | 47 |
| 6. ÖZET-SUMMARY | 56 |
| 7. KAYNAKLAR | 60 |



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AASLD: American Association for the Study of Liver Disease

ADCC: Antikor aracılı selüler sitotoksisite

AFP: α -feto protein

AHB: Akut hepatit B

ALP: Alkalen fosfataz

ALT: Alanin aminotransferaz

APC: Antijen sunan hücre

APTZ: Aktive parsiyel protrombin zamanı

AST: Aspartat aminotransferaz

cccDNA: Covalently closed circular DNA

CCR: Kemokin reseptörü

CD: Cluster of differentiation, ayırım kümesi

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CTL: Sitotoksik T lenfosit

CTLA: CytotoxicT-lymphocyte antigen

DH: Dentritik hücre

EASL: European Association for the Study of the Liver

EIA: Enzim immuno assay

ESR: Eritrosit sedimentasyon hızı

FoxP3: Transcription factor forkhead box P3

FRET: Florescence Resonance Energy Transfer

GGT: Gama glutamil transferaz

GITR: Glucocorticoid-induced TNFR-related protein

HAI: Hepatic activity index

HBIg: Hepatit B immünglobulini

HBsAg: Hepatit B yüzey antijeni

HBV: Hepatit B virüsü

HRP: Horse radish peroxidase

HSK: Hepatosellüler karsinom

ICAM: Intercellular adhesion molecule

IL-7Ra: Interleukin-7 receptor alpha

INR: International normalized ratio

KHB: Kronik hepatit B

LDH: Laktat dehidrogenaz

MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry

NPD: Negatif prediktif değer

NK: Doğal öldürücü hücre

ORF: Open reading frames

PAMP: Pathogen-associated molecular patterns

PBS: Phosphate buffer saline

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

Peg IFN: Pegylated interferon

PerFix nc: Permeabilizing-fixative no centrifuge assay kit

PPD: Pozitif prediktif değer

PZ: Protrombin zamanı

RFLP: Restriction fragment lenght polimorphism

RFMP: Restriction fragment mass polimorphism

SLE: Sistemik lupus eritematozus

Tbil: Total bilirubin

TCR: T hücre reseptörü

Th: Yardımcı T hücresi

Tfreg: Foliküler regülatör T hücre

TLR: Toll-like reseptör

TMB: Tetramethylbenzidine

TNFR: Tümör nekroz faktörü reseptörü

Treg: Regülatör T hücre

WHO: World Health Organization

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1 Treg hücre maturasyonu ve alt grupları

Şekil-2 Hepatit B patogenezi

Şekil-3 Treg hücre yüzdelerinin flowsitometrik ölçümü



TABLolar DİZİNİ

Tablo-1 Hasta ve Kontrol Grupları Cinsiyet, Yaş Dağılımları

Tablo-2 Hepatit B Hasta Gruplarının Bulaş Yolları

Tablo-3 Hasta Grupları Meslek Dağılımları

Tablo-4 Hepatit B Hasta Gruplarının Klinik Bulguları

Tablo-5 Hepatit B Hasta Grupları

Tablo-6 Çalışma Grupları Treg ve IL-10 Düzeyleri

Tablo-7 Çalışma Grupları Treg ve IL-10 Düzeyleri Box-Plot Grafiği

Tablo-8 Biyokimyasal Belirteçlerin, HBV DNA Yüğü ve HAI Evreleme Düzeylerinin Hasta Grupları İçinde Karşılaştırılması

Tablo-9 Spearman Korelasyon Analiziyle Değerlendirilen Hasta Verilerinde Pozitif İlişki Gözlenen Parametreler

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepadnaviridae ailesinden, Hepatit B virüsü (HBV) akut ve kronik hepatite neden olabilen non-sitopatik, hepatotropik, kısmen çift ipçikli bir DNA virüsüdür (1,2).

Viral hepatitlerin doğal seyri çiçek aşısı kampanyası sonrasında gelişen 'ikterus epidemisi' ile ilk kez 1885 yılında Lurman tarafından tanımlanmıştır. O günlerde; sarı-humma aşısında olduğu gibi, aşı stabilizasyonu amacı ile aşılara insan serumlarının eklenmesi yaygın bir uygulama olup en büyüğü 1942 yılında Amerikan ordusunda 50 bin kişinin etkilendiği olmak üzere çok sayıda hepatit salgınlarına yol açmıştır. 1967 yılında Saul Krugman'ın hepatite neden olan iki farklı patojen olduğunu öne sürmesine rağmen, tüm bunlardan habersiz genetik farklılıklar üzerinde immünolojik yöntemlerle çalışan Brauch Blumberg ve arkadaşlarının Avustralya yerlilerinin kanında sıkça bulunan bir antijen olan Avustralya antijenini (AuAg) keşfi, viral hepatit alanında modern araştırmaların başlamasına yol açmıştır. İlerleyen yıllarda HBsAg (hepatit B yüzey antijeni) adını alacak olan bu antijen hepatit B için ilk spesifik belirteç olmuştur (3). Bu gün gelinen noktada çalışmalar, hepatit B hastalığının seyri ve tedavi stratejilerinde birincil olarak etkili olan HBV-immün sistem ilişkilerini ortaya koymaya, bu yolaklarda görev alan aracı moleküllerin ve özellikle de son on yılda tanımlanan, immünsupresif regülatör T hücrelerin rolünü anlamaya yöneliktir.

İKÇÜTF Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'nda yürütülen bu tezin amaçları; klinik olarak tanı alan Hepatit B hastalarının periferik kan Treg hücre ve sekrete ettikleri IL-10 sitokin düzeylerini saptayarak sonuçları kontrol grubuyla karşılaştırmak, HBV spesifik T hücre yanıtını baskılayarak karaciğer doku hasarını ve inflamasyonunu azaltan Treg (regülatör T hücre) hücrelerinin ve ilişkili sitokinlerin düzeylerinin birlikte değerlendirilmesinin; yalnız patogeneizde değil hastalığın ağırlığını, seyrini ve tedaviye yanıtını gösterebilecek kullanışlı bir marker olup olmayacağını belirlemektir. Ayrıca, hepatit B enfeksiyonlarının akut, kronik ve anti-viral tedavi süreçlerinde Treg seviyelerinin izlemi bu hücrelerin fonksiyon modülasyonunu hedefleyen yeni tedavi stratejilerinin gelişimine ışık tutacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epidemiyoloji

Karaciğer hastalıklarının başlıca nedenlerinden biri olan Hepatit B virüsü (HBV); karaciğerin akut veya kronik enflamasyonuna neden olarak, kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinomaya (HSK) yol açan önemli sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir (4,5). Dünya’da 240 milyon kişinin kronik hepatit B taşıyıcısı olduğu, her yıl 620 bin hastanın karaciğer sirozu, HSK gibi geç komplikasyonlar nedeniyle kaybedildiği bildirilmektedir (3).

Tüm dünya popülasyonunun yarısının HBV’nin endemik olduğu bölgelerde (Güneydoğu Asya, Sahra altı Afrika ve Orta Amerika) yaşadığı ve HBsAg pozitifliğinin %8’den fazla olduğu bilinmektedir (6). Ülkemizde HBsAg pozitifliği oranı bölgeden bölgeye değişmekle birlikte ortalama %4’tür (Ege Bölgesi’nde %1.4) ve hepatit B açısından orta düzeyde endemik bölgede yer almaktadır (7). HBV, başlıca kan yolu ile bulaşan bir patojen olup 1 ml kanda 1 milyondan fazla sayıda enfeksiyöz partikül bulunabilir (6). Kontamine iğnelerle 100 virüs partikülünün bulaşması HBV enfeksiyonunun gelişimi için yeterlidir (8).

Günümüzde, kronik hepatit B tedavisinde; antiviral, antiproliferatif ve immünmodülatör etkili, subkutan uygulanan interferon- α ve pegylated interferon (Peg IFN) yanında, oral antiviraller olan nükleozid analogları; lamivudin, entekavir ve telbivudin, nükleotid analogları; adefovir ve tenofovir onaylı ilaçlar olup HBV revers transkriptazını inhibe ederek HBV replikasyonunu baskılamalarına, karaciğerde enflamasyonu azaltmalarına, hastalığın progresyonunu yavaşlatmalarına ve karaciğer hastalığının remisyonunu sağlamalarına rağmen kronik hepatit B için henüz virüsün eradikasyonunu sağlayacak bir tedavi bulunamamıştır (9,10). Yeni sınıf HBV ilaçlarının gelişimi için olası tedavi hedeflerini belirlemede; HBV patogenezinin doğal seyrini, HBV replikasyonunu, polipeptid üretimini, morfogenezini bir başka deyişle yaşam siklusunu ve biyolojisini detaylı bir şekilde anlamak kritik önem taşımaktadır.

2.2. HBV'nin Genel Özellikleri

HBV, *Hepadnaviridae* ailesinden RNA aracılığı ile replike olan ve konak genomuna integre olabilen, alışılmadık şekilde retrovirüslere benzeyen özellikler gösteren, küçük DNA virüsüdür. HBV replikasyonunun kendine özgü ve farklı özelliği, virüsün enfekte hücrelerde kalıcılığıdır (11). Genetik olarak farklılığın %8'den fazla olmasına dayanılarak tanımlanan genotiplere en son Vietnam'da ve Japonya'da izole edilen I ve J genotipleri eklenerek genotip (A-J) sayısı 10'a yükselmiştir. Tüm genomda genetik farklılıkların %4-8 arasında olmasına göre genotipler kendi içlerinde tekrar subgenotiplere ayrılmıştır. HBV genotipleri ve subgenotipleri farklı coğrafi dağılıma sahiptir; buna göre Avrupa ve Amerika'da genotip A, Amazon bölgesi ve Peru gibi yüksek HBV prevalanslı yerlerde genotip F, Doğu Asya'da genotip B ve C, ülkemizin de dahil olduğu Akdeniz havzası ve Sahra-altı Afrika'da ise genotip A ve D baskındır (12).

HBV genotip ve subgenotipleri HBeAg serokonversiyonu, HBV enfeksiyonunun doğal seyri, klinik yanıt, prognoz, antiviral yanıt ve HSK riski açısından farklılıklar göstermektedir (12,13). HBV genotipleri arasında önemli patojenik farklılıklar gözlenirken, bunun genotiplerin kor-promotör bölge ve bazal kor-promotör bölgedeki mutasyonlarla ilişkili olduğu bulunmuştur. Akut enfeksiyonu takiben A ve D genotipi ile enfekte kişilerde daha sık kronik enfeksiyona ilerleme olduğu bildirilmiştir. Kronik enfekte C ve D genotiplerinin, A ve B genotiplerine göre daha yüksek oranda ilerlemiş karaciğer hastalığına ve HSK'a neden olduğu bildirilirken, interferon bazlı tedavi yanıtları daha düşük bulunmuştur (14).

2.3. HBV'nin Yapısı ve Proteinleri

Enfekte hasta serumunda elektron mikroskopi ile Dane partikülü (42 nm), küresel (20 nm) ve tübüler (filamentöz) (22 nm çap ve değişen uzunluk) partiküller olmak üzere, 3 farklı virüs yapısı gözlenmiştir (11). Her üç partikül de ortak HBsAg yüzey antijenine sahipken, küresel ve tübüler subvirüs partikülleri genom içermeyen, bu nedenle enfekte olmayan konak hücrenin lipidlerini ve HBsAg yüzey antijenini içeren kapsid yapılarıdır (11,15). Dane partikülü (enfeksiyöz HBV viriyonu) ise

HBcAg ile kompleks oluşturmuş viral polimeraz, virüs ve DNA genomu içeren iç nükleokapsid yapısı ile bu yapıyı saran HBsAg içeren, lipid zarfla kaplı, çift katlı, 42 nm çapında küresel bir yapıdır (11). Kolestrolden zengin lipid içeriğine sahip zarf yapısı virüsün enfektivitesi için gereklidir (16). Büyük zarflı virüslere zıt şekilde, nükleokapsid, endoplazmik retikulumdan zarfını oluşturacak şekilde tomurcuklanırken; zarf üzerinde L (büyük), M (orta) ve S (küçük) olmak üzere 3 farklı yüzey glikoproteininin düzenli ve yoğunlaştırılmış biçimde dizilişlerini indükler (16,17). HBsAg'nin dolaşımında 6 aydan daha uzun süre kalması genellikle kronik enfeksiyon olarak kabul edilir ve virüsün zarf proteinlerini saptamak için en çok kullanılan ticari testtir (17).

2.4. HBV Genom Organizasyonu

HBV'nin ikozahedral nükleokapsid yapısı, 3.2 kilobaz (kb) uzunluğunda, çift-sarmallı, gevşek sirküler DNA molekülü içeren HBV genomunu kapsamaktadır (16,17). Nükleokapsid ikozahedral yapıda, 27 nm çapında 240 viral kapsid proteininin bir araya gelmesi ile oluşmuştur ve viral genom DNA'sının tek kopyası ile negatif zincirin 5' ucunda kovalent bağlanmış viral polimeraz enzimini içermektedir (11,17). Protein kinazlar gibi bazı hücrel proteinler de nükleokapsid içerisinde paketlenmiştir (17). HBV genomunun kendine özgü eşsiz özelliklerinden biri de DNA'nın iki zincirinin asimetrik yapısıdır. Negatif zincir genom uzunluğu olmasına karşın tamamlayıcı pozitif zincir farklı uzunluklarda olabilir (15). Viral genom üst üste çakışan (overlapping) ve 4 farklı proteini kodlayan S, C, P ve X açık gen okuma bölgelerini (ORF: open reading frames) içerir (11). Kodlayan bölgelerin çakışan yapıda olması HBV genomunun %150 yaralılıkla kullanılmasını sağlar (12). Dört ORF bölgesinin kodladığı proteinler: preS/S geni; L, M ve S olmak üzere 3 zarf proteini, prekor/kor geni; nükleokapsid proteini-HBcAg ve yapısal olmayan salgılanan protein-HBeAg, polimeraz geni; revers transkriptaz, RNAaz H ve terminal protein domeinleri, X geni; küçük regülatör X proteini şeklindedir.

S ve C genleri tek açık gen okuma bölgesine sahip olmasına rağmen farklı başlangıç kodonlarının bulunması nedeniyle fonksiyonel olarak farklı gen ürünleri sentezleyebilmektedirler (11,15). S ORF bölgesi, reseptöre bağlanmada asıl rol oynayan L HBsAg gibi virüs birleşmesi ve enfektivitesinde kritik önemi olan, konak

nötralizan antikorlar için de anahtar hedef S proteinini kodlar (18,19). HBsAg, HBV viriyonunun glikozile zarf proteinidir. HBsAg olgun viriyonların üzerinde olduğu gibi HBV taşıyıcılarının serumunda çok miktarda saptanan enfeksiyöz olmayan küresel ve tübüler partiküller HBsAg'den oluşmaktadır. Bu subviral partiküller olgun viriyona göre aşırı miktarda (100-100.000 kat) salgılanmaktadır (20). Küresel ve tübüler partiküllerin, Dane partiküllerinden binlerce kez daha fazla salgılanmasının nedeninin kronik enfeksiyonun gelişimi için immün sisteme tuzak olabileceği bildirilmiştir (3,15). HBsAg konak hücre genomuna tesadüfen entegre olmuş viral sekanslardan da sentezlenir. HBV DNA miktarı viral replikasyonu göstermekle birlikte, HBsAg sadece aktif cccDNA'nın mRNA'sının translasyonundan değil aynı zamanda entegre DNA'dan da üretileceğinden; HBV DNA düzeyinden farklı ama tamamlayıcı bilgi sağlayarak hastanın enfeksiyon durumunu daha iyi anlamamızı sağlar (20).

C ORF'lerince kodlanan HBeAg viral replikasyon için gerekli olmasa da persistan enfeksiyonun gelişmesi için immün-toleran gibi hareket edebilir (19,20). HBeAg düzeyi, doğal seyir sırasında kendiliğinden veya tedavi sırasında azalırsa bu yüksek replikatif durumdan düşük replikatif faza geçişin bir göstergesi olabilir (15).

P ORF bölgesi, 4 fonksiyonel domaine ayrılan büyük bir protein olan polimerazı kodlar (11). Pregenomik mRNA aynı zamanda virüsün replikasyonu için revers transkriptaz tarafından sentezlenen progeni viral DNA genomu için kalıp görevi görür. HBV polimeraz enkapsidasyonda, negatif DNA zincirinin sentezinin başlangıcında, revers transkripsiyonda ve pregenomik RNA yıkımında görevli multifonksiyonel bir enzimdir (19).

X ORF bölgesi, X mRNA translasyonu sonucunda HBxAg proteinini kodlar. HBx proteini sinyal iletimi, transkripsiyonel aktivasyon, DNA onarımı, protein yıkım inhibisyonu dahil olmak üzere HBV replikasyonunda rol oynar (11, 19). Ayrıca, HBxAg'nin in vivo prodüktif HBV enfeksiyonu için gerekli olduğu ve HBV'nin onkojenik potansiyeline katkıda bulunduğu da bildirilmiştir (11).

Hücre tropizmi gösterdiği karaciğer hücre reseptörlerine bağlanma sonrası penetrasyonun hem endositoz hem de virüs zarfının plazma zarına füzyonu şeklinde

gerçekleştiğine dair farklı mekanizmalar öne sürülmektedir. Daha sonra virüs kapsidi sitoplazmaya girer, HBV endositoz yoluyla hepatositin nükleusuna ulaşmadan önce kovalent olarak polimeraz bağlı olan kısmi çift zincirli gevşek sirküler DNA (rcDNA) içeren viral nükleokapsid sitoplazmaya salınır (21). Kapsid içerisindeki rcDNA'sı sitoplazmadaki nükleer kor kompleksi (NPC) yolu ile nükleusa taşınır (19). Nükleokapsid NPC'nin sepetinde yakalandıktan sonra kapsidin tam olarak parçalanması gerçekleşir ve rcDNA nükleoplazma içine salınır (17,21). Viral polimeraz rcDNA'nın pozitif zincirini tamamlar, negatif zincir ile eşleşilir ve her iki ucundan kovalent olarak bağlanarak sirküler, süper kıvrımlı molekülü oluştururlar (5). Her iki DNA zinciri kovalent olarak bağlanır (DNA ligasyonu). cccDNA molekülü histon ve histon-olmayan proteinler içerir ve ipliğe dizilmiş boncuk şeklinde kromatin benzeri yapıda organize olmuştur ve minikromozom olarak adlandırılır (21). cccDNA'dan tüm viral RNA'lar sentezi ve viral replikasyon için hücrel transkripsiyonel mekanizmaları kullanır. HBV pregenomik RNA (pgRNA) sitoplazmaya taşınır ve translasyonu sonucu kor protein ve viral polimeraz sentezlenirken, subgenomik RNA'ların translasyonu ile düzenleyici X proteinler ve zarf proteinleri sentezlenir. pgRNA, HBV polimeraz ve HBcAg dimerlerinin kompleks oluşturması ile HBV nükleokapsidi oluşmaya başlar. Olgunlaşmamış RNA içeren nükleokapsidden, olgunlaşmış DNA içeren nükleokapsid oluşurken defosforilasyon ve konfirmasyon değişikliği gerçekleşir (4). HBV polimeraz pgRNA'ya bağlanır bağlanmaz, polimeraz negatif DNA zincir sentezinin başlaması için protein primer olarak görev yapar. Pg RNA'nın kalıp görevi almasıyla negatif DNA zinciri sentezlenir, bu sefer negatif zincir kalıp görevi görerek pozitif zincir sentezlenir. HBV, RNA ara basamağı ile çoğalsa da, viral replikasyon için HBV DNA'nın konak genomuna integrasyonu gerekli değildir (4,15,21). Buna rağmen, HBV ilişkili HSK vakalarının tümünde integre HBV DNA saptanmıştır (22). Özellikle L proteininin nükleokapsidin zarflanmasında önemli rolü vardır ve yokluğunda nükleokapsid nükleusa gönderilerek viral genom amplifikasyonunu arttırır (4). Enfeksiyonun başında yüzey antijen düzeyi düşükken, yeni sentezlenen nükleokapsidler direkt olarak nükleusa taşınarak cccDNA havuzunun devamını sağlar, kronik hepatit B antivirallerle tedavi başarısızlığında ve hastalığın reaktivasyonunda temel faktör cccDNA'nın oldukça stabil olmasıdır (18). Zarf

proteinleri translasyon sonrasında endoplazmik retikulumdan tomurcuklanır ve öncesinde DNA içeren nükleokapsid zarfını almışsa Dane partikülü olarak hücreden salınır (15,21).

Virüs ve konak hücreyel yapılarının kompleks ilişkilerinin incelenmesi, kronik hepatit B'nin daha etkili ve yeni tedavilerinin bulunması için anahtarları içermektedir (23). HBV kendi DNA kopyasını sentezlemek için hata düzeltme (proof-reading) fonksiyonu olmayan revers transkriptazı kullandığı için doğuştan hataya yatkın olması sonucu hızla mutant genlerin ortaya çıkışına neden olabilir. Konağın immünlirensi gibi endojen, aşı, hepatit B immünglobulini (HBIG), antiviral ilaçlar gibi ekzojen nedenler 10^{11} virion/gün gibi bir hızla çoğalan virüslerde seleksiyona neden olarak kaçış mutantlarının ortaya çıkmasına sebep olacaktır. Konak hücrede bulunan HBV popülasyonunun heterojen karışımı 'quasi-species' olarak adlandırılır (24). HBV mutasyonları sonucunda hem tedavi hem de aşılama başarı oranları tehlikeye girmektedir. Nükleoz(t)id analogları ile tedavide direnç gelişimi ve aşıdan kaçan mutant virüslerin saptanması, interferon bazlı tedavilerde yüksek yan etkiler ve düşük yanıtlar gibi sorunların devam etmesi nedeniyle HBV replikasyonunun her basamağı yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesi açısından aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

2.5. Hepatit B Mutasyonlarının Tanısal ve Klinik Önemi

HBV virüs genomu birbiri üzerine binen dört genden; S, C, P, X oluşur ve oluşan mutasyonların çoğu virüsün yaşamasına olanak vermez. Bununla birlikte immün yanıtta veya revers transkriptaz inhibitörlerinden kaçabilen mutant HBV virüsleri ile de karşılaşmaktadır (25,26,27). S bölgesi 'a' determinatında yapısal değişikliğe yol açan bir mutasyon, proteinin 3 boyutlu yapısında değişiklik yapacağı için tanı kitlerinden, HBV immünoglobulinlerinden ve aşıdan kaçan suşlar oluşur, aşıli bireylere de bulaşma riski endişe vericidir (27,28). Kronik taşıyıcılar arasında HBsAg mutantlarının %6-12 arasında olduğu tahmin edilmektedir (29). Bu tür hastalarda serolojik testlerde HBsAg negatif bulunurken HBV DNA pozitif saptanır (27). Pre S bölgesi HBsAg'nin hepatositte sekresyonu ile ilişkili olduğu için mutasyonları gizli HBV enfeksiyonuna neden olabilir (30). Aynı zamanda T ve B lenfositler için epitoplara içerdiğinden özellikle interferonla tedavi edilen kronik

hastalarda delesyon şeklinde oluşan mutasyonların siroz ve HSK gelişimini arttırdığı gösterilmiştir (31,32). Polimeraz bölgesi mutasyonları özellikle nükleozid analogu ile uzun süreli tedavilerde meydana gelir. Revers transkriptaz kodlayan bölgenin S geninin 'a' determinantı ile çalışması nedeniyle antikorlara zayıf bağlanan varyant HBsAg yanında ilaç direnci de olan mutant virüsler ortaya çıkmaktadır (33,34). Bu durumun önemi özellikle antiviral tedavi sırasında gelişen mutant virüslerin aşından kaçabilmesidir. Hızlandırıcı (Enhancer) II/bazal kor promotör/prekor bölgesi mRNA ve pregenomik RNA transkripsiyonunu kodlaması yanı sıra X gen bölgesiyle çakışması nedeniyle mutasyonlarının karsinogenezi indüklediği düşünülmektedir. HBeAg ekspresyonunu etkileyen mutasyonlar görülen hastaların genellikle HBe Ag negatifken viral yükü düşük pozitifdir ancak HSK riski artmıştır (35,36).

2.6. Hepatit B Serolojisi, Kantitatif Serolojik Testler ve Avidite

HBV antijen ve antikorlarını saptamak için yüksek düzeyde hassas, spesifik ve tekrarlanabilir serolojik testler geliştirilmiştir. Antijen-antikor birleşmesine dayanan Enzim Immuno Assay (EIA) testleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Geçmişte kullanılan testlerde hiper immün hayvan serumları veya bağışık insan serumları kullanılmaktayken günümüzde fare monoklonal antikorları ya da hiperimmün serumlar ile monoklonal antikorların kombinasyonları mevcuttur. Doğal antijenler yerine de artık rekombinan antijen içeren testler kullanılmaktadır. Geçmişte renklendirici uç nokta ve horseradish peroksidazla işaretli dedektör antijen ve antikor kullanılmış olmasına karşın günümüzde floresan polarizasyon, kemilüminesens ve elektrokemilüminesens gibi saptama yöntemleri kullanılmaktadır (37).

Hepatit B virüs enfeksiyonunun laboratuvar tanısında kullanılan serolojik belirteçler:

HBsAg: Virüs yüzey antijenidir. S geni tarafından kodlanır, Dane partikülü içerisindedir. Enfeksiyonda ilk ortaya çıkan serolojik belirteçtir. Semptomlardan 1-2 hafta önce henüz transaminazlar yükselmeden ortaya çıkar, 2-12 hafta varlığını sürdürdükten sonra akut enfeksiyonlarda kaybolur, kronik enfeksiyonlarda ise 6 aydan uzun süre varlığını devam ettirir. HBsAg'yi saptamaya yönelik çok sayıda ticari test mevcuttur. Kart test ve lateks aglütinasyon testleri geçmişte kullanılmış

olmasına rağmen günümüzde en yaygın olarak kullanılan testler EIA ve kemilüminesans temelli testlerdir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan testlerin yakalama sınırı 0.13 IU/mL düzeyindedir (37-40). Günümüzde HBsAg bölgesinde görülen mutasyonlar tanıyı zorlaştırmakta ve aşılansarak bağışıklanmış kişilerde enfeksiyona neden olabilmektedirler. Bu tür mutasyonları yakalamak için monoklonal çok sayıda antikor ve poliklonal konjugat kullanılan testlerin seçilmesi önerilmektedir (41).

Son yıllarda kronik enfeksiyon takip ve tedavisinde kantitatif HBsAg testleri moleküler testlere alternatif olması açısından geliştirilmiştir. Bu testlerin analitik duyarlılık alt sınırları 0.05 IU/mL düzeyindedir (42,43).

HBeAg: Nükleokapsid bölgesinden üretilen proteindir. Kor bölgesinde bulunan ORF'nin pre-C kısmından başlayarak üretilir. HBeAg, akut ve kronik enfeksiyonda görülür, HBs Ag ile birlikte belirir ve HBsAg'den önce kaybolur, varlığı viral partiküllerin, DNA polimerazın ve HBV DNA'nın serumda bulunduğunun göstergesidir. Aktif replikasyon ve enfektivitenin yüksek olduğuna işaret eder (37,39).

HbCag: Nükleokapsid bölgesinden üretilen proteindir. Kor bölgesinde bulunan ORF'den sonra üretilir. Öz yapı antijeni olup karaciğer hücreleri içerisinde yer alır ve serumda serbest olarak bulunmaz, testi yaygın kullanılmaz (37,39).

Anti HBc IgG: Hepatit kor antijenine karşı oluşan antikordur. Klinik bulgularla birlikte pozitifleşir. Ömür boyu pozitiflik sürer. Pozitifliği doğal immünitinin bir göstergesidir. Akut, kronik enfeksiyonlarda ve taşıyıcılıkta pozitif olabilir. Pencere periodunda pozitif olan tek belirteçtir. Ticari kitlerin önemli bir kısmı anti HBc IgM-anti HBc IgG'yi birlikte saptayan anti HBc total şeklindedir (37,39).

Anti HBc IgM: Hepatit kor antijenine karşı oluşan Ig M sınıfı antikordur. Klinik bulgularla birlikte pozitifleşir, 6-24 ay içinde negatifleşir. Akut veya yeni geçirilmiş enfeksiyonun göstergesidir (37,39).

Anti HBs: HBs Ag'ye karşı oluşan antikordur. Geçirilmiş enfeksiyon ve aşılama sonucu oluşan bağışıklıkta pozitifleşir. Anti HBs'nin geç dönemde (6 aydan sonra) saptanmasının nedeni bu antikörlerin akut dönemde oluşmaması değil, HBsAg fazlalığı nedeniyle immüno kompleks halinde bulunduğu için rutin testlerde tespit edilememesidir (44). WHO ve CDC önerilerine göre test sonucunun >10 IU/mL olması reaktif olarak değerlendirilir. Test özellikle aşılama sonrası bağışıklık takibinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Anti HBs seviyesi zamanla düşer ve aşılanmış vakaların %60'ı yaklaşık 10-12 yıl sonra ölçülebilir antikor seviyesini kaybeder. Ancak antikor seviyesi düşse de aşı ile oluşan immünitenin hastalığı engellediği gösterilmiştir (37). Anti HBc pozitifliğinden bağımsız olarak anti HBs pozitifliği reenfeksiyonu ya da aşılama sonrası yeterli korunmayı gösterebilmektedir (37).

Anti HBe: HBe Ag'ye karşı oluşan antikordur. Geçirilmiş ve kronik enfeksiyonda pozitif saptanır. Anti HBe pozitif olan kronik hastalarda genellikle HBV DNA düşük düzeyde pozitif ya da negatif bulunur (37). HBeAg ve anti HBe rutin tanı paneli içinde yer almayıp; kronik HBV dönemlerinin belirlenmesinde ve kronik hastalığın izleminde daha ileri işlemlere (biyopsi, antiviral tedaviye başlangıç gibi) karar vermede önem taşır (44).

Hastalığın seyri boyunca serolojik belirteçler farklı dönemlerde pozitifleşir. İlk olarak HBsAg, ALT yükselmesinden 2-4 hafta önce, semptomlardan ise 3-5 hafta önce pozitifleşir. HBsAg'den sonra anti HBc IgM pozitifleşir ve bu akut enfeksiyonun önemli bir göstergesidir. Anti HBc IgM seviyesi hastalığın düzelmesi veya kronikleşmesinden bağımsız bir şekilde düşer. Anti HBc IgM azalırken yerini anti HBc IgG alır. Akut enfeksiyonda HBsAg pozitifliğinden sonra HBeAg de pozitifleşir. Akut enfeksiyonun iyileşme döneminde HBsAg yerini Anti HBs'ye bırakır. Akut enfeksiyon HBsAg'nin silinmesi ve anti HBs'nin oluşumu ile sonlanır (37).

Bazı hastalarda anti HBs ve HBsAg negatifken izole anti HBc pozitifliği saptanabilir. Bu hastalığın pencere periodunda, düzelleme evresinde ya da düşük seviyede kronik HBV enfeksiyonu varlığında olabilir. Anti HBc pozitif kişiler kan donörü olarak değerlendirilmezler (37,45). İzole anti HBc pozitifliği nedenini

belirlemek için hastaya tek doz HBV aşısı yapılır, aşıdan 2 hafta sonra alınan kanda anti HBs >20 IU/mL ise bu durum hafıza yanıtından kaynaklanmakta ve kişinin hastalığı geçirdiğini ve antikor cevabı oluşturduğunu göstermekteyken, negatifliği hastanın taşıyıcı olduğunu göstermektedir (37).

Kronik hastalıkta ise HBsAg pozitifliği yanı sıra anti HBs negatifliği ve anti HBe total/IgG pozitifliği görülmektedir. HBeAg ve anti HBe ise enfeksiyonda değişken seyir göstermektedir. HBeAg negatif ve anti HBe pozitif ise hastanın bulaştırıcılık potansiyeli düşük ve HBV DNA düzeyi de düşük/negatiftir. HBeAg pozitif ve anti HBe negatif ise hastanın bulaştırıcılık potansiyeli yüksek ve HBV DNA düzeyi genellikle yüksektir. HBeAg pozitif bir hastanın HBV DNA'yı kaybederek anti HBe pozitif hale spontan veya antiviral tedaviyle gelmesi istenen prognostik bir faktördür (37).

Hepatit B enfeksiyonunun tanısında serolojik testler ilk aşamada kullanılır. Kronik Hepatit B enfeksiyonunun tanı ve tedavi takibinde ilaveten moleküler testlerin de önemli bir yeri vardır bu nedenle, lüzum halinde destek testler olarak kullanılırlar.

Kantitatif HBsAg: HBsAg'nin kronik enfeksiyonun doğal seyrinde spontan klirensi nadirdir (%0.5-2.3/yıl) (46). Tedavi ile HBsAg'nin silinmesi kalıcı remisyonu ifade eder (47). HBsAg, hepatosit çekirdeğindeki viral cccDNA'dan sentezlenir ve bu süreç antiviral ilaçlardan (revers transkriptaz inhibitörleri) etkilenmez. Bu nedenle HBsAg miktarı, enfekte hücre havuzunun göstergesi olarak kabul edilmekte, antijen miktarındaki azalmanın, immün yanıtla bağlı enfeksiyon kontrolünün indirekt göstergesi olduğu düşünülmektedir (48). HBV DNA ise pregenomik RNA üzerinde RT (revers transkriptaz) enzimi yardımıyla sentezlenir, bu nedenle RT inhibitörleri ile yapılan tedavi başarısını değerlendirmede tercih edilir. Kantitatif HBsAg, HBV DNA ölçümü yerine kullanılmamalıdır ancak ek olarak kullanılabilen iki temel durum mevcuttur;

1. Kronik enfeksiyonun doğal seyrinde, dönemleri birbirinden ayırmada: HBeAg pozitif KHB'nin immüntoleran dönem ile immünlirens dönemini ayırmada yardımcı olur. HBsAg düzeyi immüntoleran dönemde 0.5-1 log 10 kadar daha

yüksektir. Eşik değeri belirlenmemiştir, ancak 100 000 IU/mL üzerindeki değerler immüntoleran dönemi destekler (48). HBeAg serokonversiyonu immünlisans dönemine ilişkin bir göstergedir. HBeAg pozitif olan hastalarda karaciğer fibrozisini öngörmede HBV DNA yol gösterici değilken, düşük HBsAg düzeyinin ciddi fibrozun göstergesi olabileceğine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır (48). HBeAg negatif KHB'li hastalarda ise zorluklardan biri aktif enfeksiyon ile inaktif taşıyıcılığı birbirinden ayırmaktır. İnaktif taşıyıcılık denilebilmesi için izlem ile HBV DNA'nın 2000 IU/mL'den düşük olması ve ALT'de yükseklik saptanmaması gerekir. HBV DNA ve HBsAg kantitasyonu ile izlem gerekmeden tek örnekte inaktif taşıyıcılığın belirlenebileceğini destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. Bunlara göre genotip D hastalarda tek ölçümde HBV DNA'nın 2000 IU/mL ve HBsAg'nin 1000 IU/mL'nin altında olması durumunda, inaktif taşıyıcılık tanısının pozitif prediktif değeri (PPD): %88, negatif prediktif değeri (NPD): %97'dir (49). Genotip B ve C için HBsAg <100 IU/mL olması HBsAg klirensi ile ilişkili bulunmuştur (48).

2. KHB'de tedavinin başarısını öngörmede: Peg IFN tedavisinde immün yanıt üzerinden işleyen bir antiviral tedavi söz konusu olduğundan, cccDNA ve bunun indirekt yansıması olarak da HBsAg düzeyinde azalma beklenir. Tedavinin 4. haftasında HBsAg düzeyinde belirgin azalma varsa (veya <1500 IU/mL ise) tedavi sonrası başarı göstergelerinin (HBeAg serokonversiyonu, HBsAg klirensi veya HBV DNA'nın <2000 IU/mL) oluşma şansı daha yüksektir. Tedavinin 12. haftasında HBsAg'de azalma olmaması (veya >20 000 IU/mL olması) tedavinin başarısız olacağına ilişkin bir gösterge olarak kabul edilebilir. Tedavinin 24. haftasında ise HBsAg'de başlangıca göre 1 log 10'dan fazla düşme olması (antijen düzeyinin <300-1500 IU/mL olması) durumunda kalıcı viral yanıt şansı yüksek (%54-75) bulunmuştur (50,51,52). HBeAg negatif KHB'li hastalarda Peg IFN tedavisi ile viral yük düşse bile genellikle kalıcı viral yanıt oluşmamaktadır. Genotip D olgularında tedavinin 12. haftasında HBsAg'de azalma %10'dan az, HBV DNA'da düşme 2 log 10'dan küçük ise, başarı şansı çok düşük olduğu (NPD %90-100) için, IFN tedavisi kesilebilir (48,53). Nükleozid/nükleotid analogları ile tedavide RT enzim inhibisyonu olduğu için HBV DNA'da belirgin baskılanma olurken HBsAg düzeyinde düşüş daha yavaş ve az olmaktadır. Bazı çalışmalarda tedavi ile HBV DNA negatifleştikten sonra HBsAg düzeyinin 6-12 ay arayla izlenmesi ve hızlı düşüş saptanırsa

(başlangıca göre 1 log 10'dan fazla azalma veya <100 IU/mL) rölaps riski düşük olduğu için bir süre sonra tedavinin kesilmesinin düşünülebileceğine ilişkin yorumlar bildirilmiştir (54,55).

Anti HBc IgM kantitasyonu ve anti HBc avidite testi: Akut ile kronik B hepatitini birbirinden ayırmak kolay olmayabilir. Bu amaçla sıklıkla anti HBc IgM varlığı kullanılsa da testin KHB aktivasyonu sırasında da pozitifleşmesi yanlış tanıya yol açabilir. Geçmişini bilinmeyen hastalarda ilk kez anti HBc IgM pozitifliği saptandığında, olayın akut enfeksiyon veya kronik enfeksiyon aktivasyonu olup olmadığını ayırmada anti HBc IgG aviditesi yardımcı olabilir. Yapılan bir çalışmada akut enfeksiyon tanısının HBsAg ve anti HBc IgM pozitifliği ile konulması durumunda %40 civarında yanlış tanı olabileceği bildirilmiştir (56). Anti HBc IgM testinde belli bir düzeyin üzerinde pozitiflikler (anti HBc IgM >200 PE IU/mL) akut enfeksiyon tanısında pozitif prediktif değeri artırabilir. Buna ek olarak anti HBc avidite testi ile gerçek akut enfeksiyonlar daha doğru saptanabilir (57,58).

HBeAg kantitasyonu: HBeAg pozitif KHB'de tedavide başarıyı öngörmede yardımcı bir parametre olarak kullanılmıştır. Bunlar; Peg IFN tedavisinde 32. haftadan önce HBeAg'nin negatifleşmesi; entekavir tedavisinde tedavi öncesi HBeAg'nin <360 PE IU/mL olması ve tedavinin 12. haftasında 1 log 10'dan fazla azalma olması; tenofovir tedavisinde tedavi öncesi HBeAg <100 PE IU/mL olması ve tedavinin 24. ayında 10 PE IU/mL altına inmesidir (59, 60,61).

2.7. Atipik Serolojik Profiller

Hepatit B tanısında bilinen tipik serolojik test sonuçları yanı sıra tanı ve izlem aşamasında yorumlama zorluklarına neden olan atipik tanı belirteçleri, ileri inceleme ve değerlendirme gerektiren durumlara yol açmaktadır. Atipik serolojik profillerin sebepleri arasında laboratuvar kaynaklı; uygun şekilde alınmayan, ulaştırılmayan ya da saklanmayan örnekler, tanı kitindeki sorunlar, test uygulaması sırasında yapılan hatalar, viral etkene ve/veya konağa bağlı olarak; çoklu virüs enfeksiyonları, yeni virüs ve mutantlar ya da antikor yanıtında yetersizlik, transfüzyon, pasif antikor geçişi gibi sorunlar olabilir (62,63). Atipik serolojik profiller arasında; izole HBsAg pozitifliği, izole anti HBs pozitifliği, izole anti HBc pozitifliği, HBsAg ve anti HBs

birlikte pozitifliği, anti HBe ve HBV DNA pozitifliği ile birlikte HBeAg negatifliği/pozitifliği ve enfeksiyon serolojik göstergeleri olmaksızın HBV DNA pozitifliği sayılabilir (64).

İzole HBsAg pozitifliği: diğer HBV göstergeleri olmadan HBV DNA pozitifliği ile birlikte kalıcı HBsAg pozitifliği saptanmasıdır. HBV kor antijenine karşı immüntolerans (anti HBc üretilmemesi), anti HBc üretimini bozabilen bir mutant HBV varlığı ya da HBV tip 2 ile enfeksiyon durumunda görülebilir (64). Ayrıca anti HBc IgM ve HBeAg'nin belirmesine kadar geçen yaklaşık 10 günlük sürede alınan kan örneğinde de izole HBsAg pozitifliği saptanabilir ki test tekrarlanması ile diğer HBV göstergeleri de pozitifleşir (62,65).

İzole anti HBs pozitifliği: hepatit B aşısı veya immünglobulin uygulaması, kan ürünleri kullanımı, anneden bebeğe pasif geçiş, test hataları ya da okült (gizli) HBV enfeksiyonunda görülebilir (62).

İzole anti HBc pozitifliği: HBsAg ve anti HBs negatifliğinde anti HBc'nin tek başına pozitif saptanmasıdır. Sıklığı toplumlara göre değişmekte (%0.1-10) olup ülkemizde bu oran %3-5 olarak bildirilmiştir (66). Nedenleri arasında; test teknik sorunlarına ya da HBcAg ile benzer epitoplara olan antijenlere karşı oluşmuş antikörlerin çapraz reaksiyonuna bağlı olarak ortaya çıkan yalancı anti HBc pozitifliği, akut HBV'nin pencere dönemi, kronik hepatit B enfeksiyonlu bireylerde immün baskılanma, immün kompleksler ve koenfeksiyonlar (HCV, HDV ve HIV enfeksiyonu birlikteliği HBV replikasyonunu azaltmaktadır) sonucunda HBsAg'nin saptanamayacak düzeyde düşük olması, genetik nedenlerle diğer HBV antijenlerine karşı hümmoral yanıt bozukluklarında ya da eskiden geçirilmiş HBV enfeksiyonu sonrası anti HBs düzeyinin saptanamayacak kadar düşmesine bağlı yalancı anti HBs negatifliği ve HBV tip 2 ile enfeksiyonda olabilir (63,66-71). Anti HBc, anneden bebeğe ya da kan transfüzyonu sonucu pasif olarak aktarılabilir (69). Ayrıca seropozitif okült hepatit ve mutant suş enfeksiyonu olabilir (63,67).

HBsAg ve anti HBs birlikte pozitifliği: kronik HBV enfeksiyonlu bireylerde düşük oranda görülür. HBsAg'nin 'a' determinantını kodlayan gen bölgesindeki mutasyonlarda, farklı subtip ile gelişen akut enfeksiyonda (özellikle immün

yetmezlikli, damar içi uyuşturucu kullanan ya da hemodiyaliz hastalarında) ve test hatalarında bu profil görülebilir (40,64).

Anti-HBe ve HBV DNA pozitifliği ile birlikte HBeAg negatifliği/pozitifliği: prekor/bazal kor bölgesindeki mutasyonlara ya da anti HBe-HBe Ag'nin immün kompleks oluşturmalarına bağlı görülebileceği gibi akut viral hepatitte kısa süreli HBV DNA pozitifliği ile birlikte anti-HBe/HBeAg pozitifliğine rastlanabilir (40,64,70,72).

Okült HBV(OHB) enfeksiyonu:

1-Enfeksiyon serolojik göstergeleri olmaksızın HBV DNA pozitifliği (seronegatif OHB): Özellikle X gen defektif HBV mutantlarıyla enfeksiyonlarda görülür.

2-Seropozitif Okült HBV(OHB) enfeksiyonu: Hepatit B enfeksiyonunun iyileşmesi HBsAg ve HBV DNA'nın negatifleşmesi ile gösterilir. Pencere dönemi dışında, hepatit B yüzey antijeni negatifken (anti HBc IgG +/-) kan ve dokularda HBV DNA (genellikle 10^4 kopya/ml'den düşük) varlığı olarak tanımlanır (62,73,74). Nedenleri arasında S geni mutasyonları, HBV DNA'nın konak genomuna integrasyonu, periferik kan mononükleer hücrelerin HBV ile enfeksiyonu, immün kompleksler, immün yetmezlikler ve koenfeksiyonlar sayılabilir (62). Hemodiyaliz hastalarında, sebebi bilinmeyen serum ALT yüksekliği olan hastalarda, kriptojenik karaciğer hastalığı olanlarda ve karaciğer transplant donörlerinde etiyoloji ve HBV bulaşı açısından OHB unutulmamalıdır (73).

Atipik serolojik profillerde öncelikle olası hata kaynakları sorgulanmalı, test tekrarlanmalı yine aynı sonuç bulunursa HBV DNA araştırılmalıdır.

2.8. Moleküler Tanı

Hepatit B enfeksiyonlarında moleküler çalışmaların amacı; etkenin hızla tanımlanması, kantitatif viral yükün belirlenmesi ile tedaviye yön verilmesi, suşların genotiplendirilmesi, patogeneze sorumlu virülans ve antimikrobiyal direnç genlerinin tespiti, inaktif hepatit B taşıyıcılığı ile KHB enfeksiyonunun ayırt edilmesi, okült enfeksiyonların tanınması, mutasyonların belirlenmesi ve izolatların moleküler karakterizasyonunun yapılmasını kapsar (75,76). İlk olarak hedef nükleik

aside bağlanan prob sisteminin sinyal gücünün amplifikasyonuna dayanan hibridizasyon temelli sistemler geliştirilmişse de günümüzde nükleik asit çoğaltma temelli yöntemler özellikle de standardize polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi tercih edilmektedir. Klasik nükleik asit çoğaltma temelli yöntemlerinden daha hızlı ve daha duyarlı olan real-time PCR'da amplikonun analizi için reaksiyon tüpünün açılması gerekmediği için çapraz kontaminasyon riski düşüktür. Bu yöntemlerde çoğaltılan amplikonlar; floresan işaretli propların kullanıldığı TaqMan, molecular beacons, FRET (Florescence Resonance Energy Transfer), Scorpions, Ampliflour™ ile özgül olarak, SYBR Green I, YO-PRO-1 ve etidyum bromür gibi DNA'ya bağlanabilen boyalar ile özgül olmayarak gösterilebilir. Farklı floresan moleküllerin, farklı dalga boylarında ışımaları birden fazla hedefin saptanabildiği multipleks PCR uygulamalarının gerçekleştirilmesine de olanak sağlar (77). Kullanılan ticari real-time PCR kantitatif HBV DNA tespit kitine göre saptama sınırları değişmekle birlikte <200 kopya/ml'tür.

Hepatit B genotiplerinin belirlenmesi, bulaş yollarının ve enfeksiyonların anlaşılması açısından oldukça önemlidir. Genotip belirlemek için yüzey antijenini kodlayan gen bölgelerindeki (Pre S1/S2) farklılığı göstermek gereklidir (78). Bu amaçla; dizi analizi (altın standart), ters hibridizasyon temelli yöntemler, restriction fragment length polymorphism (RFLP), tipe özgü primerle real-time PCR ve DNA mikroçip teknolojileri kullanılmaktadır. HBV ilaç direncinin belirlenmesinde de aynı yöntemler kullanılmakta olup, son yıllarda geliştirilen restriction fragment mass polymorphism (RFMP) yöntemi ise restriksiyon enzimleri ile PCR ürünleri kesilmesine dayanan RFLP'ye benzer ancak farklı olarak PCR ürünlerinin ayrımı matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) kütle spektrometresi ile yapılır (79,80).

2.9. Hepatit B Kliniği ve Evrelemesi

Hepatit B parenteral, cinsel, horizontal (aile içi yakın temas) ve perinatal (vertikal) yollarla bulaşmaktadır. HBV DNA tüm vücut sıvılarında bulunmakla birlikte, en fazla kan, semen, vajinal salgılar ve menstrüel kanda bulunmaktadır. Yüksek endemik bölgelerde perinatal ve horizontal geçiş ön planda iken, düşük endemik bölgelerde cinsel ilişki ve parenteral geçiş ön plandadır (81). Hepatit B

virüsü, akut, kronik, fulminan ve okült enfeksiyona neden olmaktadır. Akut enfeksiyon, asemptomatik, anikterik seyredebileceği gibi viral etkenle karşılaştıktan 45-180 gün içinde klinik belirti vermektedir; ilk bir haftasında halsizlik, iştahsızlık, bulantı, ateş gibi prodromal belirtilerle giderken sonrasında ciltte ve korneada sararma, karın ağrısı, bulantı, kusma gibi semptomlar, koyu renkli idrar eşlik etmekte, karaciğer fonksiyon testlerinde yükselme (AST-aspartat aminotransferaz, ALT-alanin aminotransferaz, GGT-gama glutamil transferaz, ALP-alkalen fosfataz, Tbil-total bilirubin, PZ-protrombin zamanı, APTZ-aktive parsiyel protrombin zamanı ve INR-uluslararası düzeltilmiş oran) görülmektedir (81). Bazen dolaşımdaki immünkomplekslere bağlı geçici ürtiker, artralji, serum hastalığı benzeri tablo ve glomerülonefritler izlenebilir. Akut enfeksiyonun şiddeti, enfekte eden dozun miktarı ve hasta yaşı ile doğru orantılıdır. Çocuklarda %70 anikterik seyreder ve kronikleşme olasılığı yaşla birlikte azalır. Erken yaşta edinilmesi kronikleşme riskini artırır. Yenidoğanda %90 erişkinde ise %5 oranında kronikleşme görülür. Okült HBV enfeksiyonu ise genellikle asemptomatik olup, serolojik belirteçler negatif iken düşük düzeyde HBV DNA (<200 IU/mL) saptanır. Olguların çoğunda karaciğer fonksiyon testleri normaldir (82). Fulminan hepatit ise nadir görülen bir tablo olup (<%1), genellikle akut enfeksiyonu takiben gelişir, karaciğer yetmezliği ve ensefalopati nedeniyle mortalite %63-93 arasında seyreder, tablo klinik açıdan çok alevlidir, karaciğer fonksiyon testleri çok yüksek seviyelere(>1000 IU/mL) çıkar. Ayrıca şuur bulanıklığı, el becerilerinde bozulma, ani AST/ALT düşüşü, kan üre düşüklüğü, amonyak artışı, protrombin zamanında uzama, hipoglisemi bulguları görülebilir (83).

Kronikleşme HBsAg'nin 6 aydan uzun süreli kanda saptanmasıdır. Kronik enfeksiyon sıklıkla hafif ya da subikterik ilerler. Halsizlik ve sağ üst kadranda ağrısı ortaya çıkabilir, ilerlemesi ile siroz, HSK gelişimi, asit, ensefalopati varis kanaması gibi komplikasyonlar görülebilir. Kronik hepatit B 'European Association for the Study of the Liver' (EASL) tarafından yapılan sınıflandırmada 5 faza ayrılmaktadır (83);

1. İmmüntoleran dönem: HBeAg ve HBV DNA yüksekliğiyle birlikte normal ya da hafif yüksek transaminaz seviyelerinin görüldüğü, karaciğerde nekroinflamasyonun

olmadığı veya minimal histolojik aktivite ile karakterize yüksek replikatif dönemdir. Bu evrede HBeAg'nin spontan kaybolma oranı çok düşük olup bu süre yeni doğanda çok uzundur. Yüksek viremi nedeniyle hastaların bulaştırıcılığı yüksektir.

2. İmmünlirens (reaktif) dönem: HBe Ag pozitif ancak HBV DNA (replikasyon) düşük seviyededir. Bu dönemde hepatik aktivite devam etmektedir, konağın gösterdiği immün yanıt sonucu HBV DNA düşer ve aminotransferazlar fluktuasyon gösterir veya sürekli yüksek seyrederek, nekroinflamasyon değişken/ciddi düzeyde olup fibrozis gelişimi izlenebilir. Bu faz anti HBe ve anti HBe serokonversiyonu ile sonuçlanır, inaktif taşıyıcılık fazına geçilir.

3. İnaktif HBV taşıyıcılığı: 'American Association for the Study of Liver Disease' (AASLD) 2009 rehberine göre belirlenen kriterler; 6 aydan uzun süreyle HBsAg pozitifliği (ccc DNA ile iyi korelasyon gösterdiği için <1000 seviyeler iyi prognoz gösterir), serokonversiyondan sonra HBV DNA çok düşük (<2000 IU/ml)/saptanamaz düzeyde olup transaminazların sürekli normal seviyede olması, histolojik incelemelerde ise hafif fibrozis (0-1) ve/veya hafif nekroinflamasyon (HAI-hepatic activity index <5) görülmesi ve karaciğer biyopsisinde belirgin hepatit bulgularının olmamasıdır (84). Bazı hastalarda DNA >2000 IU/ml saptanabilir, bu grupta düşük de olsa HSK gelişimi riski nedeniyle karaciğer biyopsisi yapılmalıdır.

4. HBeAg negatif CHB: anti HBe serokonversiyonundan sonra ortaya çıkabilen bu süreçte periyodik reaktivasyon (fluktuasyonlu DNA/transaminaz yüksekliği), aktif hepatit HBV nükleotidinin precore/core alt ünitesindeki mutasyona bağlıdır. Bu hastalarda spontan remisyon düşüktür ve inaktif taşıyıcıdan ayırt etmek zor olabilir. Bu nedenle hastaya tek bir ALT ya da DNA düzeyine bakarak inaktif taşıyıcılık tanısı koymak uygun değildir, bu ayrımın en doğru karaciğer biyopsisi ile yapılabileceği bilinmekle birlikte hem klinisyen hem de hasta açısından her zaman pratik olmaması nedeniyle bu ayrımı yapabilecek bir HBV DNA seviyesi belirlenmeye çalışılmıştır (uluslararası çalışmalar sonucunda <2000 IU/ml kabul edilmiştir).

5. HBsAg negatif faz: HBsAg kaybindan sonra düşük oranda DNA yüksekliği görülebilir (genelde saptanamaz düzeydedir). Bu evreye gelene kadarki süreçte

gelişen fibrozis HSK gelişimi yönünden düşük risk taşıması nedeniyle takibe devam edilmelidir (83,85-89).

2.10. İmmün Sistem ve Treg Hücreleri

İmmün sistemi başlıca T ve B lenfositler, doğal öldürücü (NK) hücreler, monosit/makrofajlar, fagositler ve dendritik hücreler oluşturmaktadır. Doğal immün yanıt patojene erken reaksiyonu kapsar ve edinsel immün yanıt başlangıcı için kritik önemdedir. Vücudun kendine yabancı yapıları tanınması ve karşı savunmaya geçilmesi edinsel immüniteyle sağlanır. Edinsel immünite hümorale ve hücreli yollarla gerçekleştirilir. Hümorale immünite B lenfositlerin ürettiği antikorlar tarafından oluşturulurken, hücreli immünite T lenfosit hücreleri tarafından oluşturulur. Lenfositler antijenlere özgün reseptörler taşıyan tek hücre grubudur ve bu hücreler monoklonal antikor panelleri ile tanınabilen yüzey proteinleri aracılığı ile birbirlerinden ayırt edilmektedir. Bu proteinlerin standart adlandırılması "CD" (ayırım kümesi, "cluster of differentiation") sayısal tanımlaması şeklindedir (90).

Kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücrelerin farklılaşmasıyla oluşan T lenfositler timusa geldiklerinde bir seri farklılaşma aşamasından sonra olgunlaşarak kan dolaşımına geçer dalak, lenf nodülleri gibi sekonder lenfoid dokulara giderler. Bu olgunlaşma sırasında yüzeylerinde önce $CD3^+CD4^+CD8^+$ çift pozitif, sonra $CD3^+CD4^+$ (Th_0)/ $CD3^+CD8^+$ (Tc) tek pozitif CD belirteçleri belirir, ayrıca aksesuar CD28, CDL, CD2, FasL ve tüm lökositlerin taşıdığı CD45 yüzey molekülleri ile de ayırt edilirler. Th_0 , MHC-II ile sunulan antijenin özelliğine ve salgılanan sitokin tipine göre Th_1 (hücreli immünite)/ Th_2 (B hücre farklılaşması, Th_1 yanıtın baskılanması)/ Th_{17} (bakteri, mantar enfeksiyonlarına karşı yanıtın güçlendirilmesi, otoimmünite)/Treg (immün yanıtın baskılanması) hücrelerinden birine T hücre reseptörüne (TCR) bağlı olarak farklılaşarak ayrı fonksiyon görürler. T hücre yüzeyinde yüzey immünglobulin bulunmaz. Bir T lenfosit sadece tek bir çeşit antijen için TCR taşır ve B lenfositlerde olduğu gibi immün sistemde zaman içinde karşılaşma olasılığı olan onbinlerce çeşit T lenfosit bulunur. Dolaşımdaki lenfositlerin %60-80 kadarını T lenfositler oluşturur. T lenfositler üzerinde yüzey belirleyicileri dışında bazı sitokin reseptörlerini ve ICAM-1 gibi adezyon moleküllerini de eksprese ederler.

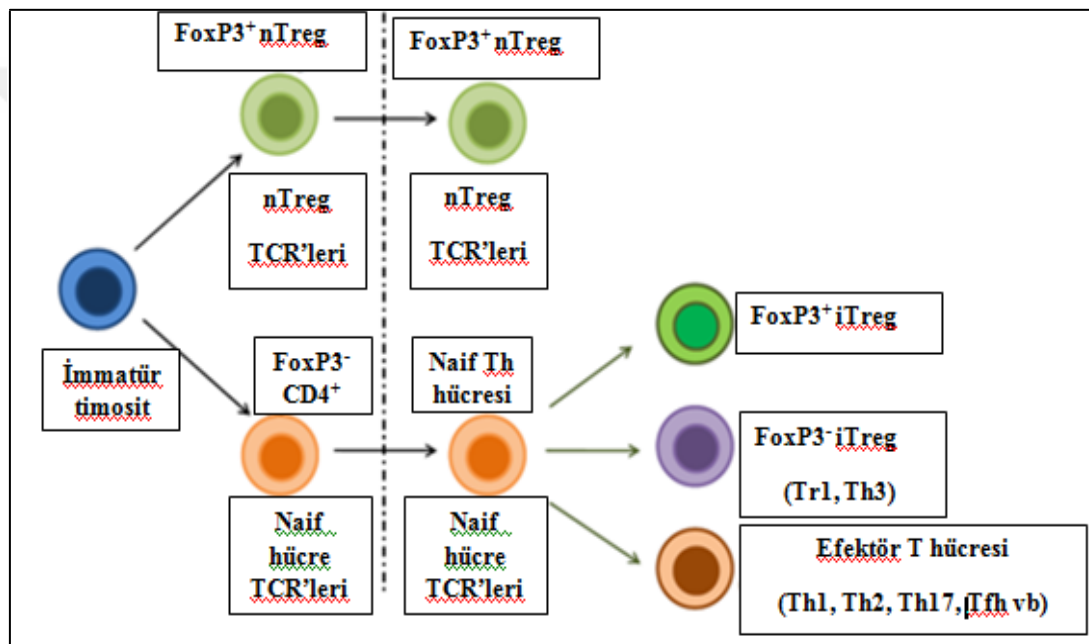
Önceden supresör T hücresi olarak bilinen Treg hücreleri IL-2 ve TGF- β uyarımı sonrasında salgıladıkları sitokinler ile CD4⁺ (Th1, Th2 ve Th17) ve CD8⁺ T lenfositleri, ayrıca makrofajları, dentritik hücreleri (DH), NK ve NKT hücreleri, B lenfositleri, mast hücreleri ve osteoblastları baskılayıcı etki gösterirler (91,92). Treg hücrelerinin parmak izi belirteci CD25 (IL-2R α) olup antijene özgül supresör hücreler olan CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg hücreler (küçük bir kısmı CD8⁺CD25⁺), patojen temizlendikten sonra immün yanıtı baskılar ve otoimmünite gelişimini önler (93).

Treg hücreleri ayrıca timustan çıkmadan aileyi tanımlamada en spesifik belirteç olan FoxP3'ü (Transcription Factor Forkhead Box P3) ifade ederler. FoxP3 maturasyonundaki bozukluk ya da down-regülasyonun Treg hücresinin supresif aktivitelerinin ve immünregülatör fonksiyonlarının kaybına neden olduğu, FoxP3'ün Treg fonksiyonlarında ve gelişiminde dominant rol oynadığı gösterilmiştir (94-96). Treg hücreleri yüzey fenotipleri ve regülatör fonksiyonları yönünden heterojenite gösterir ve gelişim aşamasına, fenotipine ve migrasyon kapasitesine göre naif (immünsupresör), efektör, hafıza hücreleri olarak alt gruplarına ayrılabilir. Sonuç olarak Treg hücrelerinin hepsinin son gelişim basamağında olmadıkları, plastisite gösterdikleri söylenebilir. Treg hücresinin kaderi anatomik lokalizasyonlarına, sitokin mikroçevresine ve ortamda bulunan diğer immün hücelere bağlıdır. Otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda Treg'ler FoxP3 belirteçlerini kaybederek supresör fonksiyonlarını kaybedip efektör hücelere dönüşebilirler, bu yüzden FoxP3 varlığının gösterilmesi önem taşır (97). Otoimmün hastalıklarda inflamasyon bölgesinden izole edilen Treg hücrelerinde FoxP3 ekspresyonunun azaldığının gösterilmesi bu görüşü destekler niteliktedir (98). FoxP3⁺ Treg hücrelerinin naif alt grubu timustan ayrılırken lenf organlarına göçünü sağlayan L-selektin (CD62L) ve kemokin reseptörü-CCR7 ifade eder, periferde dentritik hücrelerle etkileşime geçerek ve etkin şekilde otoreaktif T hücre gelişimini bloke ederek homeostazı sağlarlar (99-103). Treg hücreleri yine yüzeylerinde GITR(Glucocorticoid-induced TNFR-related protein), CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, CD152) gibi spesifik olmayan immünsupresör yüzey belirteçleri taşırlar (104).

Treg hücreleri alt grupları ve fonksiyonları:

Treg hücreleri esas olarak $CD4^+$ T hücrelerin bir alt grubudur ve periferik kan $CD4^+$ T hücrelerinin % 2-4'ünü oluşturur (105). Bununla birlikte FoxP3 ekspresyonu yapan ve Treg fonksiyonu yürüten $CD8^+$ ve NK hücrelerin varlığından söz edilmektedir (106).

Treg hücreleri bir transkripsiyon faktörü olan FoxP3 ekspresyonu sergileyen heterojen bir hücre popülasyonudur (107). Treg hücreleri fenotipik özellikleri esas alınarak iki temel alt gruba ayrılmıştır (Şekil-1):



Şekil-1 Treg hücre maturasyonu ve alt grupları

1-Doğal düzenleyici T hücreleri (nTreg): Doğal olarak T hücre olgunlaşması sırasında timusta belirli miktarda oluşturulan IL-2R α (CD25) eksprese eden $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T hücrelerdir (108,109).

2- İndüklenebilen (adaptif) düzenleyici T hücreler (iTreg): Yeni adıyla periferden kaynaklanan Treg hücreleri (pTreg). Periferik lenfoid organlarda CD25 öncüllerinden ortamdaki uyarım sonrası $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ fenotipi kazanan naif T hücreleridir (110). IL-2 ve TGF- β ile indüklenen iTreg hücreleri, nTreg hücrelerinden farklı olarak, naif $CD4^+$ T hücrelerden oluşurlar ve bellek belirteçlerini geliştirebilmek için ek uyarımlara gereksinim duyarlar. iTreg hücreleri bir kez uyarılınca FoxP3, CTLA-

4, TGF- β ve IL-10 eksprese ederler (106). Kalıtsal TGF β -1, CTLA-4 ve FoxP3 eksikliği olan farelerin tamamında “Fatal Otoimmün Lenfoproliferatif Sendrom” geliştiği gözlenmiştir. IL-2 eksikliği olan farelerde de çoklu organ otoimmün hastalığının oluştuğu bilinmektedir. IL-2 ve TGF- β , iTreg hücrelerinin indüklenmesi için ortamda mutlak bulunmalıdır. Bu sitokinlerin her ikisi de nTreg ile iTreg hücrelerinin ve bu hücrelerce eksprese edilen FoxP3’ün idamesi için gereklidir (106). IL-2, Treg hücrelerinin FoxP3 ekspresyonlarını sürdürebilmeleri için gerekli olan TGF- β üretimini veya aktive etmesini sağlar (106). TGF- β ’nın FoxP3⁺ iTreg’leri indükleyebilmesi için CTLA-4 gereklidir (111). nTreg ve iTreg hücrelerinin antijenik özgülükleri, gelişimleri için ihtiyaç duydukları faktörler (T hücre reseptörü uyarımı ve ko-stimulasyon gereksinimleri gibi) ve immün baskılayıcı aktiviteleri açısından önemli farklılıkları vardır. Bu farklar adaptif immün cevapta iki hücre grubunun ayrı fonksiyonları yürütmekte olduğu olasılığını kuvvetlendirmektedir (106). nTreg hücreleri asıl olarak timusta eksprese edilen öz antijenlere cevap olarak gelişirler. iTreg hücreleri ise esas olarak periferik lenfoid organlarda dendritik hücreler (DH) tarafından sunulan periferik antijenlere cevap olarak gelişirler (106). nTreg hücreleri oluşumları için güçlü T hücre reseptörü (TCR) uyarımının yanı sıra timusta CD28 eş-uyarımına (ko-stimulasyonuna) gereksinim duyarlar (112). CD28 eksikliği olan farelerde nTreg hücrelerinin belirgin derecede azaldığı görülmüştür (113). CD4⁺CD25⁻ T hücrelerin periferde CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ iTreg hücrelerine dönüşümleri sırasında gereksinim duyulan TCR uyarımı optimal düzeyden daha zayıftır ve gelişen hücre topluluğu az sayıda hücre bölünmesi gerçekleştirir (114). Buna karşın iTreg hücreleri oluşumları için, antijen sunan hücreler (APC’ler) tarafından eksprese edilen B7 molekülü aracılı eş-uyarana gereksinim gösterirler (114). Optimal düzeyin altındaki CD28 eş-uyarımı iTreg hücre oluşumunu kolaylaştırmada yeterli etki sağlarken, inhibitör CTLA-4 eş-uyarımı iTreg hücre oluşumu için mutlak bir gereksinimdir (111). CTLA-4 (CD152) eksikliği olan farelerde iTreg hücre oluşumunun gerçekleşmediği gösterilmiştir (115). IL-6 ve IL-6 mebrana bağlı reseptörüne (mIL-6R) bağlanma nTreg hücrelerini Th17 hücrelerine dönüştürebilirse de iTreg hücreleri bu sitokine dirençlidir. Böylece iTreg hücreleri inflamasyon alanlarında baskılayıcı fonksiyonunu yerine getirmeye devam edebilir. nTreg ile iTreg hücreleri arasındaki bu farkın iTreg hücrelerinin nTreg hücrelerine

oranla belirgin derecede azalmış IL-6 reseptörü (CD126) ekspresyonu göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (116). IL-6 hemen tüm multinükleer hücreler tarafından üretilen bir sitokindir ve birçok otoimmün ve kronik inflamatuvar hastalığın patogenezinde suçlanmıştır (117). Sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi otoimmün hastalıklarda DH'ler tarafından üretilen IL-6'nın Treg aktivitesini bloke ettiği bildirilmiştir (118). Tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) süper ailesinin bir üyesi olan OX40 hem nTreg hem de iTreg hücrelerinin gelişimi ve fonksiyonu üzerinde negatif olarak düzenleme yapmaktadır (106).

Antijen sunan DH'ler nTreg'lerin ve olasılıkla iTreg'lerin ana hedefleridir (119,120). Olgunlaşmamış DH'ler immünojenik ve tolerojenik alt setlere dönüşebilme potansiyeline sahiptir. Tolerojenik DH'ler $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ düzenleyici T hücrelerini (iTreg) uyarırlar. Bu iTreg hücrelerinin oluşturduğu TGF- β ve IL-10 başka olgunlaşmamış DH'leri tolerojenik olmak üzere indükler. DH'lerin ürettiği retinoik asitin TGF- β tarafından $CD4^+CD25^-$ hücrelerin indüklenmesini sağladığı da gösterilmiştir (116). Böylelikle Treg hücreleri DH'lerin immünojenik potansiyellerini azaltmaktadır (120,121).

Tolerojenik DH'ler ise konvansiyonel $CD4^+CD25^-$ hücrelerini FoxP3⁺ antijene spesifik Treg hücresi haline gelmek üzere indükler ve pozitif geri besleme döngüsünü tamamlar. Bu sürekli geri besleme döngüsü otoimmüniteyi önler (106). Mikrobiyal enfeksiyonlar gibi çevresel tetikleyicilerin varlığında ise patojenin ortadan kalkmasına kadar DH dengesi tolerojenikten immünojenik yöne kayar. Enfeksiyonun adjuvan benzeri etkisi sonucu potansiyel öz antijenlere reaktif patojenik efektör T hücrelerinin (Teff) aktifleşmesine izin verilir. Enfeksiyon ortadan kalktığında ve TGF- β ile IL-2 yeniden üretildiğinde homeostatik dengenin bu öz-antijenlere reaktif patojenik Teff hücre aktivitesinin sonlandırılması için tolerojenik yöne geri dönmesi gerekmektedir. Ancak genetik yatkınlığı olan bireylerde ve çevresel tetikleyiciler bulunduğu immünolojik döngü hem immünojenik DH'leri hem de zararlı öz-antijenlere reaktif Teff hücrelerin dominansını devam ettirir. Bu patolojik kısır döngüden ve kronik otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasından kontrolsüz T hücresi reaktivitesi sorumludur. Tolerojenik DH'ler mevcut nTreg hücreleri ve iTreg hücrelerinin genişlemesine de yol açabilir. Buna karşın Teff hücre-DH etkileşimleri, daha fazla Teff hücresi indükleyebilen immünojenik

DH'lerin oluşmasını sağlar. Kararlı durumda tolerojenik döngü baskındır ama mikrobik enfeksiyonlarda veya otoimmün hastalıklarda immünojenik olgun DH'ler ve proinflamatuvar Teff hücreler bu koruyucu döngüye baskın çıkar (106). FoxP3 sadece Treg fenotipini yansıtan bir belirteç olmakla kalmaz, birçok genin ekspresyonunun belirleyicisidir ve FoxP3 mutasyonları ciddi otoimmün hastalıklara neden olabilir (122,123).

CD4⁺CD25⁺ Treg hücrelerinin delesyonunun otoimmün hastalıkla sonuçlandığı farelerde de gözlenmiştir. Üç günlük farelerde timektomi ile Treg delesyonu sağlanmış ve Treg hücrelerinin adaptif transferi ile çoklu organ otoimmün hastalıkların engellendiği görülmüştür (124,125).

Treg hücrelerinin nasıl fonksiyon gösterdiği henüz tam olarak anlaşılmamıştır. *In vitro* testlerle yürütülen çalışmalarda, Treg hücrelerinin patolojik T hücrelerinin (Teff) aktivasyonunu engelleyebildikleri bildirilmiştir. Bu tür testler kullanıldığında birkaç otoimmün hastalık bulunan kişilerden izole edilen Treg hücrelerinin sağlıklı bireylerden izole edilenlere kıyasla Teff hücrelerini engelleme fonksiyonunun düşük kapasiteli olduğu gösterilmiştir (126). Treg aracılı baskılamada birden çok mekanizmanın rol aldığı belirlenmesine rağmen bu mekanizmaların her birinin *in vivo* şartlarda göreceli katkısının ne olduğu belirsizliğini korumaktadır (127). FoxP3⁺ Treg hücrelerinin nasıl supresyon yaptığı birkaç teori ile açıklanmıştır (123).

1- Antijen sunan DH ile reaktif T hücreleri arasındaki temasın inhibisyonu: DH'leri antijen sunduğunda, ortamda Treg hücreleri bulunuyor ise bu hücreler, antijen spesifik naif T hücrelerine göre daha baskın olarak DH'lere bağlanma gösterir. Böylelikle DH ile ancak uzun süreli bağlanma gerçekleştirdiğinde bellek fonksiyonu gösterebilen reaktif T hücrelerinin immün fonksiyonu engellenmiş olur (128,125).

2- CTLA-4 (CD152) bağımlı mekanizma: CD152 bir T hücre yüzey molekülüdür ve hücrenin apoptozundan sorumludur. T hücre aktivasyonunu negatif olarak düzenler ve CD152 mutasyonları T hücre aracılı otoimmün hastalıkların gelişimine katkıda bulunur (129). FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺ doğal Treg hücreleri yüksek düzeyde CD152 ekspresyonu yaparlar (123). CD152'nin monoklonal antikolarla bloke edilmesi sağlıklı farelerde organ spesifik otoimmün hastalıklar ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (130,131). Hepsinden önemlisi

Treg hücrelerinde CD152 ekspresyonundan yoksun olan farelerin bir çeşit otoimmün hastalık kabul edilebilecek lenfoproliferasyon gösterdikleri ve FoxP3'den yoksun farede olduğu gibi aşırı immünoglobulin (Ig) E üretimi bildirilmiştir (132). Bu verilerin ışığı altında CD152 aracılı supresyonun antijen sunucu hücre (APC) fonksiyonları üzerinde baskılayıcı, düzenleyici etkisinin olduğu düşünülmekte ve bu supresyonun temel mekanizma olabileceği savunulmaktadır (123).

3- IL-2 bağımlı mekanizma: Treg hücreleri çoğalması ve yaşaması için ekzojen IL-2'ye yüksek derecede bağımlıdır. IL-2 veya IL-2 reseptörünün eksikliği Treg sayısında azalmaya ve FoxP3 eksikliğinde görülene benzer şekilde ciddi sistemik lenfoproliferasyon ve otoimmüniteye neden olmaktadır (128).

4- Ekstrasellüler ATP yıkımı: ATP, hasarlı veya aktive hücrelerden salınabilir ve immün reaksiyonları artırır. Treg hücrelerinin, ekstrasellüler ATP'nin lokal konsantrasyonlarını azaltan ekstrasellüler enzimleri ürettiği üzerinde durulmaktadır (128,121).

5- Sitokinler: TGF- β , IL-10, IL-35 ve galektin-1 gibi immünsupresif sitokinler Treg hücrelerinin baskılayıcı fonksiyonlarına katkı sağlar (123). Treg hücreleri, inhibitör sitokinlerin tek kaynağı olmamalarına rağmen Treg hücrelerinden salınan sitokinlerin *in vivo* Treg inhibitör fonksiyonuna çok büyük katkıları olduğu düşünülmektedir (133).

Bununla birlikte Treg kaynaklı sitokinlerin otoimmün hastalık üzerinde *in vivo* düzenleyici etkisi kesin olarak bilinmemektedir (134,135). *In vivo* gözlemlere dayanarak; TGF- β , IL-10 ve IL-35 gibi inhibitör sitokinlerin Treg fonksiyonuna birincil derecede katkıda buldukları ortaya konmuştur (136). IL-35, TGF- β ve viral persistansta en etkili sitokin IL-10, naif CD4 T hücrelerinin sırasıyla iTr35, Th3 ve Tr1'e dönüşümlerini indükler. Bu sitokinler otokrin etkileriyle Treg hücrelerinin fonksiyonlarını ve stabilitelelerini destekler (137).

6- Sitotoksik moleküller: Granzim ve perforin aracılı mekanizma ile APC ve bunlara yanıt veren T hücrelerinin apoptotik ölümü yolu ile de Treg hücreleri baskılayıcı fonksiyonlarını yerine getirebilirler (123). Treg hücre fonksiyonunda etkili olan tüm bu faktörlere rağmen FoxP3⁺ Treg hücrelerce oluşturulan supresyon mekanizmasının temel parçasını neyin oluşturduğu cevaplanmayı beklemektedir.

İnterlökin-10 (IL-10): T yardımcı tip 2 (Th₂) hücrelerinden salgılanarak Th₁ hücrelerinin ürettiği sitokinleri inhibe eder. IL-10, Th₂ hücrelerine ek olarak makrofajlar, dendritik hücreler, B lenfositler, keratinositler, mast hücreleri, Treg hücreleri ve T yardımcı (Th) 17 hücrelerinden de salınır. IL-10, T hücrelerini ve APC'yi hedef alarak immünoregülasyona aracılık eder (138). Düzenleyici aktivitesini önemli ölçüde APC üzerinden gerçekleştirmektedir (139). Makrofaj ve DH inhibisyonu yapan IL-10, proinflamatuvar sitokinleri ve APC'den kemokin ekspresyonunu sınırlayarak doğal ve hücre aracılı immüniteyi kontrol eder (138). Ayrıca CD4⁺ T hücrelerinin aktivasyonunu, proliferasyonunu ve sitokin üretimini sınırlar (138). TGF- β ile sinerjistik etki gösterir ve immün toleransın indüklenmesinde rol alır (140). IL-10'un immünolojik etkisinin, salındığı hücre ve Treg hücrelerinin bulunduğu mikroçevreye bağlı olarak belirlendiği gösterilmiştir. Pleotropik sitokin IL-10 otoimmün hastalarda B lenfositlerden izole edilseler de Treg hücrelerinin IL-10 mRNA ekspresyonunu arttırdıkları, lenfoid organ germinal merkezindeki B hücrelerde Bcl-2 ekspresyonunu arttırarak apoptozlarını uyardıkları, IL-12 ve Th₁ tip selüler immüniteyi baskıladıkları ve IL-10 ile uyarılmış makrofaj ve dendritik hücrelerin inflamatuvar fonksiyonlarının down-regüle olduğu gösterilmiştir (141,142,143). Yine IL-10 salınımı bloke edilen farelerde yapılan çalışmalarda T hücrelerinden IL-21 ve IL-17 sitokinlerinin, dendritik hücrelerden IL-6 ve IL-23 salınımının arttığı ve kolit gibi otoinflamatuvar hastalıklar geliştiği görülmüştür (144).

Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β): Embriyogenez, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, apoptozis, adezyon ve invazyonda anahtar rol oynayan bir sitokindir (132). TGF- β 'nın başlıca kaynakları; Treg hücreleri dahil T hücreleri ve makrofajlardır (145). TGF- β 'nın; TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 olmak üzere 3 izoformu tanımlanmıştır (146). İmmün sistem hücreleri başlıca TGF- β 1 sentezler. İmmün sistemdeki temel etkisi; lenfositlerin ve diğer lökositlerin aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe etmektir. TGF- β , nötrofiller ve endotel hücrelerini de etkileyerek proinflamatuvar sitokinlerin etkilerine büyük ölçüde karşı koyar. IL-2 üretimini baskılayarak CD4 hücreleri üzerinde proliferasyonu önleyici etki gösterir ve hücre siklus inhibitörlerini artırma yönünde düzenler. Th₁ ve Th₂ hücrelerinin farklılaşmasını direkt olarak inhibe edebilir. Makrofajların aktivasyonunu ve onların proinflamatuvar sitokin üretme yeteneğini inhibe eder.

DH'lerin maturasyonunu önler ve DH tarafından MHC sınıf II ekspresyonunu azaltarak T hücrelerine antijen sunumunu engeller (147). TGF- β 'nın T hücrelerinin in vitro antijen uyarımı ile FoxP3 ekspresyonu ve Treg hücre farklılaşmasını indüklediği gösterilmiştir (148). CD4⁺ Th hücrelerinin Treg veya Th₁₇ hücrelerine farklılaşmasını sağlayan sitokin de TGF- β 'dır. Karşılanmamış TGF- β uyarısı FoxP3 ekspresyonunu artırarak Treg oluşumuna ve immünregülasyonuna yol açar. Ancak inflamasyon sitokini olan IL-6 da ortamda varsa TGF- β naif Th hücrelerini Th₁₇ yönünde farklılaştırır. Ayrıca IL-6, FoxP3 oluşumunu ve Treg farklılaşmasını inhibe eder. Bu durum Treg'lerin fonksiyonel kapasitesini azaltarak Th₁₇ hücrelerinin etkilerine aracılık eder.

İnterlökin-35 (IL-35): Yeni keşfedilmiş heterodimerik sitokin olup FoxP3⁺ hücreler tarafından üretilir ve Treg fonksiyonuna yardımcı olur. Yapılan çalışmalarda IL-10 ile benzer şekilde fare deneylerinde barsak otoimmünite gelişiminin baskılanması ile ilişkili olduğu ancak insanda bu sitokinin üretiminin gösterilmediği bildirilmiştir (149).

Galektinler: Treg fonksiyonlarında önemli bir diğer molekül olup CD45, CD43 ve CD7 gibi glikoproteinlere bağlanarak aktive T lenfositlerini apoptoza götürür ayrıca proinflamatuvar sitokin salınımını inhibe ederler (150).

Treg ve Th₁₇ hücreleri arasındaki ilişki: Naif CD4⁺ hücrelerin Th₁, Th₂, Th₁₇ ve Treg hücrelerine dönüştükleri bilinmektedir. Th₁ hücreleri IFN- γ ve tümör nekroz faktörü (TNF)- β üretirken, Th₂'ler IL-4, IL-5 ve IL-13, Th₁₇ hücreleri ise IL-17 ve IL-6 sentezlerler (151,152). Yeni geliştirilen bir hipoteze göre Treg ve Th₂'lerden Th₁₇ veya Th₁'e doğru yöneltilen yanıtların çarpıklaşması neticesinde otoimmün hastalıklarının gelişimi ve ilerleyişi görülür (153). IL-17'nin romatoid artrit, sistemik lupus eritamatozus, psöriazis, multipl skleroz, sistemik skleroz, kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi kronik otoimmün inflamatuvar hastalıklarda fazla üretimi söz konusudur (151,152).

2.11. Hepatit B Patogenezi ve İmmünolojisi

İnsan karaciğeri çift kan dolaşımına sahiptir; portal venle gastrointestinal sistemden, hepatic arterle sistemik dolaşımdan kanlanır. Karaciğer portal ven aracılığıyla sürekli olarak gastrointestinal sistemden gelen gıda antijenleri ve düşük

aldırmazlık, negatif seleksiyon, periferel anerji, lenfokin üretim disregülasyonu ve defektif antijen sunumu suçlanmıştır (157).

Bu süreçte vücudun immün maturasyonu ve cevabın şiddeti hastalığın seyrini belirler. Hepatit B virüsü nonsitopatik olup immün sistem aracılığıyla doku hasarı ve hepatosit ölümüne neden olabilir. İmmün sistem aracılı eliminasyon mekanizmaları enfekte hücreleri ortadan kaldırırken enfeksiyonu sonlandırmaya çalışır ve kalıcı nekroenflamatuvar aktivite karaciğer hasarına neden olabilir. HBV inkübasyon periodu içinde hepatosite girerek replike olmakta, kendine ait antijenleri üretmekte ve konağın Toll-Like Reseptörleri (TLRs) özellikle de TLR9 ile yabancı olan bu yapıları ve mikroorganizma yüzeyindeki PAMP'ları (Pathogen-associated molecular patterns; mannozil, fukoziil gibi bakteriyel polisakkaritler vb) tanıyarak immün yanıt başlamaktadır (157). Hepatit B enfeksiyonunda TLR9 viral DNA'yı, TLR7 ve TLR8 tek zincirli viral RNA'yı tanıırken, TLR3 çift zincirli viral RNA'yı tanıyarak antiviral aktivite gösterirler (158). HBV'ye karşı doğal immün yanıtta etkili TLR sistemi, sinyal transdüksiyonunun başlamasını tetikleyerek, dentritik hücre maturasyonunun, tip 1 IFN gibi anahtar sitokinlerin üretilmesini ve adaptif immüniteyi destekler (159). TLR3 ve TLR4 nonparankimal karaciğer hücrelerini aktive ederek IFN- β üzerinden HBV replikasyonunun supresyonuna aracılık eder (160). Ayrıca HBsAg ve HBeAg gibi viral parçaları, IRF-3 ve NF- κ B gibi IFN ile uyarılmış gen ya da transkripsiyon faktörleri aracılığıyla (TLR-aracılı antiviral aktivite) suprese ederler (161). TLR3 doğal immünitede viral patojenlerin anımsanmasından sorumludur. TLR3 genotipi prevelansının KHB hastalarıyla karşılaştırıldığında kronik üzerine akut alevlenme gelişen hepatit B hastalarında daha yüksek bulunduğunu bildirmiştir. TLR3 polimorfizminin özellikle kronik üzerine akut alevlenme gelişimi için risk faktörü olabileceği öne sürülmüştür (162).

Naif Th (Th₀) hücre aktivasyonu DH'ler tarafından başlatılır ve diğer antijen sunucu hücreler ile arttırılır. Bu aktivasyon için Th₀ hücrelerinin üç sinyale gereksinimi vardır; 1-Th hücre yüzeyindeki CD4⁺ TCR kompleksi ile APC yüzeyindeki MHC-II⁺AgP kompleksinin birleşmesi, 2-Th üzerindeki CD28 molekülü ile APC üzerindeki B7 (CD80/86) molekülünün birleşmesi (kostimulasyon sinyal), 3-DH'ler tarafından salınan sitokinlerdir. APC tarafından salınan sitokinlerin, PAMP veya doku faktörlerinin özellikleri Th hücre yanıtının yönünü yani polarizasyonunu

belirler. Virüs tarafından uyarılan DH tarafından salınan IL-12 ve IFN- γ aracılığıyla Th₀, Th₁ yönüne çevrilerek ve duyarlılaşarak IL-2, TNF- α ve IFN- γ salınımına ve diğer T hücre ve B hücre proliferasyonu ile virüs eliminasyonuna yardımcı olur. IL-4, IL-10 sitokini salınımı ile uyarılan Th₀, Th₂'ye dönüşerek, IL-4, IL-5 ve IL-10 sitokin salınımı ile B lenfosit uyarılmasına, Th₁ yanıtının baskılanmasına ve antikor cevabı oluşturulmasına neden olur. HBV taşıyıcılarda ve KHB'de interferon yetersizliği, antijen sunumundaki ya da T lenfosit yanıtındaki eksiklik gibi durumlar neticesinde immün yanıt yeteri kadar oluşamaz ve vücuttan virüs temizlenemez. Hepatit B'nin seyrini temelde HBV-spesifik CTL (sitotoksik T lenfosit) belirler, enfekte hücrelerin membranında delikler açan enzimleri sayesinde apoptotik ölümü tetikler; yanıt yeterli ise hastalık iyileşir, yetersizse kronikleşir ve kontrolsüz şekilde şiddetlenirse fulminan hepatit gelişir. CTL aktivitesinin bir belirteci de serum ALT düzeyidir. CTL yanıtı iyi olan hastalarda ALT'nin yüksek olacağı düşünülerek bu hastalarda tedaviye başlanması önerilir, normal düzeyde olanlarda önerilmez. Hepatit immünolojisinde etkin diğer bir grup T hücre ise IL-17 salgılayan Th₁₇ hücreleridir. Bunlar CD4⁺ T hücrelerin proinflamatuvar hücre alt sınıfında yer alırlar. Th₁₇'ye farklılaşmada birçok farklı hücre tarafından üretilen TGF- β , IFN- α , IL-6, IL-1 ve IL-23 gibi inflamatuvar sitokinlere ihtiyaç vardır. IL-17 ana üretilen sitokin olup, IL-21, IL-22, IL-6 ve TNF- α gibi sitokinler de üretilir. IL-17'nin nötrofil aktivasyonunu, inflamasyon bölgesine infiltrasyonunu sağlayarak akut hepatitte virüs temizlenmesinde rol alır. KHB enfeksiyonunda da periferik Th₁₇ hücre yüzdesinde önemli oranda artış saptandığı ve dolaşan IL-17⁺ T hücrelerin büyük oranda karaciğerde akümüle olarak hepatosit hasarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir(163).

Aktif inflamasyon yanıtının tersi yönde fonksiyon gören regülatör T hücreleri (Treg) ise IL-10 ve TGF- β gibi sitokinler üreterek ya da kontakt bağımlı inhibisyonla CD4⁺, CD8⁺, NK hücreleri, NKT, B ve DH üzerine baskılayıcı etki ile immüntoleranstan sorumludurlar. KHB enfeksiyonunda Treg hücrelerinin zararlı etkileri görülür; sağlıklı kontrollere ve akut enfeksiyona göre artmış düzeyleri viral replikasyon/yük ile korelasyon gösterir (157,164). Treg hücrelerden (ayrıca Breg, monosit, intrahepatik T hücreleri, ve kupffer hücrelerinden de) üretilen IL-10; IFN- α üretimini inhibe eder, pDH apoptozisini uyarır, APC'leri baskılar ve CD8⁺T hücre

uyarılmasını zayıflatarak HBV-spesifik T hücre yanıtını baskılar (165-168). Sonuç olarak Treg hücreleri yaptıkları immünsupresyonla virüsün karaciğere aşırı zarar vermesini önlerken enfeksiyon persistansına neden olabilmektedir (169). Bu virüs spesifik T hücre yanıtı baskılanması karaciğeri etkileyen diğer bir virüs olan HCV'de ve HIV'de de gösterilmiş olup Hepatit B de süreç daha karmaşıktır; akut hepatitte Treg cevabı üç aşamada gerçekleşir; başlangıçta Treg yüzdesi düşüktür, ilk bir haftalık erken akut fazda ALT yükselmesine paralel Treg yüzdesinde artış, ortalama 9 hafta süren konvelesans fazında ALT seviyelerinin düşmeye başlaması, Treg hücrelerinin maksimum seviyeye ulaşması ve takip eden 8 haftalık rezölasyon fazında ALT'nin normale dönüşü, HBsAg'nin negatifleşmesi (serokonversiyon) ve Treg hücrelerinde sağlıklı popülasyon düzeyine inişi izlenir. Kronik fazda ise (hepatitin ciddiyeti; total bilirubin, ALT, INR, siroz gelişimi ve viral yüke göre belirlendiğinde) ciddi seyreden KHB'de daha yüksek yüzdeler görülmekle birlikte hem hafif hem ciddi KHB hastalarında Treg düzeyi sağlıklı popülasyonla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunur. Ciddi KHB hastalığında Treg yüzdesindeki artış kötü prognoz ile ilişkilidir ve hepatit B hastalarında karaciğer hasarını göstermede potansiyel bir prognoz belirteci olarak kullanılabilir. İnaktif HBV taşıyıcılarında ise sağlıklı popülasyondan hafifçe daha yüksek Treg seviyeleri görülür ki bu ciddi KHB hastalarının düzeyinden anlamlı oranda düşüktür (157).

Treg ve Th₁₇ arasındaki dengenin bozulması Th₁/Th₂ arasındaki ilişkiye benzer şekilde kronik inflamatuvar hastalıkların, otoimmün hastalıkların, tümörlerin gelişimine neden olmakta, hepatit B enfeksiyonunun kronikleşmesine katkıda bulunmaktadır. Ancak bu ilişkinin antiviral tedavi sonrası değişimi ve bu temele dayanarak yeni tedavi hedefleri geliştirilip geliştirilemeyeceği hakkında çalışmalar çok sınırlıdır. KHB hastalarında yapılan kontrollü bir çalışmada antiviral tedavi sonrası Treg hücreleri ile IL-10, TGF- β sitokin düzeylerinde anlamlı düşüş olduğu gösterilmiştir, yine aynı çalışmada ALT düzeyinin KHB hastalarında daha çok inflamatuvar yanıtla koreleyen, AST ve total bilirubin (Tbil) düzeylerinin ise karaciğer hasarının derecesiyle, Treg/Th₁₇ oranının da Tbil ile korele olduğu gösterilmiştir. Daha hafif seyreden KHB hastalarında (ALT <600IU/L Tbil <51.3 μ mol/L) Treg oranındaki artışın Th₁₇ artışından daha düşük kalarak Treg/Th₁₇ oranının azaldığı, tersine ağır seyreden olgularda ise Treg hücrelerin daha fazla

artarak dengenin Treg yönüne kaydığı gösterilmiştir. Bu sebeple Treg/Th₁₇ oranının hastalığın ağırlığını göstermede biyopsiye alternatif kullanışlı bir belirteç olabileceği ileri sürülmüştür. Antiviral tedavi sonrası Treg hücre yüzdesi düşerek ve Th₁₇ düzeyi arttırılarak Treg/Th₁₇ oranı, vücuttan HBV klirensine yardımcı olacak şekilde, Th₁₇ yönüne kayar ve düşer. Hepatit B'nin spontan rezolüsyonunda da aynı şekilde Treg hücreleri düşerek normal popülasyon yüzdelere döner. HBeAg, Treg hücre ilişkili immüntoleransa yol açan başlıca etmendir. HBeAg pozitif hastaların erken immünlirens safhasında Treg düzeyleri yüksek seyrederek immüntolerans oluşumuna yardımcı olmaktadır. HBeAg negatif hastalarda ise hastalık immün aktif fazda kalarak yüksek Th₁₇ düzeyi ve IL-17 salınımı ile ilişkili olarak sıklıkla fibroz, siroz ve dekompanse siroza ilerleme görülür ve prognozu kötüleştirir (170).

Kronik hepatit B immünolojisinde Th₁, Th₂, Th₁₇, PD-1(Prosedural Death Factor-1), Treg hücreler olmak üzere bir çok proses devreye girer. KHB immün yanıtında Th₁ hücreleri belirgin şekilde aktive olurken Th₂ hücreleri inhibe olur. Kronik hepatit durumlarında TGF- β , IL-4, 13 gibi sitokinler dış matriks proteinlerinin üretimini ve fibrozisi uyararak siroza gidişe neden olur. B lenfositler antikor üretimi, konak hücreye virüs girişini önleme, serbest HBV partiküllerinin nötralizasyonu için kritik önem taşır. Antikorlar tarafından virüsle enfekte hücrenin tanınması, kompleman aracılı ve antikor aracılı selüler sitotoksiste (ADCC) yoluyla öldürülmesi gerçekleştirilir. Antikorlarla kaplanmış hedef hücrelere antikorun Fc parçasından bağlanması NK ve Tc aracılı sitotoksiste ile sonuçlanır. B hücrelerin antikor üretimi genel olarak T hücresi bağımlıdır; hem ortak bir etkileşim gerektirir hem de B hücrelerinin spesifik antikor üreten hücrelere farklılaşması için gerekli sitokinlerin salınması da CD4⁺ hücreler tarafından gerçekleştirilir. HBeAg'e karşı oluşturulan antikor cevabı sıkı bir şekilde T hücre bağımlı iken, alt birimlerinin yapısı nedeniyle HBcAg B hücre aktivasyonunu uyarır. Bu sebeple kronik HBV enfeksiyonunda B hücre uyarımına bağlı olarak anti HBc düzeyleri yüksek bulunur (171-175).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul ve Proje Destek Onayı Bilgileri

Bu tez çalışması 12.11.2015 tarihinde 153 karar numarası ile İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi (İKÇÜTF) Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı tarafından değerlendirmeye alınarak yazılı olarak onaylandı, tarihinde 2016-TDU-TIPF-0014 proje numarası ile İKÇÜTF Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü tarafından desteklenmesi uygun bulundu. Çalışma Helsinki Bildirgesi ilkelerine uygun olarak tamamlandı (176).

3.2. Hasta Seçimi ve Hasta Grubu Materyalleri

Bu araştırma, Ocak 2015-Kasım 2016 tarihleri arasında İKÇÜTF Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'nda yürütüldü. Çalışmaya İKÇÜTF Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Poliklinik/Servisi'ne başvuran ve EASL klinik uygulama rehberi kriterlerine göre Hepatit B tanısı alan 61 hasta ile portör taraması için başvuran 30 sağlıklı kontrol olmak üzere aşağıda belirtilen hasta ve kontrol grubu seçim kriterlerine uyan 91 gönüllü (Power analizi-Pass 11, Power Analysis&Sample Size Software) çalışma hakkında bilgilendirildikten ve yazılı onamları alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri: (i) çalışma bilgilendirilmiş onam formunu imzalayarak çalışmaya katılmaya rıza göstermiş olmak, (ii) erişkin yaş grubunda olmak (18 yaş üzeri), (iii) hasta grubuna seçilecek bireylerin EASL kriterlerine göre; HBV hastalaları için HBsAg serolojisinin pozitif olması, sağlıklı kontrol olarak çalışmaya alınacak gönüllülerin bu serolojik belirteç yönünden negatif olması, (iv) örnek alımından 6 ay öncesine kadar immünmodülatör ajan ya da tedavi almamış olmak, (v) HAV, HCV, HEV, HDV ve HIV virüslerine bağlı ya da alkolik, otoimmün karaciğer hastalığı, herhangi bir malignensi ve diğer ciddi sistemik hastalıkları taşımamak şeklinde seçildi.

Çalışma dışı bırakılma kriterleri olarak: (i) çalışmaya katılmaya rıza göstermemiş olmak, (ii) 18 yaşından küçük olmak (iii) hasta grubuna seçilecek bireylerin HBsAg serolojisinin negatif olması, (iv) son 6 ay içinde immünmodülatör

ajan ya da tedavi almış olmak, (v) virüslere bağlı ya da alkolik, otoimmün karaciğer hastalığı, malignensi veya ciddi sistemik hastalığı olmaktır.

Çalışmaya; yaşları 23-79 arasında değişen 30 kadın, 31 erkek olmak üzere toplam 61 hasta ile yaş ve cins uyumlu 30 sağlıklı kontrol dahil edildi. Hastaların kabulünde yapılan anket ile yaş, cinsiyet, meslek, iletişim bilgileri, yaşadıkları bölge gibi demografik veriler ile ek hastalık/ilaç kullanımı öyküsü, tanısı, semptomları, hepatit B için olası bulaş yolu (aile öyküsü, hastaneye yatış/ameliyat öyküsü, kan/organ nakli, riskli meslek, intravenöz madde bağımlılığı, tatuaj varlığı vb) sorgulandı. Gönüllüler hasta bilgi sisteminden taranarak eski tarihli ve eş zamanlı yapılan biyokimyasal ve mikrobiyolojik laboratuvar analizleri (eritrosit sedimentasyon hızı-ESR, lökosit, hemoglobin, trombosit sayıları (BC-6800, Mindray, China), koagülasyon, α -feto protein (AFP), serum AST, ALT, GGT, ALP, LDH, bilirubin düzeyleri (Architect c16000, Abbott, USA), seroloji: anti HAV, anti HIV, anti HCV, Delta Ag/Ab, HBsAg, antiHBs, HBeAg, anti HBe, anti HBc IgM, anti HBc IgG (Architect Plus i2000 SR, Abbott,USA) ve HBV DNA düzeyi (IU/ml) (Cobas X480, Hamilton, Roche, Swiss), radyolojik (ultrason-USG/bilgisayarlı tomografi-BT) ve girişimsel (karaciğer biyopsisi) tetkik sonuçları aynı anket formu üzerine kaydedildi.

3.3. Kan Alımı ve Örnek Hazırlanması

Hasta ve kontrol grubu çalışma materyali olarak antekubital venden alınmış periferik kan örnekleri kullanıldı. K3-EDTA'lı tüpe 2 ml alınan kan numuneleri örnek alım gününde ve en fazla 30 dk içinde flow sitometri (Akan Hücre Ölçer) yöntemiyle çalışıldı, eş zamanlı jelli düz tübe konan 3 ml periferik kan 4000XG'de 5 dakika santrifuj edildikten sonra elde edilen serumlar -40°C'de çalışma gününe kadar saklandı.

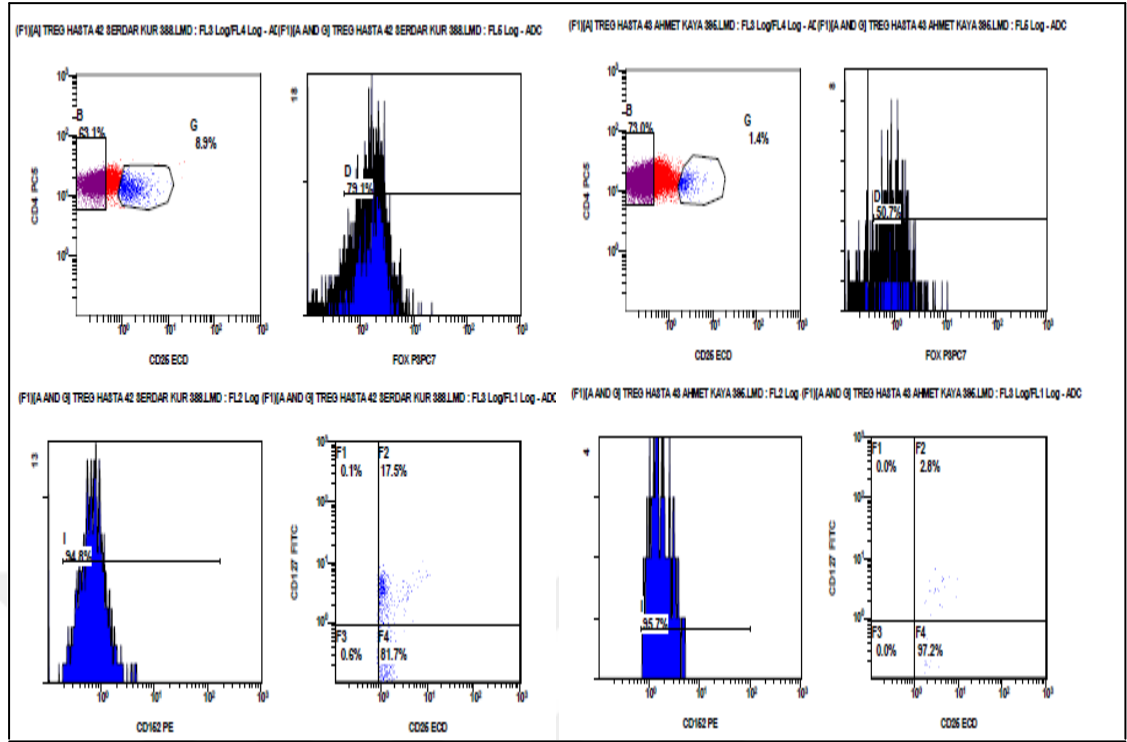
3.4. Flow Sitometrik Çalışma

İKÇÜTF Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında yapıldı. Treg hücre yüzde dağılımları ölçümü için FC 500 Cytometer (Beckman Coulter, Inc. ABD) flow sitometri cihazı ve CXP bilgisayar yazılımı kullanıldı.

Antijen Boyaması: Treg hücrelerini belirlemek için üretici firmanın önerileri doğrultusunda hücre içi boyama protokolü uygulandı;

- 1) 100'er µl kan örnekleri üzerine PerFix nc (permeabilizing-fixative no centrifuge assay kit, Beckman Coulter, Inc., France) R1 reageninden (fiksatif) 5 µl eklenip vortekslendi, oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dk inkübe edildi,
- 2) Ayrı bir tüpte 300 µl Perfix nc R2 reageninde (permeabilizan) üzerine anti CD152-PE, anti CD4-PC5, anti CD25-ECD, anti CD127-FITC, FoxP3-PC7 florokromla konjuge spesifik antikörlerinden (Beckman Coulter, Inc. France) 5–10 µl sırasıyla eklendi,
- 3) Hazırlanan kokteyl bekletmeden kanın üzerine eklenip vortekslendi ve oda sıcaklığında, karanlıkta 1saat inkübe edildi,
- 4) 3 ml PBS (phosphate buffer saline) (Ph: 7.4) tamponu eklenip vortekslendi, 5 dk oda sıcaklığında bekletilerek ardından 500XG'de 5 dk santrifüj edildi,
- 5) Supernatant aspire edilip 3 ml Perfix nc R3(final solüsyonu) eklendi, vortekslendi ve tekrar 500XG'de 5 dk santrifüj edildi,
- 6) Süpernatant aspire edilip 500 µl Perfix nc R3 reageninden eklendi ve pipetajla resüspanse edilen hücreler flowsitometri cihazında ölçüldü.

FSC/SSC hücre dağılımı üzerinde uygun lenfosit kapısında 10.000 hücre sayılıp izotipik kontrolle diğerlerinden ayrılan CD4⁺, CD25^{high} hücre subgrubu olarak en parlak hücreler seçilerek FoxP3⁺ olmaları ile Treg hücre oldukları doğrulandı. Bu hücrelerin CD127^{low}(Interleukin-7 Receptor alpha, IL-7Ra) , CD152⁺ yüzde oranları saptandı. Analizler dot-plot ve histogram grafikleri üzerinde yapıldı. Treg hücrelerin kanda normal dağılım aralığı olan %2-4 üzerindeki değerler artış olarak kabul edildi (105). CXP Software kullanılarak analiz sonucu hücrelerin yüzde değeri hesaplandı (Şekil-3).



Şekil-3 Treg hücre yüzdelerinin flowsitometrik ölçümü

3.5. Kantitatif IL-10 Sitokin Ölçümü:

İmmün modölatör Treg hücre tarafından sekrete edilen IL-10 sitokin ölçümü için ticari manuel kantitatif ELISA kiti (DIAsource Immunoassays SA, Belgium) kullanılarak 96'lık U-tabanlı pleytte üretici firmanın önerileri doğrultusunda tek seferde çalışıldı;

- 1) Kuyucuklara 100'er µl inkübasyon buffer konup kalibratörler, pozitif/negatif kontroller ve çalışılacak serumlardan 100'er µl eklendi,
- 2) 2 saat 700 rpm'de horizontal karıştırıcıda, oda sıcaklığında inkübe edildi,
- 3) Kuyucuklar aspire edildi, 3 kez 0.4 ml yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- 4) Her kuyucuğa 100'er µl örnek dilüenti ve 50'şer µl anti IL-10 HRP (horseradish peroxidase) konjugatı eklendi,
- 5) 2 saat 700 rpm'de horizontal karıştırıcıda, oda sıcaklığında inkübe edildi,
- 6) Kuyucuklar aspire edilip kez 0,4 ml yıkama solüsyonu ile yıkandı,
- 7) Kuyucuklara 200'er µl (tetramethylbenzidine-TMB'nin substrat buffer içine eklenmesiyle yeni hazırlanan) revelation solüsyonu kondu,

- 8) 30 dk 700 rpm'de horizontal karıştırıcıda (güneş ışığından koruyarak), oda sıcaklığında inkübe edildi,
- 9) Kuyucuklara 50'şer µl durdurma solüsyonu eklendi,
- 10) 450 nm ve 490 nm'de absorbansları okundu,
- 11) Optik dansiteleri otomatik mikroyokuyucuda (ELX800, Biotec Instruments Inc,USA) ölçülerek ELISA Kc junior programıyla analizi yapıldı.

Flow sitometri ve ELISA kantitatif analizleriyle sağlıklı bireyler ile hepatit B hastalarının akut ve kronik dönemlerinde Treg hücre dağılımlarına ve sitokin düzeylerine göre hastalığa spesifik immün yanıt durumları karşılaştırıldı.

3.6. İstatistiksel Değerlendirme:

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (statistical package for social sciences) 22.0 kullanıldı. Kategorik verilerin değerlendirilmesinde ki-kare testi kullanılıp (*n*, %) olarak ifade edildi. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uyumu Shapiro-Wilk testi ile analiz edildi. Grup varyanslarının homojenliği Levene's testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren ve grup varyanslarının homojen olduğu parametrelerde iki grup ortalaması arasındaki farkın anlamlılığı Student's t testi ile değerlendirildi, sonuçlar ortalama ve standart sapma ($\bar{x} \pm ss$) ile ifade edildi. Normal dağılım göstermeyen ve heterojen varyanslı parametrelerde iki grup ortalamasının karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi, sonuçlar medyan ve 1.-3. çeyrek değerleri (*Medyan, Q₁-Q₃*) olarak ifade edildi. Normal dağılım göstermeyen ve heterojen varyanslı ikiden fazla grup arasındaki farkın karşılaştırılmasında ise Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Spearman korelasyon analizi ile değişkenler arasındaki ilişkilere bakıldı. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4.BULGULAR

Çalışmaya katılan hasta ve kontrol grubuna ait demografik özellikler aşağıdaki tablolarda özetlenmiştir. Grupların yaş ve cinsiyet dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$), (Tablo-1).

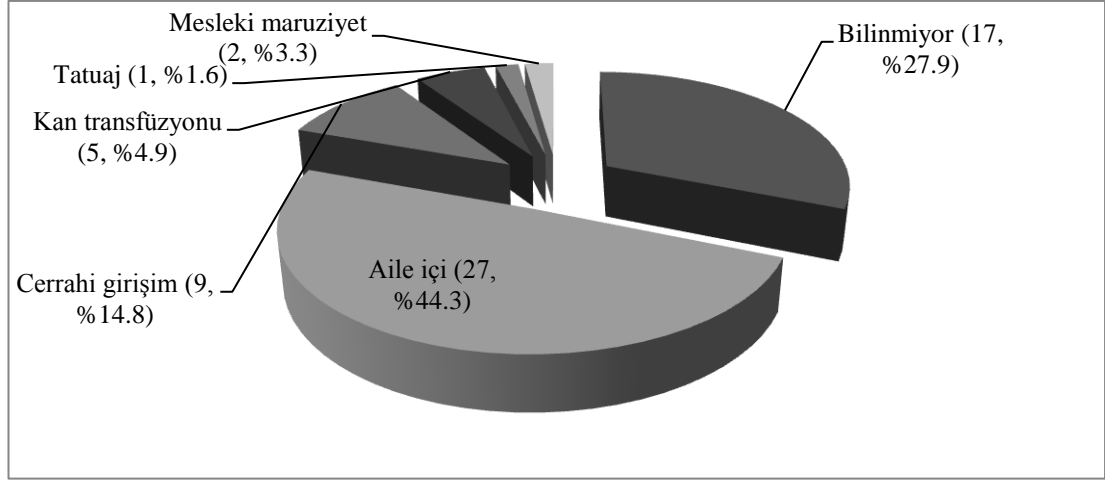
Tablo-1 Hasta ve Kontrol Grupları Cinsiyet, Yaş Dağılımları

| | GRUPLAR | | p |
|--------------------------------------|-----------------|---------------|---------|
| | KONTROL n=30 | HASTA n=61 | |
| Cinsiyet | | | |
| Kadın (n, %) | 15 (%50.0) | 30 (%49.2) | 1.00* |
| Erkek (n, %) | 15 (%50.0) | 31 (%50.8) | |
| Yaş (yıl) Medyan(Q_1 , Q_3) | 44 y (36-62) | 45 y (32-54) | 0.185** |

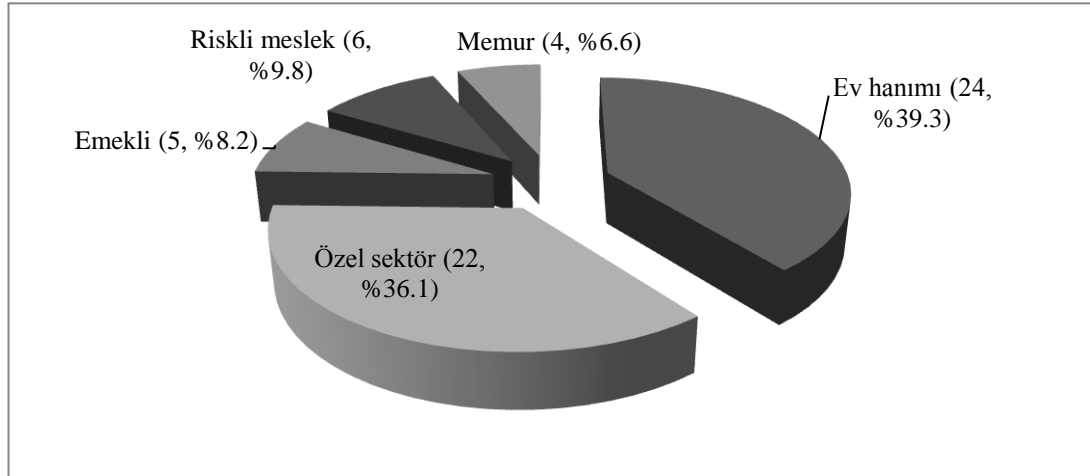
* Nominal verilerin yüzdeleri arasındaki farkın anlamlılığı Chi-Square ($p>0.05$)

** Nonparametrik iki grup ortalamasının arasındaki farkın anlamlılığı Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi, Mann-Whitney U ($p>0.05$)

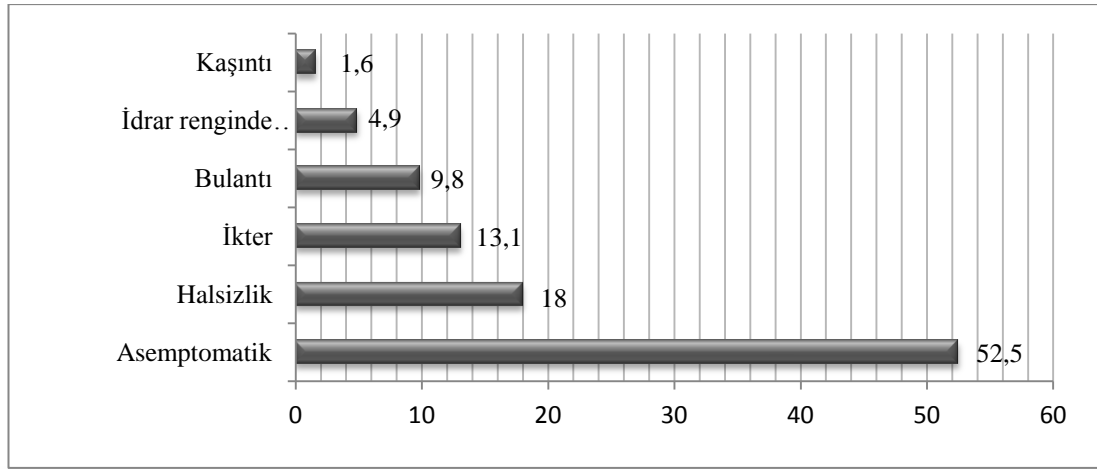
Hepatit B hastalarının bilinen bulaş yolları, meslekleri ve en sık görülen hepatit semptomları Tablo 2, 3 ve 4'de özetlenmiştir. Hastaların %27.9'u HBV'yi hangi yolla aldıklarını bilmediklerini ve başka sebeplerle hastaneye başvurularında yapılan tetkiklerde tanı aldıklarını ifade ederken, en sık bulaş yolunun aile içi olduğu (27, %44.3), bunu cerrahi girişim (9, %14.8) ve kan transfüzyonlarının (5, %4.9) takip ettiği görüldü. Hastalardan geriye dönük edinilen bilgilere dayanarak aile bireylerinin yarısına yakınının (29, %47.5) 1. ve 2. derece akrabalarında ve eşlerinde HBV pozitifliğinin mevcut olduğu görüldü.

Tablo-2 Hepatit B Hasta Gruplarının Bulaş Yolları

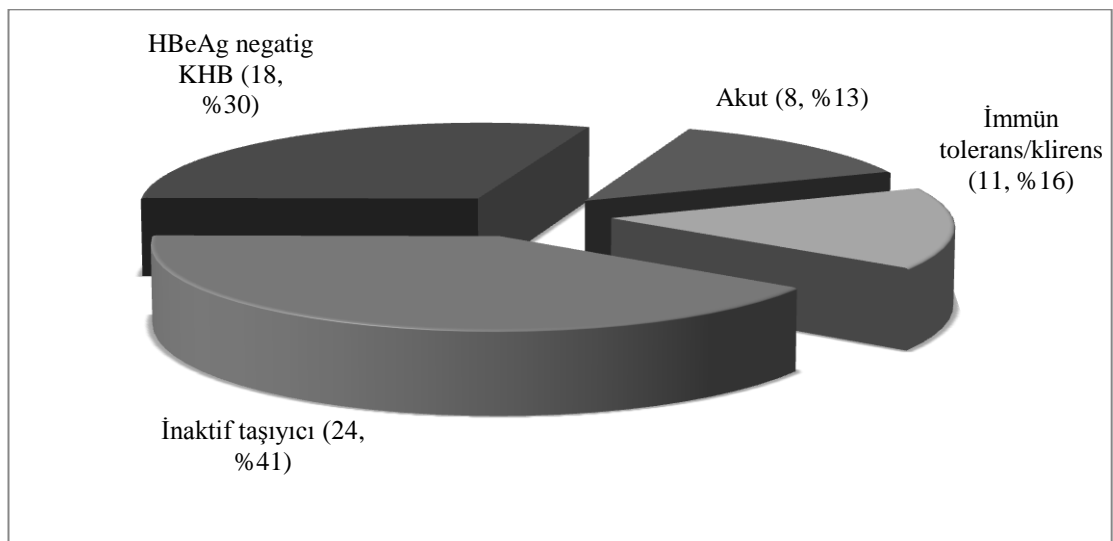
Hepatit B bulaşı açısından riskli mesleklere çalışan (laboratuvar teknisyeni, hemşire, berber) kişiler ise hastaların %9.8'ini oluşturmaktaydı. Hastaların en sık ev hanımı olan bireylerden oluştuğu, bunu özel sektörde çalışanların takip ettiği görüldü.

Tablo-3 Hasta Grupları Meslek Dağılımları

Hastaların büyük oranda hepatit B'yi asemptomatik (%52.5) geçirdikleri, en sık halsizlik, yorgunluk, kas ağrısı gibi non-spesifik yakınmaların (%18) görüldüğü, diğer bulguların sırasıyla ikter (%13.1), bulantı (%9.8), idrar renginde koyulaşma (%4.9) ve kaşıntı (%1.6) şeklinde ortaya çıktığı izlenmiştir.

Tablo-4 Hepatit B Hasta Gruplarının Klinik Bulguları

Çalışmaya dahil edilen akut ve EASL kriterlerince sınıflandırılan kronik hepatit B evrelerine göre hasta sayısı dağılımları tablo 5'te gösterilmiştir. Genel hepatit B hasta popülasyonu ile paralel olarak olguların üçte birinden fazlasını %39.3'lük oranla inaktif taşıyıcılar oluşturmuş, akut evrenin genellikle kısa sürmesi (ortalama 6 hafta) (177), asemptomatik de geçirilebilmesi (178) gibi nedenlerle en düşük yüzdeli hasta grubunu akut hepatit B olguları oluşturmuştur.

Tablo-5 Hepatit B Hasta Grupları

Hepatit B hastalarında virüse spesifik immün regülasyonun bir belirteci olarak Treg hücre ve bu hücrelerden salınan IL-10 sitokin düzeylerinin klinik evrelere göre dağılımı, sıklık ve istatistiksel ilişkileri tablo 6'da gösterilmiştir.

Akut evredeki hepatit B hasta sayısının düşük olması nedeniyle normal dağılım göstermeyen (Shapiro-Wilk, $p=0,045$) bu grupta Treg hücre düzeyinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması non-parametrik Mann-Whitney U test ile yapılmıştır. Akut evredeki hastaların Treg hücre yüzdeleri normal değer ($\%2-4$) alt sınırından daha düşük (median= $\%1.50$, $0.6-3.5$) saptanmış, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,005$) bulunmuştur. Normal dağılım gösteren kronik hepatit B gruplarının sağlıklı kontroller ile arasındaki farkın anlamlılığı Student t test ile değerlendirilmiş; immüntolerans/immünlirens gruplarındaki ($\pm SD=4.09$, mean= $\%6.95$, median= $\%6.8$), inaktif taşıyıcılardaki ($\pm SD=2.25$, mean= $\%5.904$, median= $\%5.65$) ve HBeAg negatif KHB hastalarındaki ($\pm SD=2.95$, mean= $\%6.261$, median= $\%5.90$) Treg hücre yüzdeleri sağlıklı kontrollerle ($\pm SD=1.01$, mean= $\%4.073$, median= $\%4.1$) karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (Tablo-6). Tüm hepatit B klinik evreleri ve sağlıklı kontroller arası Treg hücre yüzdeleri çoklu karşılaştırılması Kruskal-Walis testiyle değerlendirilmiş; sağlıklı kontrollerle inaktif taşıyıcılar ve HBeAg negatif KHB hastaları arasında (sırasıyla $p=0.017$, $p=0.028$), akut hepatit B hastalarıyla da diğer KHB hastaları arasında (immüntolerans/klirens dönemi $p=0.004$, inaktif taşıyıcı $p=0.002$, HBeAg negatif KHB $p=0.002$) istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür (Tablo-7).

Tüm hepatit B klinik evreleri arası IL-10 sitokin düzeyi farkının istatistiksel önemi Kruskal-Walis testiyle gösterilmiştir; akut hepatit B evresindeki hastaların ($\pm SD=10.67$, mean=39.6), immüntolerans/immünlirens gruplarının ($\pm SD=14.27$, mean=29.2), inaktif taşıyıcıların ($\pm SD=14.65$, mean=29.2) ve HBeAg negatif KHB hastalarının ($\pm SD=53,25$, median=28.85) IL-10 düzeyleri sağlıklı kontrollerle (median=11.7, 17.3-44.9) karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$) (tablo-7).

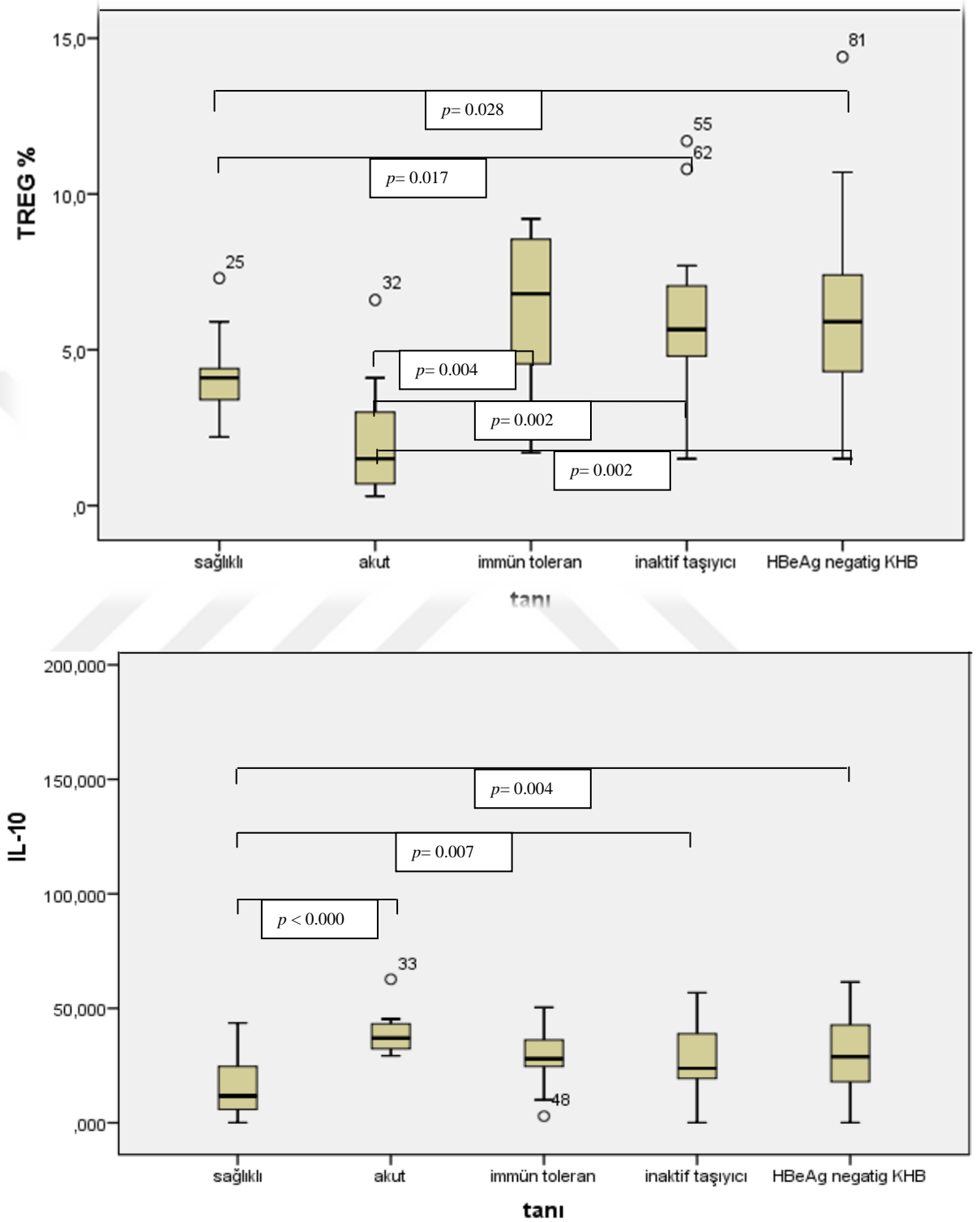
Tablo-6 Çalışma Gruplarında Treg ve IL-10 düzeyleri

| | ÇALIŞMA GRUPLARI | | | | |
|---------------------------|------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|-----------------------------|
| | Kontrol | Akut | İmmün tolerans/ klirens | İnaktif Taşıyıcı | HBeAg negatif KHB |
| Treg (%) <i>p</i> | 4.07±1.01* | 1.50 (0.6-3.5)** 0.005 | 6.95±4.09* ,001 | 5.90±2.25* ,000 | 6.26±2.95* ,001 |
| IL-10 (pg/ml) <i>p</i> | 11.7(5.2-4.9)** | 39.06±10.6* 0.005 | 29.2±14.2* 0.006 | 29.2±14.6* 0.000 | 28.8 (17.3-44.9)** 0.001 |

* Ortalama ve standart sapma ($\bar{x}\pm ss$)

** Medyan ve 1.-3. çeyrek değerleri (Medyan, Q_1 - Q_3)

Tablo-7 Çalışma Grupları Treg ve IL-10 Düzeyleri Box-plot Grafiği



** Veriler box-plot grafiği ile gösterilmiştir; yatay çizgiler 25., 50. ve 75. persantilleri, dikey çizgiler 10. ve 90. persantilleri temsil etmektedir. Non-parametrik değerlerin çoklu karşılaştırmaları için p değeri (<0.05) Kruskal-Wallis kullanılarak hesaplanmıştır.*

Hepatit B hasta gruplarının ALT düzeyleri sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında yüksek bulunmakla birlikte bu fark yalnız akut hepatit B grubunda istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.01$); INR ve total bilirubin düzeyleri akut hepatit B grubunda yüksek bulunurken diğer gruplarda normal sınırlar içinde saptandı. HBV DNA viral yükü akut ve immütoleran gruplarda en yüksek değerlere ulaşırken (sırasıyla; 10^5 ve 10^6) inaktif taşıyıcı ve HBeAg negatif KHB gruplarında düşük seviyelerdeydi. Serum ALT düzeyi ile INR ($r=0.32$, $p=0.012$) ve total bilirubin ($r=0.53$, $p<0.000$) düzeyleri arasında, HBsAg ile HBV DNA ($r=0.61$, $p=0.006$), HBsAg ile Treg hücre yüzdeleri ($r=0.23$, $p=0.028$), IL-10 ($r=0.48$, $p<0.000$) düzeyleri arasında pozitif korelasyon izlendi (Tablo-8, 9).

Histolojik aktivite indeksi (HAI) bakılabilen gruplarda; immütolerans/klirens ($HAI_{ort}=7$) ve HBeAg negatif KHB hastaları ($HAI_{ort}=6$) ile inaktif taşıyıcılar ($HAI_{ort}=3$) arasında istatistiksel olarak belirgin anlamlı fark izlendi ($p < 0.01$).

Dot-plot flowsitometri analizinde Treg hücreleri belirlemek amacıyla $CD4^+CD25^{high}$ floresans boyanan alanda seçilen hücre popülasyonu diğer Treg belirteci olarak kullanılabileceği düşünölen $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (63.17 ± 22.61), $CD25^+CD152^+$ (90.219 ± 6.42) ve $CD25^+CD127^{low}$ (84.84 ± 7.78) analizleri ile karşılaştırıldığında pozitif korelasyon göröldü ($r=0.34$, $p=0.001$).

Tablo-8 *Biyokimyasal Belirteçlerin, HBV DNA Yükü ve HAI Evreleme Düzeylerinin Hasta Grupları İçinde Karşılaştırılması*

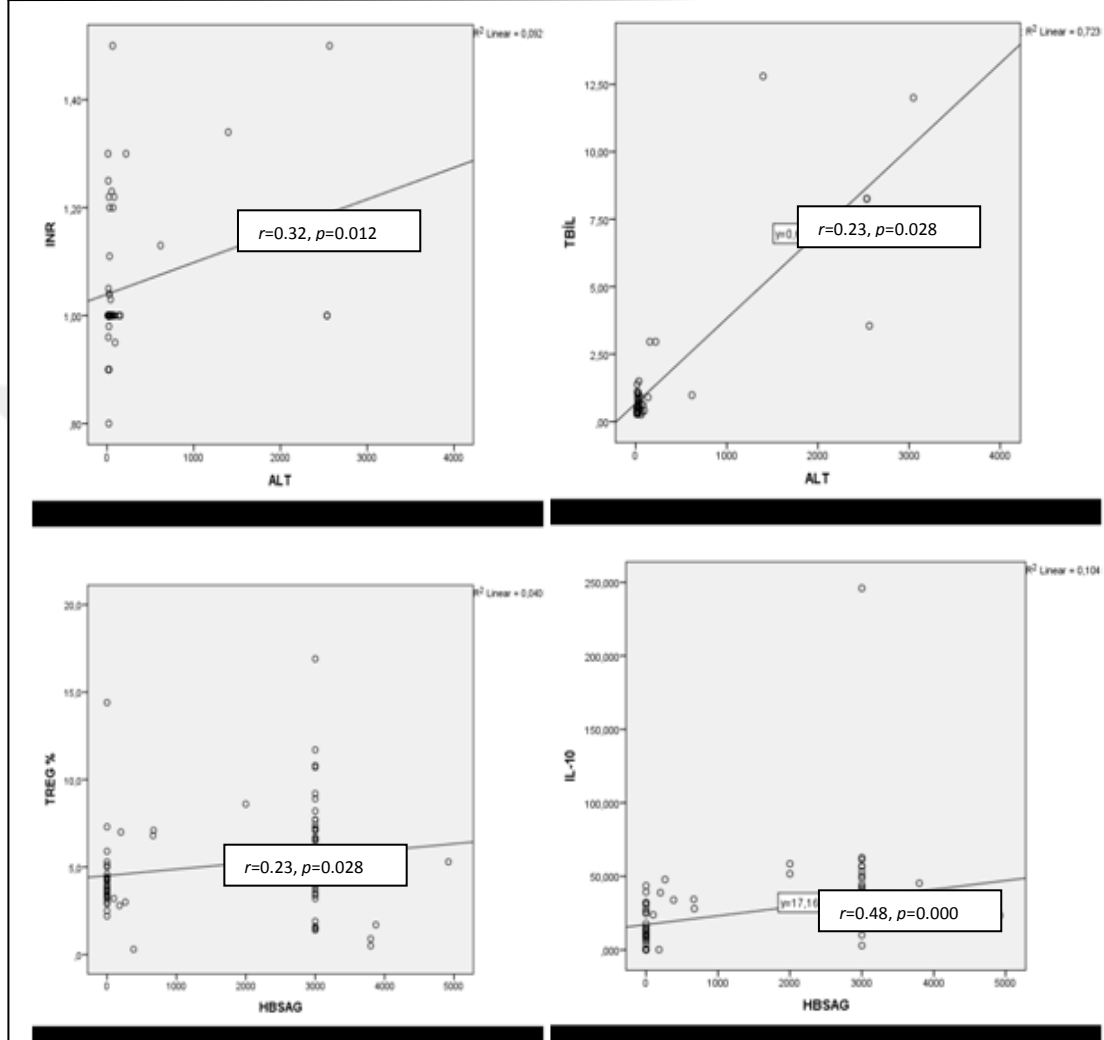
| | HEPATİT B HASTA GRUPLARI | | | |
|--------------------------|---|---|--|--|
| | Akut | İmmün tolerans/klirens | İnaktif taşıyıcı | HBeAg negatif KHB |
| ALT(U/L) | 1967 (170-2557)** | 41 (27-82)** | 17.5 (15.25-22.75)** | 28 (20-63.25)** |
| INR | 1.22± 0.21* | 1.08 ±0.09* | 1± 0.08* | 1 ±0.09* |
| T bil(µmol/L) | 5.9 (2.9-11.06)** | 0.7 (0.57-0.90)** | 0.51 (0.37-0.62)** | 0.62 (0.4-0.88)** |
| HBV DNA (viral kopya/mL) | 3.36x10 ^{4**} 1.8x10 ³ -4.51x10 ⁵ | 1.49 x10 ⁵ ** 1.16x10 ⁵ -2.39 x10 ⁶ | 0.45 x10 ^{3**} 63-1.63x10 ³ | 7.89x10 ^{3**} <15-3.44x10 ⁴ |
| HBsAg (IU/ml) | 2872±1069* | 2406±1235* | 2645±959* | 2828±912* |
| HAI | *** | 7(4-9)** | 3(2-4)** | 6(5-8)** |

* Ortalama ve standart sapma ($\bar{x}\pm ss$)

** Medyan ve 1.-3. çeyrek değerleri (Medyan, Q_1 - Q_3)

*** Akut hepatit B hastalarında karaciğer biyopsisi yapılmamıştır

Tablo-9 Spearman Korelasyon Analiziyle Değerlendirilen Hasta Verilerinde Pozitif İlişki Gözlenen Parametreler



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hepatit B virüs enfeksiyonları dünya çapında neden olduğu 2 milyar enfekte ve 240 milyon kronik HBV enfeksiyonlu birey nedeniyle başlıca halk sağlığı sorunlarından biridir (179). Hepatit B enfeksiyonunun vücuda girişi ve inkübasyonundan başlayarak konakta izleyeceği seyir ve nasıl sonuçlanacağı; doğal ve kazanılmış immün yanıtın karşılıklı etkileşimini içeren karmaşık bir düzen sonucu belirlenir.

Hepatit B enfeksiyonunu anneleri yoluyla edinen infantlarda intrauterin Treg düzeylerinin yüksek olması yanı sıra CD8⁺ ve CD4⁺ T hücre fonksiyonlarının yetersizliği nedeniyle KHB gelişme riskinin belirgin derecede yüksek olduğu, yeni doğan döneminde ise Treg düzeylerinin intrauterin döneme oranla düştüğü gösterilmiştir (180). Yetişkin dönemde ise Treg hücre düzeylerinin yaşla birlikte yükseldiği bildirilmiştir (181). Bu nedenle çalışmamızda yaşları 29 ile 73 arasında değişen (medyan: 45y) 30 sağlıklı ve yaşları 23 ile 79 arasında değişen (medyan: 44y) 61 hepatit B hastası bireyin yaşlarının Treg hücre düzeyleri ile korelasyonu değerlendirilmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösterilememiştir ($p=0.88$). Ayrıca çalışmaya dahil edilen 45 kadın ve 46 erkek gönüllünün Treg düzeyleri ile cinsiyetleri arasında da net bir ilişki görülmemiştir. Benzer gruplarda yapılan çalışmalarda hastaların olası bulaş yolları ve semptomları ile ilgili veri sunulmadığı için kıyaslama yapılamamış ancak HBV enfeksiyonu ile ilgili literatür dahilindeki bilgilerimiz doğrultusunda, hepatit B hastalarının önemli bir bölümünde (% 27.9) bulaş yolunun ve zamanının bilinmediği ve başka sebeplerle rutin yapılan tetkiklerde rastlantısal tanı aldıkları gözlenmiştir. En sık bulaş yolunun aile içi olduğu (%44.3, olasılıkla anneden doğum sırasında ya da horizontal yolla enfekte aile bireylerinden), bunu özellikle 1990 yılı öncesi serolojik tanı yöntemlerinde yalancı negatifliğin yüksek oluşuna bağlı, cerrahi girişim (% 14.8) ve kan transfüzyonlarının (% 4.9) takip ettiği görülmüştür (182). Hastalardan geriye dönük edinilen bilgilere dayanarak aile bireylerinin yarısına yakınının (% 47.5) 1. ve 2. derece akrabalarında ve eşlerinde HBV pozitifliğinin mevcut olduğu görülmüştür. Hepatit B bulaşı açısından riskli mesleklerde çalışan (laboratuvar teknisyeni, hemşire, berber) kişilerin ise hastaların % 9.8'ini oluşturması özellikle sağlık hizmetleri alanında iş güvenliğinin iyileştirilmesine yönelik daha fazla önlemlere

ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır. Hastaların büyük oranda hepatit B'yi asemptomatik (%52.5) geçirdikleri, doktora en sık halsizlik, yorgunluk, kas ağrısı gibi non-spesifik yakınmalarla (%18) başvurdukları görülmüştür. Hastalığın akut evresindeki olgularda ise karaciğer fonksiyonlarındaki bozulmaya bağlı bulantı, iktar (sklera ve ciltte), kaşıntı, idrar renginde koyulaşma bulgularının görüldüğü kaydedilmiştir (178).

Regülatör T hücreler ilk kez 1970 yılında supresör hücreler olarak tanımlanmış, bu hücrelerin bireyin kendisine ait olan öz antijenlerine immün cevap oluşturmadığı ve immün homeostazisin sağlanarak idame edilmesinde rol aldıkları gösterilmiştir (183). 1980'lerde ise izolasyon ve tanımlanmasının zorluğundan dolayı çalışmalar bırakılmıştır. 1995 yılında Sakaguchi'nin interlökin-2 (IL-2) reseptörü α zincirinin CD4⁺ Treg hücreler için fenotipik bir belirteç olduğunu bulmasıyla birlikte Treg hücreleri üzerine olan çalışmalar hız kazanmıştır (184). Günümüzde, periferik komponentte kolayca elde edilebilen Treg hücrelerinin yetersizliği, iyi tanımlanmış özgün işaretçilerin az oluşu ve CD4⁺CD25^{low} non-Treg hücrelerin varlığı dışında, supresör aktivitesi olan saf CD4⁺CD25^{high} Treg hücrelerinin hızla büyümesine ilişkin protokollerin standardize olmayışı gibi nedenlerle halen zorluklar mevcuttur (185). Şimdiye kadar yapılan çalışma sonuçlarında da Treg hücre düzeylerindeki artış veya düşüş oranları ile ilgili çelişkiler mevcuttur. Romatoid artrit (RA) hastalarında yapılan bir çalışmada (Cao, 2004) periferik kan Treg oranlarında düşüş gösterilirken başka bir çalışmada (Amelsfort, 2004) Treg yüzdesinde artış rapor edilmiş yine sistemik lupus eritamatozus (SLE) hastalarında yapılan bazı çalışmalarda (Habibagahi ve ark, 2010; Crispin ve ark, 2003; Bonelli ve ark, 2008) Treg yüzdesinde düşüşe ters olarak başka bir çalışmada (Suarez, 2006) artış görüldüğü rapor edilmiştir (186). Ayrıca KHB hastalarında yapılan çalışmalarda da Treg hücre oranındaki artış derecesi çeşitlilik göstermektedir (157).

Yetişkin hepatit B hastalığının %90-95'inin genellikle bariz klinik bulgular görülmeden spontan olarak kendi kendini sınırlayan enfeksiyon şeklinde seyretmesi ve kısa bir akut periyottan sonra doktora başvurduklarında konvelesans dönemine geçmiş olmaları nedeniyle akut hepatit B (AHB) hastalarını bu evrede tanımanın ya da yakalamanın zor olduğu bilinmektedir. Bizim çalışmamızda bu sebeple en düşük sayıdaki grup AHB hastaları (8, %13) idi. Hepatit B enfeksiyonu akut evresinde Treg

hücrelerden ziyade efektör T hücrelerin hakimiyeti olup yapılan çalışmalarda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında Treg yüzdesinde anlamlı fark gözlenmezken, tersine KHB sürecinde başrol oynadığı ve aslında iyileşme yerine kronikleşmeye ilerlemeyi belirleyen major faktörün bu hücrelerin davranış paterni olabileceği ileri sürülmüştür. Yapılan çalışmalarda, KHB hastalarının Treg hücreleri, AHB hastalarından %33 daha yüksek bulunmuştur (OR = %1.33 95 CI: 1.16–1.52) (178,187). İlginç olarak, ağır KHB hastaları ile AHB hastalarının her ikisinde de immün yanıt kuvvetliken Treg profilleri farklılık gösterir; ağır seyreden KHB hastalarının hem periferik kanlarında hem de karaciğer dokularında Treg hücre yüzdeleri yüksek seyrederken AHB hastalarının erken safhasında (ilk hafta) yüzdenin düşük olduğu görülür (157). KHB hastalarının akut alevlenmelerinde Treg düzeyinin asemptomatik taşıyıcılarla karşılaştırıldığında belirgin olarak daha yüksek oluşu nedeniyle, hastalığın ağırlığını gösterecek bir prognostik belirteç olabileceği bildirilmiştir (162). Zhi Jun Su ve ark. yaptığı çalışmada, heparinize periferik kanda Treg ve Th₁₇ düzeyleri birlikte ölçülmüş, hastalar serum Tbil ve ALT düzeylerine göre ağır ve hafif KHB olarak iki grupta değerlendirilmiştir (170). Treg hücreler CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} olarak seçildiğinde sağlıklı kontrollerin Treg düzeyleri (%5.69), ağır (%7.66) ve hafif (%6.72) KHB hastalarından istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. Bizim çalışmamızda, akut evredeki hastaların Treg hücre yüzdeleri normalin (%2-4) alt sınırından daha düşük (\pm SD=2.14, median=%1.50) saptanmış, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.005$) bulunmuştur. İmmüntolerans/immünlirens gruplarındaki (\pm SD=4.09, mean=%6.955, median=6.8), inaktif taşıyıcılardaki (\pm SD=2.25, mean=%5.904, median=5.65) ve HBeAg negatif KHB hastalarındaki (\pm SD=2.95, mean=%6.261 median=5.90) Treg hücre yüzdeleri sağlıklı kontrollerle (\pm SD=1.01, mean=%4.073, median=4.1) karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Gruplar arası Treg yüzdelerinin farklılığı karşılaştırıldığında; akut ve tüm KHB grupları arasında ($p<0.01$), sağlıklı kontrollerle inaktif taşıyıcılar ($p=0.017$) ve HBeAg negatif KHB hastaları ($p=0.028$) arasında istatistiksel olarak belirgin fark gözlenmiştir. Dongping Xu ve ark. yaptığı çalışmada heparinli tam kanda Treg düzeylerini saptamak için kullanılan Ficoll Hypaque yoğunluk gradiyentine göre santrifüj yöntemiyle periferik kan monükleer hücreler izole edilmiş ve CD4⁺CD25^{high} subpopülasyonu CD4⁺CD25^{low} hücrelerden ayrılıp

zenginleştirildikten sonra FoxP3 mRNA miktarı real-time PCR ile değerlendirilmiştir (157). Treg hücrelerinin ağır KHB hastalarında %6.65, hafif seyirli KHB hastalarında %3.74 ve akut dönemde %3.02 bulunarak bu sonuçların sağlıklı kontrollerin Treg yüzdelerinden (%3.57) istatistiksel olarak farklı bulunduğu bildirilmiştir ($p<0.01$). KHB hastalarının hem periferik kan hem de karaciğer dokularında sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında yüksek düzeyde FoxP3 mRNA eksprese ettikleri gösterilmiştir. Akut enfeksiyonun erken periyodunda ise FoxP3 mRNA ekspresyonunun sağlıklı kontrollerden düşük olduğu görülmüş ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu çalışma ile bizim bulgularımız Treg yüzdeleri yönünden uyuşmakla birlikte kullanılan kan örneği (EDTA'lı yerine heparinli örnek), yüzey belirteçleri ve FoxP3 gösterilmesindeki yöntem farklılıkları; akut hepatit B grubunun üç evrede incelenmesi, inflamatuvar hücreler gibi Treg hücrelerinin de karaciğer dokusunda akümüle olması nedeniyle regülatör T hücrelerinin doku yüzdelerine de bakılması, çalışmamızda immüntolerans/immünlirens ve HBeAg negatif KHB hasta grupları yerine ağır KHB, inaktif taşıyıcılar yerine de hafif KHB hasta grupları oluşturulması gibi değerlendirme farklılıkları mevcuttur.

Seyed Hossein Aalaei-Andabili (178) tarafından yapılan sistematik derlemede, 10^7 viral kopya/ml üzerinde HBV DNA yüküne sahip hastaların daha düşük viral yüklü hastalarla karşılaştırıldığında Treg hücre yüzdelerinin anlamlı ölçüde yüksek bulunduğu (OR: % 1.24 95CI: 1.08–1.41, $p = 0.041$), bu nedenle Treg hücre artışının HBV DNA yükü ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda immüntolerans ve klirens dönemindeki hastalarda en yüksek HBV DNA yükü saptanırken (1.49×10^5), bunu AHB hastaları izlemiştir (3.36×10^4), inaktif taşıyıcıların ve HBeAg negatif KHB hastalarının viral yükü ise daha düşük bulunmuştur (sırasıyla, 0.45×10^3 , 7.89×10^3). HBV DNA yükü ile Treg hücre yüzdesi arasında, her evredeki hastalar için, pozitif ilişki görülmüştür ($p<0.05$). Hastalarımızda çok yüksek HBV DNA ($>10^7$ viral kopya/mL) değerlerinin az saptanmasının hastanemizin merkezi, üçüncü basamak sağlık hizmeti veren bir kurum olması nedeniyle hastalık izlem imkanlarına ve antiviral tedaviye ulaşılabilirliğin yüksek oluşuna bağlı olduğu kanaatindeyiz. Treg hücre yüksekliğinin HBV replikasyonuna izin verdiği ve HBeAg'ye karşı immün yanıtızlığa neden olduğu bildirilmiştir (188). Çalışmamızda, HBeAg negatif KHB hastalarıyla

karşılaştırıldığında, immüntolerans/klirens dönemindeki KHB hastalarında HBeAg varlığı ile dolaşımdaki Treg yüzdesi arasında literatürle uyumlu olarak pozitif ilişki gösterilmiştir ($p<0.05$) (188). Ma Hui ve ark. (189) 2013 yılında yaptığı çalışmada, HBsAg düzeyleri <1500 IU/ml olan hastaların tedavi ya da takiplerinde FoxP3⁺ Treg oranlarının da düştüğü gösterilmiştir ($p=0.029$). Bizim çalışmamızda, hastaları akut enfeksiyon döneminden başlayarak farklı evrelerdeki Treg hücre düzeyleri ile değerlendirme imkanımız olmasa da HBsAg düzeyleri ile Treg yüzdeleri arasındaki ilişkiye baktığımızda, HBsAg ile Treg hücre yüzdeleri ($p <0.028$) ve IL-10 (<0.000) düzeyleri arasında pozitif korelasyon izlendi.

Zhi Jun Su ve ark. (170) yaptığı çalışmada, Treg/Th₁₇ hücre oranı artışıyla TBil, DBil ve ALT düzeyleri arasında, HBeAg pozitif KHB hasta grubunda pozitif ilişki görülürken HBeAg-negatif hasta grubunda negatif bir ilişki gözlemlendiği bildirilmiştir. Tang ve ark. (178) yaptığı çalışmada ise, Treg hücre düzeyinin ALT düzeyi ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Dongping Xu ve ark. (157) yaptığı çalışmada, Treg hücre düzeyi ile HBV DNA yükü arasında pozitif ilişki gösterilirken ALT düzeyleri arasında anlamlı korelasyon görülmeyen çalışma bulgularının aksine bizim çalışmamızda, AHB hastalarında serum ALT düzeyi ile Treg düzeyleri arasında negatif korelasyon ($p <0.05$) görülürken diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir.

Yetişkin HBV enfeksiyonlarında, akut hepatitin %90'ın üzerinde spontan iyileşmesi, ayrıca karaciğer fonksiyonlarının bozulması, INR yükselmesi ve trombosit fonksiyon bozukluğuna bağlı oluşabilecek ek komplikasyonlar nedeniyle, akut evrede karaciğer biyopsisi yapılmamaktadır. Karaciğer dokusunda nekroz, inflamasyon, fibrozis oluşumunun değerlendirilip derecelendirildiği HAI, immüntolerans/klirens ve HBeAg negatif KHB hastaları ile inaktif taşıyıcılar arasında karşılaştırılabilmektedir. İstatistiksel olarak belirgin anlamlı fark izlenmesi girişimsel zorluklarına ve risklerine rağmen karaciğer biyopsisinin hala hasta evrelemede ve tedaviye yön verilmesinde değerli olduğunu göstermektedir ($p <0.05$) (177).

Daha önce yapılan çalışmaların çoğu Treg hücrelerini tanımlamak için CD4 ve CD25'i kullanmıştır. Fakat CD25 fonksiyonel T hücreler tarafından da eksprese

edilir. Ayrıca CD25'in düşük ya da yüksek ekspresyonuna ilişkin net tanımlar da henüz mevcut değildir. Bu nedenle Treg düzeyini belirlemek için CD4 ve CD25 ile işaretlemenin doğruluğu yeterli değildir (184). Güncel veriler doğrultusunda, FoxP3 Treg hücreleri için en özgün ve en iyi işaretleyici olarak kabul edilmektedir. Ancak, FoxP3'ün hücre içinde eksprese edilmesi nedeniyle Treg hücrelerin bu belirtece göre izole edilmelerinin güç olması yüzeyde eksprese edilen başka belirteçlerin araştırılması gereğini doğurmuştur (190). Ayrıca doğal olarak direkt timusta oluşan ve temas bağımlı, sitokin bağımsız supresör yanıt yeteneğindeki $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ T hücreler (nTreg) (ayrıca $CD69^-$, $CTLA-4^+$, $CD45RO^-$) dışında, antijenle karşılaşma sonucu IL-10 bağımlı olarak periferden kaynaklanan $CD4^+CD25^{low}FoxP3^{low}$ IL-10⁺ tip1 T regülâtör hücre yüzdesinin ve IL-10 düzeylerinin otoimmün hastalıklarda serumda arttığı gösterilmiştir (191). Fonksiyonel farklılaşma için IL-4 bağımlı olan Th₃ hücreler ve CD8⁺ Treg hücreler olmak üzere değişik tip Treg hücreler ve yine FoxP3⁺ B hücreler (Breg) mevcuttur (192,193,194). Bu yüzden tüm Treg hücrelerin FoxP3 yüksek pozitif olmaması ve düşük FoxP3⁺ hücrelerin supresif etki gösterememesi, yine tüm FoxP3⁺ T hücrelerin regülâtör olmaması gibi sorunlar nedeniyle FoxP3 pozitifliğinin Treg hücrelerin gösterilmesindeki güvenilirliği konusunda soru işaretleri oluşturmuştur (195-199). Yakın zamanda Lee ve ark. (200) tarafından yapılan çalışmada, yabancı antijenlere spesifik TCR'ler taşıyan Treg'lerin hem periferde hem de timusta bulunduğunu ancak yeni bir self-antijenle uyarıldıklarında, FoxP3⁻ ve FoxP3⁺ Treglerin birlikte delesyona uğrarken FoxP3⁺ Treglerin bu klonal delesyona daha fazla direnç gösterdiği dolayısıyla FoxP3⁺/FoxP3⁻ oranının arttığı gösterilmiştir, bu sinyal değişiminde Treg yüzeyine bağlı CTLA-4 pozitifliğinin belirleyici olduğu görülmüştür (201,202). Foliküler regülâtör T hücre (Tfreg) kaybının yabancı antijenlere karşı humoral immün yanıtı güçlendirdiğinin gösterilmesi ayrıca bu hücrelerin de proste rollerinin olduğunu kanıtlamıştır (203-205). İnsanda regülâtör Foxp3^{high}CD25^{high}CD4⁺ T hücrelerin hafıza fenotiplerinde CTLA-4 (CD152) eksprese edilmektedir ve APC'ler üzerindeki CD80 ve CD86'nın down-regülasyonuna bağlı immüsupresyona neden olmaktadır. CTLA-4 blokajının, FoxP3 eksikliğine benzer şekilde, otoimmün ve inflamatuvar bağırsak hastalığı gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (206-209). Başka bir çalışmada ise kanser hastalarında

Treg hücrelerinin yüzeyinde CTLA-4^{high}CD45 R0⁺CD62L⁺ ekspresyonu tanımlanmıştır (210,211). CTLA-4 uzaklaştırılan fare deneylerinde fatal otoimmün hastalıkların, hiper IgE sendromu ve lenfoproliferatif bozuklukların geliştiğini gösteren ve yine yalnız CD4⁺CD25⁺ hücrelerle karşılaştırıldığında CTLA-4 pozitifliğinin Treg hücre oranlarıyla daha iyi korele bulunarak bu hücreleri tanımlamada kullanılabileceğini öne süren çalışmalar mevcuttur (212-215). Ancak CTLA-4 veya GITR benzeri hücre işaretleyicilerin nTreg hücrelerini efektör T-hücre popülasyonundan ayırt etmede kullanılamayacağı çünkü Treg hücrelerde eksprese edildiği, CTLA-4 ve GITR benzeri bazı işaretleyicilerin aynı zamanda potansiyel efektör hücrelerde de eksprese edildiği öne sürülmüştür. Bu durum immünofenotipik ve fonksiyonel tanımlama için sorun teşkil etmektedir (216,217). Son zamanlarda IL-7 reseptörün α zinciri olan CD127 tanımlanmıştır. Groth ve Bluestone'un (218,219) eş zamanlı olarak yakın zamanda yapmış oldukları çalışmada CD127 (IL-7R α)'nin Treg üzerine down-regülatör olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada, yüksek düzey CD127 eksprese eden aktive T hücrelerinin ve hafıza T hücrelerinin tersine Treg hücrelerinin CD127^{low}/- olduğu ve CD127'nin in vitro çalışmalar ve *in vivo* tedavi potansiyeli için Treg hücrelerin selektif zenginleştirilmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir (220). Yetişkin kord ve periferik kanında CD4⁺CD25⁺CD127^{low} hücrelerin yaklaşık %90'ının FoxP3 eksprese ettiği, bu yeni sayılabilecek işaretleyici kullanılarak Treg hücreleri tanımlanabileceği gösterilmiştir (218,219). Bu nedenlerle, çalışmamızda düzenleyici T hücreleri belirlemek için CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺, CD4⁺CD25^{high}CD152⁺ ve CD4⁺CD25⁺CD127^{low} pozitifliği ayrı ayrı değerlendirilmiştir. CD4⁺CD25^{high} hücrelerin %90 üzerinde bir oranla CD152 pozitifliğiyle, CD4⁺CD25^{high} hücrelerin yaklaşık %85'inin aynı zamanda CD127^{low} pozitifliğiyle Treg hücre belirlenmesinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Hepatit B hasta grupları için baktığımızda hücreler ayrı ayrı CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺, CD4⁺CD25^{high}CD152⁺ ve CD4⁺CD25⁺CD127^{low} ile değerlendirildiğinde daha iyi korelasyon gösteren farklı bir parametre görülmemiştir ve CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ hücreler ile parametrelerin diğer yüzey belirteçlerine göre zayıf korelasyon gösterdiği izlenmiştir. Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde Treg hücrelerin CD4⁺CD25^{high}/FoxP3⁺/CD152⁺ ve CD127^{low} belirteçleri ile birlikte değerlendirilmesinin daha uygun olduğu kanaatindeyiz.

Anti-inflamatuar sitokin IL-10 NF-kB'yi down-regüle ederek monosit aktivasyonunu ve pro-inflamatuar sitokin üretimini inhibe eder. IL-10 üreten Foxp3⁺ Treg hücrelerinin mukozal yüzeylerle ilişkili lenfoid dokularda kümelendikleri ve bu yüzden de özellikle mukozal otoimmüitenin baskılanmasında rol aldıkları, sistemik immünpatolojilerde etkin olmadıkları yönünde çalışmalar mevcuttur (221). Ancak, Berry PA ve ark. (222)'nin yaptığı çalışmada, IL-10 düzeyinin artışıyla immün yetmezlik ve akut karaciğer yetmezliğine ilerleme görüldüğü ve yüksek IL-10 seviyelerinin akut hepatitte kötü prognozla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür. Başka bir çalışmada, IL-10 gen polimorfizmi olan hepatit B hastalarında, daha düşük kapasitede IL-10 üretimine bağlı, asemptomatik taşıyıcılığın kronik progresif karaciğer hastalığı gelişiminden belirgin oranda daha yüksek görüldüğü rapor edilmiştir (223). Akut hepatitte ve alevlenmede IL-10 seviyeleri yükselerek karaciğeri immün hasardan korurken muhtemelen viral persistansa neden olmaktadır, diğer taraftan kronik hepatitin geç fazında azalarak, ancak devam eden immünolojik aktiviteye bağlı olarak sağlıklı kontrollere oranla yine de daha yüksek seviyede kalarak, immün regülasyonun yeniden oluşumunu sağlamaktadır. Çalışmamızda akut evredeki hepatit B hastalarının IL-10 seviyelerinin (39.06 pg/ml, p=0.005), hem sağlıklı kontrollerden (11.70 pg/ml) hem de KHB hastalarından (sırasıyla; inaktif taşıyıcı, immüntolerans evresi ve HBeAg negatif KHB hastaları, 29.2 pg/ml, 29.2 pg/ml, 28.85 pg/ml, $p < 0.05$) daha yüksek seviyede bulunmasının bu mekanizmaya bağlı olduğu düşüncesindeyiz. Anna Parfieniuk-Kowerda ve ark. (224)'nin yaptığı derlemede, sağlıklı kişilerde IL-10'un baskın olarak monositlerden salınırken persistent viral enfeksiyonlarda ve KHB hastalarında asıl kaynağın Breg ve Treg hücreler olduğu, IL-10 düzeyinin HBsAg ile birlikte ölçümünün asemptomatik hepatit B taşıyıcılarını, fluktuan (dinamik) hepatit B hastalarından ayırımında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda, immüntolerans dönemindeki ve HBeAg-negatif KHB hastaların serum IL-10 düzeyleri, inaktif taşıyıcıların düzeyinden anlamlı ölçüde yüksek bulunmuş ve bu bulgularla, literatürle de uyumlu olarak, HBeAg-negatif KHB hastalarının prognozlarının daha kötü olacağı düşünülmüştür. Zhi-Jun Su ve ark. (170)'nin 2013 yılında KHB hastalarında yaptığı diğer bir çalışmada, IL-10 düzeylerinin sağlıklı kontrollerde (28.34), ağır (51.47) ve hafif (48.84) KHB hastalarından düşük olduğu görülmüştür. Bu çalışmada

ayrıca karaciğer inflamasyonunun, ALT ve Tbil düzeylerinin Treg hücre, TGF- β ve IL-10 düzeyleri ile ilişkiliyken Th17 ile ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu bulgular çalışma sonuçlarımızla paralellik gösterirken, Zhi-Jun Su ve ark.'nın çalışmasında KHB gruplarının tedavi almış hastaları da içeren heterojen bir popülasyondan oluşması sonuçların karşılaştırmasını güçleştirmiştir (170).

Artmış periferik kan Treg düzeylerinin, HBV spesifik Th₁₇ yanıtı geliştirilmesini önleyerek, hastalığın karaciğer yetmezliğine progresyonuna ilişkin yol gösterici bir belirteç olarak kullanılabilmesinin yanı sıra immünbalansı yeniden oluşturarak KHB'de karaciğer doku hasarını önlemede kullanılabilmesi yönünden de bulgular mevcuttur (225). Treg hücre düşüşünün tetanus toksin cevabını etkilememesi CD4⁺CD25⁺ Treglerin immünsupresyon fonksiyonunun HBV spesifik olduğunu göstermiş (226,227), diğer taraftan insan ve hayvan kanser modellerinde yapılan çalışmalar, bu hücrelerin tümör progresyonunu arttırdığını doğrulamıştır (228,229). Treg hücrelerin akut fazda azaltılmasının enfeksiyonun temizlenmesine teröpatik etkisi olabilir ya da aşının etkinliğini arttırabilir (230). HBV'nin immün sistem üzerinde yapmış olduğu değişikliklerin ve Treg hücrelerinin incelenmesiyle hastalığın tanı, takip ve tedavisinde yardımcı olabilecek yeni açılımların gündeme gelmesini sağlanabilir.

6. ÖZET

Hepatit B, tedavi stratejilerinde büyük gelişmeler kaydedilmesine rağmen, halen dünya çapında önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır. HBV'nin karaciğer hücresine girmesi, replikasyona başlaması ve antijen salınımıyla eş zamanlı olarak regülatör T (Treg), T helper 17 (Th₁₇), T helper 1 (Th₁) ve T helper 2 (Th₂) hücreleri dahil olmak üzere birçok zıt etkili hücrenin rol aldığı immün yanıt indüklenir. Bir yandan karaciğeri immünopatolojik hasardan korurken bir yandan da viral persistansa, siroz, hepatoselüler karsinom (HSK) ve otoimmünite gelişimine sebep olabilen Treg hücre mekanizmaları henüz net değildir ve bu alandaki çalışmalar yetersizdir. Regülatör T hücrelerinin temel fonksiyonu enfeksiyona karşı uygun bağışıklık yanıtının geliştirilmesi, bağışıklık yanıtının gerekmediği zaman da baskılanmasını sağlamaktır. Regülatör T hücreleri efektör T hücrelerini, salgıladıkları TGF- β ve IL-10 sitokinleri vasıtasıyla veya efektör T hücrelerine doğrudan bağlanarak kontakt bağımlı olarak baskılayabilirler.

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Poliklinik/Servisi'ne başvuran ve uluslararası kriterlere göre HBV tanısı alan 61 hasta ile 30 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 91 gönüllüden alınan periferik kan numunelerinde flowsitometri yöntemiyle (Beckman Coulter, ABD) Treg hücre dağılımları araştırıldı. Bu immün modülatör hücreler tarafından salınan IL-10 sitokin düzeyi ise kantitatif ELISA yöntemiyle çalışıldı.

Bu çalışmada, HBV spesifik T hücre yanıtını baskılayarak doku hasarını ve inflamasyonunu azaltan Treg hücrelerin ve sekrete ettikleri sitokin düzeylerinin birlikte değerlendirilmesinin; hastalığın seyrini ve tedaviye yanıtı gösterebilecek kullanışlı bir belirteç olup olamayacağını belirlemek, ayrıca geliştirilebilecek Treg hücreyi hedef alan tedavi stratejilerine yönelik ileri araştırmalara ışık tutmak amaçlanmıştır.

Treg düzeylerinin kronik hepatit B hastalarında kontrol grubuna göre yüksek olmasının yanında hastalığın evresi, tanısı ve takibinde kullanılan parametrelerle de ilişkili bulunmuştur. IL-10 düzeyleri, her ne kadar bu sitokin için Treg hücreleri tek kaynak olmasa da HBV'ye karşı immünolojik süreçlerde Treg hücre ile paralel olarak HBV DNA yükü, HBsAg düzeyi ve hastalığın ciddiyetini gösteren

belirteçlerle korelasyon göstermektedir. Bu sonuçlar, bize Treg hücrelerinin ve ilişkili sitokinlerin Hepatit B immünolojisinde önemli rolü olduğunu bu sebeple hastalığın tanı, takip ve yeni tedavi stratejilerinde kullanılmak üzere umut vaat ettiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: HBV, immün modölatör, Treg hücre, sitokin, flowsitometri, ELISA



SUMMARY

Investigation of Regulatory T Cells and Secreted Immunomodulatory Cytokine Levels in Patients with Hepatitis B

Even great progress has been made in treatment strategies, HBV infection is still among the most important public health problem, worldwide. Entering of HBV into the liver cells, initiation of self replication and antigen release, simultaneously many antagonist immun responses are induced by the cells including T regulatory, T helper 17 (Th₁₇), T helper 1 (Th₁) and T helper 2 (Th₂) cells. Results such as hepatitis persistence, cirrhosis, hepatocellular carcinoma (HCC) and autoimmunity occurrence are influenced by the deterioration of the balance between virus and human liver cells/ host immune system. Tregs protect cells from immunopathologic damage of immune response in the other hand cause maintaining of viral persistence, but mechanisms are not clear, yet and the studies are insufficient. Main functions of T regulatory cells are developing appropriate immune response against to infection and suppressing when the immune response isn't necessary, anymore. Regulatory T cells (Treg) suppress the effector T cells via secreting immune system supressor cytokines such as TGF- β and IL-10 or directly inhibit effector T cells by contact connecting way.

Ninety-one volunteers including 61 patients with diagnoses of HBV hepatitis according to international criteria and 30 healthy controls had been chosen from applicants of Medical Faculty of Izmir Katip Çelebi University Atatürk Training and Research Hospital Infectious Diseases Outpatient/Clinic Service. Peripheral blood samples were measured by flow cytometer method (Beckman Coulter, USA) for analysis of Treg cell distribution and were studied by quantitative ELISA for the cytokine IL-10 secreting by the immunmodulator cells.

In this study, we want to determine whether evaluation of Treg cells which reduces the tissue damage and inflammation by suppressing the response of HBV specific T cells and secreted cytokine levels are useful marker that may indicate the disease survey and response to the treatment. It is also aimed to shed light on further research on treatment strategies targeting Treg cells that may be developed.

Treg levels in patients with chronic hepatitis B were higher than those in the control group, also related to the stage, the parameters used in follow-up and diagnosis of the disease. In parallel with Treg cells, during immunological processes against HBV. IL-10 levels were correlated with HBV DNA load, HBsAg level and the markers of disease severity, although Treg cells are not the only source for this cytokine. These results demonstrate that Treg cells and related cytokines play an important role in hepatitis B immunology and therefore offer promise for using in the diagnosis, follow-up and the new treatment strategies of the disease.

Keywords: HBV, immunomodulator, Treg cell, cytokine, flowcytometer, ELISA.



7. KAYNAKLAR

1. Lavanchy, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J. Viral Hepat.* 2004;11: 97–107.
2. Rehermann, B., and M. Nascimbeni. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol* 2005;5:215–229.
3. Gerlich WH. Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now. *Virol J* 2013;10:239.
4. Shadlar S, Hildt E. HBV life cycle: Entry and Morphogenesis. *Viruses* 2009;1:185-209.
5. Zhang X, Hou J, Lu M. Regulation of Hepatitis B virus replication by epigenetic mechanisms and microRNAs. *Front Genet* 2013;14(4):202
6. Robinson BJ, Pierson SLL. Clinical Virology. Chapter 29;p:732 In Mahon CR, Lehman DC, Manuseelis G. *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 4th Ed, 2011, Saunders, China.
7. Ay P, Torunoglu MA, Com S, Cipil Z, Mollahaliloglu S, Erkoç Y, Dilman Y. Trends of hepatitis B notification rates in Turkey, 1990 to 2012. *Euro Surveill* 2013;18(47) pii:20636
8. Block TM, Guo H, Guo JT. Molecular virology hepatitis B virus for clinicians. *Clin Liver Dis* 2007;11(4):685-706
9. Uhl P, Fricker G, Habercorn U, Mier W. Current status in the therapy of liver disease. *Int J Mol Sci* 2014;15:7500-7512.
10. Bertoletti A. Gehring AJ. Immune therapeutic strategies in chronic hepatitis B Virus infection: virus or inflammation control? *PLoS Pathog* 2013;9(12):e1003784
11. Liang TJ. Hepatitis B: The Virus and Disease. *Hepatology* 2009;49(5):S13-S21
12. Zhang Q, Cao G. Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon* 2011;11(2):86-91
13. Grimm D, Thimme R, Blum HE. HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatol Int* 2011;5:644-653
14. Tanwars S, Dusheiko G. Is there any value to hepatitis B virus genotype analysis? *Curr Gastroenterol Rep* 2012;14(1):37-46
15. Doo EC, Ghany M Hepatitis B virology for clinicians. *Clin Liver Dis* 2010;14:397-408
16. Baumert TF, Meredith L, Ni Y, Felmlee DJ, McKeating JA, Urban S. Entry of hepatitis B and C viruses-recent progress and future impact. *Curr Opin Virol* 2014;4:58-65
17. Block TM, Guo H, Guo JT. Molecular virology hepatitis B virus for clinicians. *Clin Liver Dis* 2007;11(4):685-706
18. Kann M. Structural and Molecular Virology. Chapter 2.P2.2. In: Lai CL, Locarnini S. Ed. *Hepatitis B Virus*. 2nd Ed. International Medical Press. 2008. London
19. Ezzikouri S, Ozawa M, Kohara M, Elmdaghri N, Benjelloun S, Tsukiyama-Kohara K. Recent insights into hepatitis B virus-host interactions. *J Med Virol* 2014;86:925-932
20. Tseng TC, Kao JH. Clinical utility of quantitative HBsAg in natural history and nucleos(t)ide analogue treatment of chronic hepatitis B: new trick of old dog. *J Gastroenterol* 2013;48:13-21

21. Urban S, Schulze A, Dandri M, Peterson J. The replication cycle of hepatitis B virus. *J Hepatol* 2010;52:282-284
22. Glebe D. Recent advances in hepatitis B virus research: A German point of view. *World J Gastroenterol* 2007;13(1):8-13
23. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007;13(1):48-64
24. Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus. *Seminars in Liver Dis* 2004;24:3-10
25. Coleman, P. F. Detecting hepatitis B surface antigen mutants. *Emerging infectious diseases* 2006;12(2), 198.
26. Hollinger, F. B. Hepatitis B virus genetic diversity and its impact on diagnostic assays. *Journal of viral hepatitis* 2007; 14(s1), 11-15.
27. Gerlich, W. H. Breakthrough of hepatitis B virus escape mutants after vaccination and virus reactivation. *Journal of clinical virology* 2006;36, S18-22.
28. Echevarria, J. M., & Avellon, A. Improved detection of natural hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) mutants by a new version of the VITROS HBsAg assay. *Journal of medical virology* 2008;80(4), 598-602.
29. Song, B. C., Kim, S. H., Kim, H., Ying, Y. H., Kim, H. J., Kim, Y. J., et al. Prevalence of naturally occurring surface antigen variants of hepatitis B virus in Korean patients infected chronically. *Journal of medical virology* 2005; 76(2), 194-202.
30. Mu, S. C., Lin, Y. M., Jow, G. M., & Chen, B. F. Occult hepatitis B virus infection in hepatitis B infection vaccinated children in Taiwan. *Journal of hepatology* 2009;50(2), 264-272.
31. Chen, C. H., Hung, C. H., Lee, C. M., Hu, T. H., Wang, J. C., et al. Pre-S deletion and complex mutations of hepatitis B virus related to advanced liver disease in HBe Ag- negative patients. *Gastroenterology* 2007; 133(5), 1466-1474.
32. Chen, B. F., Liu, C. J., Jow, G. M., Chen, P. J., Kao, J. H., & Chen, D. S. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology* 2006;130(4), 1153-1168.
33. Harrison, T. J. (2006, May). Hepatitis B virus: molecular virology and common mutants. In *seminars in liver disease* (Vol. 26, No. 02, pp. 087-096). Copyright 2006 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.
34. Torresi, J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *Journal of clinical virology* 2002;25(2), 97-106.
35. Kay, A., & Zoulim, F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus research* 2007;127(2), 164-176.
36. Yang, H. I., Lu, S. N., Liaw, Y. F., You, S. L., Sun, C. A., Wang, L. Y., et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine* 2002;347(3), 168-174.
37. Horvat RT, Tegtmeyer GE, Çeviri: İyigün CP, Avcı İY. Hepatit B ve D virüsleri. *Klinik Mikrobiyoloji (Manuel of Clinical Microbiology)* 9. Baskı, ASM Press, Washington, USA, Atlas Kitapçılık 2009, Ankara, Türkiye, Editör; Murray P, Çeviri Editörü; Başustaoglu A.
38. Hadziyannis E. Quantification of HBsAg in serum: characteristic of the assays. *OA Hepatology*. 2013 Apr 01; 1(1):1.

39. Badur S. Viral Hepatitler (HAV, HBV, HDV). In Ustaçelebi S, Abacıoğlu H, Badur S. Moleküler, klinik ve tanısal viroloji. Güneş Kitabevi 2004: 175-222.
40. Altındış M, Yoldaş Ö. Viral hepatitlerin tanısında serolojik ve moleküler testler. In Tabak F, Tosun S. Viral Hepatit 2013. Birinci baskı. İstanbul Viral Hepatitle Savaşım Derneği. 2013:161-180.
41. Sayiner AA, Agca H, Sengonul A, Celik A, Akarsu M. A new hepatitis B virus vaccine escape mutation in a renal transplant recipient. *J Clin Virol* 2007;38:157-160.
42. Tuaille E, Mondain AM, Nagot N, Ottomani L, Kania D, Nogue E, Rubbo PA, Pageaux GP, Van de Perre P, Ducos J. Comparison of Serum HBsAg quantitation by four immunoassays, and relationship of HBsAg Level with HBV replication and HBV genotypes. *PLoS ONE* 2012;3:e32143.
43. Burdinoa E, Ruggiero T, Proietta A, Milia MG, Olivero A, Cavigliab GP, Marietta M, Rizzetto M, Smedileb A, Ghisetta V. Quantification of hepatitis B surface antigen with the novel DiaSorinLIAISON XL Murex HBsAg Quant: Correlation with the ARCHITECT quantitative assay. *J Clin Virol* 2014;60:341-346.
44. Us AD. Temel İmmünoloji ve Seroloji. Yenimahalle, Ankara, 2016. Bölüm 8: 235-239.
45. Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich S, Gunther G, Hess G, Hudig H, Kitchen A, Morgolis H, Michel G, Trepo C, Will H, Zanetti A, Mushahwar I. Serological pattern 'anti-HBc alone': report on a workshop. *J Med Virol* 2000;62:450-455.
46. McMoham BJ. Hepatitis B surface antigen (HBsAg): a 40-year-old hepatitis B virus seromarker gets new life. *Gastroenterology* 2010;139:380-2.
47. Chevaliez S. Is HBsAg quantification ready, for prime time? *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013;37:559-63.
48. Chan HLY, Thompson A, Martinot-Peignoux M, et al. Hepatitis B surface antigen quantification: Why and how to use it in 2011- A core group report. *J Hepatol* 2011;55:1121-31.
49. Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, et al. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology* 2010;139:483-90
50. Lau G, Marcellin P, Brunetto M. On treatment monitoring of HBsAg levels to predict response to peginterferon alfa-2a in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009;50:S333.
51. Sonneveld MJ, Rijckborst V, Boucher CA, Hansen BE, Janssen HL. Prediction of sustained response to peginterferon alfa-2b for hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using on-treatment hepatitis B surface antigen decline. *Hepatology* 2010;52:1251-57.
52. Piratvisuth T, Marcellin P. Further analysis is required to identify an early stopping rule for peginterferon therapy that is valid for all HBeAg-positive patients. *Hepatology* 2011;53:1054-55.
53. Marcellin P, Piratvisuth T, Brunetto M, et al. On-treatment decline in serum HBsAg levels predicts sustained immune control 1 year posttreatment, subsequent HBsAg clearance in HBeAg-negative hepatitis B virus infected patients treated with peginterferon alfa-2a. *Hepatol Int* 2010;4:151.
54. Heathcote EJ, Marcellin P, Buti M, et al. Three year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2011;140:132-43.
55. Cai W, Xie Q, An B, et al. On treatment serum HBsAg level is predictive of sustained off-treatment virologic response to telbivudine in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients. *J Clin Virol* 2010;48:22-6.
56. Thibault V, Laperche S, Thiers V et al. Molecular epidemiology and clinical characteristics of hepatitis B identified through the French mandatory notification system. *PLoS One* 2013;8:e75267.

57. Gerlich WH, Uy A, Lambrecht F, Thomssen R. Cutoff levels of immunoglobulin M antibody against viral core antigen for differentiation of acute, chronic, and past hepatitis B virus infections. *J Clin Microbiol* 1986;24:288-93.
58. Terkmani H, Visseaux B, Ratzu V, Poynard T, Thibault V. Anti HBc antibody avidity determination allows rapid discrimination between acute hepatitis B and hepatitis B reactivation. *Hepatology* 2005;42:717A.
59. Buster EH, Flink HJ, Simsek H et al. Early HBeAg loss during peginterferon alpha-2b therapy predicts HBsAg loss: results of a long-term follow-up study in chronic hepatitis B patients. *Am J Gastroenterol* 2009; 104:24449-57.
60. Ma H, Yang RF, Wei L. Quantitative serum HBsAg and HBeAg are strong predictors of sustained HBeAg seroconversion to pegylated interferon alfa-2b in HBeAg-positive patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:1498-506.
61. Kwon JH, Jang JW, Lee S, Lee J, Chung KW, Lee YS, Choi JY. Pretreatment HBeAg level and an early decrease in HBeAg level predict virologic response to entecavir treatment for HBeAg- positive chronic Hepatitis B. *J Viral Hepat* 2012;19:e41-7.
62. Öztürk R. Viral Hepatitlerde Olağan Dışı Serolojik ve Moleküler Tanı Göstergesi Kalıpları. Ed. Tabak F, Balık I Tekeli E. *Viral Hepatit Kitabı 2005*, Viral Hepatitle Savaşım Derneği. İstanbul 2005, s152-158.
63. Badur S. Hepatit A, B ve D virüsleri. Ed. Us D, Ergünay K, 2012:295-391. *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Bilimsel Tıp Yayınevi*, 2012;295-335.
64. Roberio A, Ponde A. Atypical serological profiles in hepatitis B virus infection. *Eur J. Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32:461-476.
65. Ertekin V, Selimoğlu AM, Alp H. Erzurum'da 6-17 Yaş Grubu Çocuklarda HBV Enfeksiyonu Prevelansı Çalışması Sırasında Saptanan Atipik Serolojik Profiller. *Viral Hepatit Dergisi* 2003; 8(1):60-63.
66. Güdücüoğlu H ve ark. Değişik serolojik belirleyicilere sahip hastalarda HBV-DNA'nın değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Dergisi* 2005; 10(3): 158-163.
67. Özsan M. HBV Enfeksiyonlarında Mikrobiyolojik Tanı. Ed. Tabak Fehmi, Balık I, Tekeli E. *Viral Hepatit Kitabı 2007*, Viral Hepatitle Savaşım Derneği. İstanbul 2007, s124-134.
68. Özacar T, Zeytinoğlu A, Erensoy S, Yapar N, Hoşgör M, Bilgiç A. Hepatit B virus serolojisinde salt anti-HBc olumluluğu ve HBV aşısına yanıt. *Viral Hepatit Dergisi* 1995;2:69-71.
69. Özdemir D, Yılmaz Z, Şencan I, Yıldırım M, Küçükbayrak A. İzole Anti- HBc Pozitifliği Saptanan hastaların Hepatit B Aşısına Karşı İmmün Yanıtlarının Değerlendirilmesi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2008;1:28-31.
70. Jasmine Samal, Manish Kandpal, and Perumal Vivekanandan. Molecular Mechanisms Underlying Occult Hepatitis B Virus Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2012; 25(1):142-163.
71. Ponde RA, Cardoso DD, Ferro MO. The underlying mechanisms for the 'anti- HBc alone' serological profile. *Arch Virol.* 2010 Feb;155(2):149-58.
72. Kramvis A, Kew MC. The core promoter of hepatitis B virus.1999, *J Viral Hepat* 6(6):415-427.
73. Afyon M, Avcı İY, Ülçay A, Diktaş H. Occult Hepatit B Virüs Enfeksiyonu. *J Clin Anal Med* 2013;4(5):435-439.
74. Altındış M, Usulan İ, Çetinkaya Z, Yüksel Ş, Çiftçi İH, Demirtürk N ve ark. Hemo-diyaliz Hastalarının Gizli Hepatit B Varlığı Yönünden Araştırılması. *Mikrobiyol Bült* 2007;41(2):227-33.

75. Gerner-Smidt p, Hyytia-Trees E, Rota AP. Molecular Epidemiology. In: J Versalovic, K. C. Carroll, J.H. Jorgensen, G. Funke, M.L. Landry and D.W. Warnock (eds. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington D.C: ASM pres, 2011:100-123.
76. Ergünay K. Virolojide Moleküler Tanı Yöntemleri. 1. Ulusal Viroloji Kongresi, Konferanslar ve Bildiriler Kitabı, 2003:212-222.
77. Oltu B. Salgında moleküler mikrobiyolojik yöntemlerin kullanımı. Hastane Enfeksiyonları Dergisi. Hastane Enfeksiyonları Eğitim Programı, 2013.
78. Guirgis BS, Abba RO, Azzazy HM. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. Int J Infect Dis. 2010 Nov;14(1):e914-53.
79. Advances in Molecular Diagnosis of HBV Infection and Drug Resistance Erwin Sablon, Fred Shapiro Int J Med Sci. 2005;2(1):8-16.
80. Hong SP, Kim NK, Hwang SG, Chung HJ, Kim S, Han JH, Kim HT, Rim KS, Kang MS, Yoo W, Kim SO. Detection of hepatitis B virus YMDDvariants using mass spectrometric analysis of oligonucleotide fragments. J Hepatol. 2004 May;40(5):837-44.
81. Horvat RT, Tegtmeier GE, Çeviri: İyigün CP, Avcı İY. Hepatit B ve D virüsleri. Klinik Mikrobiyoloji (Manuel of Clinical Microbyology) 9. Baskı, ASM Press, Washington, USA, Atlas Kitapçılık 2009, Ankara, Türkiye, Editör; Murray P, Çeviri Editörü; Başustaoğlu A.
82. Ocana S, Casas ML, Buhigas I, Liedo JL. Diagnostic strategy for occult Hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol 2011; 17: 1553-7.
83. European Association for Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. Journal of Hepatology 2012 vol.57:167-185.
84. Lok AS, McMohan BJ. AASLD Practice Gudelines: Chronic hepatitis B: update 2009. Hepatology 2009;50:1-36.
85. Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection and long-term outcome under treatment. Liver International 2009;29:100-107.
86. Chu CM, Karayiannis P, Fowler MJ, et al. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan: studies of hepatis B virus DNA in serum. Hepatology 1985;5:431-4.
87. Tassopoulos NC, Papaevangelou GJ, Sjögren MH, et al. Natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in Greek adults. Gastroenterology 1987;92:1844-50.
88. Hoofnagle JH, Shafritz DA, Popper H. Chronic type B hepatitis and the 'healthy' HBsAg carrier state. Hepatology 1987;7:758-63.
89. Sharma SK, Saini N, Chwla Y. Hepatitis B Virus: Inactive carriers. Virol J 2005;25:555-563.
90. Cırık AA. Larenks yassı epitel hücreli kanserin T regülatör (CD4+CD25+Foxp3highCD127dim) ve immünsistem diğer alt grup hücrelerine etkisi. Tıp, uzmanlık tezi. İstanbul: Sağlık Bakanlığı Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kulak Burun Boğaz Kliniği;2009.
91. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. Immunity 2009;30, 636-645.
92. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, Rudensky AY. CD4+ Regulatory T Cells Control TH17 Responses in a Stat3-Dependent Manner. Science 2009;326, 986-991.

93. Zhi-Jun Su, Xue-Ping Yu, Ru-Yi Guo, De-Song Ming, Lv-Ye Huang, Mi-Long Su, et al. Changes in the balance between Treg and Th17 cells in the patient with chronic hepatitis B. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013;76:437-444.
94. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001; 27:20–21.
95. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001; 27:68–73. [PubMed:11138001]
96. Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature.* 2007; 445:766–770. [PubMed: 17220876]
97. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martinez-Llordella M, Ashby M, Nakayama M, Rosenthal W, Bluestone JA. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol.* 2009; 10:1000–1007. [PubMed:19633673]
98. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 2000;12:431–440. [PubMed: 10795741]
99. Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ, Brightling CE, Soler D, Shen Z, Boisvert J, Greenberg HB, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Butcher EC, Wu L. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol.* 2001; 166:877–884. [PubMed: 11145663]
100. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999; 401:708–712. [PubMed:10537110]
101. Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowicz M, Fontenot JD, Rudensky AY, Campbell DJ. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med.* 2007; 204:1335–1347. [PubMed: 7548521]
102. Tadokoro CE, Shakh G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ, Dustin ML. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 2006; 203:505–511. [PubMed: 16533880]
103. Tang Q, Adams JY, Tooley AJ, Bi M, Fife BT, Serra P, Santamaria P, Locksley RM, Krummel MF, Bluestone JA. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol.* 2006; 7:83–92. [PubMed: 16311599]
104. Vinuesa, C. G., Sanz, I. and Cook, M. C. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2009;9:845.
105. Baecher-Allan, C., V. Viglietta, and D. A. Hafler. Human CD4₊CD25₊ regulatory T cells. *Semin. Immunol* 2004;6: 89–98.
106. David A, Horwitz, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+) CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Immunol* 2008; 29: 429-35.
107. Kim, JM. Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007; 8: 91–7.

108. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic selftolerance and negative control of immune responses. *Ann Rev Immunol* 2004; 22: 531–62
109. Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006; 212: 60-73.
110. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 253–7.
111. Zheng SG, Wang JH, Stohl W, Kim KS, Gray JD, Horwitz DA. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4⁺CD25⁺ regulatory cells. *J Immunol* 2006; 176: 3321-9.
112. Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* 2005; 6: 152-62.
113. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000; 12: 431-40.
114. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005; 6: 1219-27.
115. Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-Jordan H, Bi M, Bluestone JA. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*. 2004; 34(11): 2996-3005.
116. Miyara M, Sakaguchi S. Regulatory T cells and the Control of Auto-Immunity: From day 3 Thymectomy to FoxP3⁺ Regulatory T Cells. In: Jiang S, ed. *Regulatory T Cells and Clinical Application*. New York: Springer-Verlag, 2008; 3-7.
117. Kishimoto T. Interleukin-6 and its receptor in autoimmunity. *J Autoimmun* 1992; 5: 123–32.
118. Horwitz DA, Gray JD. The interaction of T cells with cells of the innate immune system and B cells in the pathogenesis of SLE. In: Wallace DJ and Hahn BH. Eds. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007; 133–60.
119. Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ, Dustin ML. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2006; 203: 505-11
120. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1538-43.
121. Mahnke K, Ring S, Johnson TS, Schallenberg S, Schönfeld K, Storn V, Bedke T, Enk AH. Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2117-26.
122. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genomewide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 2007; 445: 936-40.
123. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010; 11: 7-13.
124. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996; 184: 387-96.

125. Laurie KL, Van Driel IR, Gleeson PA. The role of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells in the induction of autoimmune gastritis. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 567-73.
126. Baecher-Allan C, Hafler DA. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; 212: 203-16.
127. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 523-32.
128. Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immunosuppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol* 2011; 23: 424-305.
129. Kemp EH, Waterman EA, Weetman AP. Immunological pathomechanisms in vitiligo. *Expert Rev Mol Med* 2001; 3: 1-22.
130. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000; 192: 295-302.
131. Takahashi T, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000; 192: 303-10.
132. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008; 271-5.
133. Betini M, Vignali DAA. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 612-8.
134. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992; 359: 693-9.
135. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S: Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 770-4.
136. Agarwal S, Ramam M, Sharma VK, Khandpur S, Pal H, Pandey RM. A randomized placebo-controlled double-blind study of levamisole in the treatment of limited and slowly spreading vitiligo. *Br J Dermatol* 2005; 153: 163-6.
137. Soheil Tavakolpour, Seyed Moayed Alavian, Shahnaz Sali. Manipulation of Regulatory Cells' Responses to Treatments for Chronic Hepatitis B Virus. *Hepat Mon* 2016(5);e37927.
138. Wilke CM, Wei S, Wang L, Kryczek I, Kao J, Zou W. Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon- γ . *Cancer Immunother* 2011; 60: 1529-41.
139. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Ann Rev Immunol* 2001; 19: 683-765.
140. Said JW. Immunodeficiency-related Hodgkin lymphoma and its mimics. *Adv Anat Pathol* 2007; 14: 189-94.
141. Linterman, M. A., Pierson, W., Lee, S. K. et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* 2011;17:975.
142. Levy, Y. and Brouet, J. C. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J. Clin. Invest.* 1994;93:424.

143. Banchereau, J., Pascual, V. and O'Garra, A. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* 2012;13:925.
144. Cai, G., Nie, X., Zhang, W. et al. A regulatory role for IL-10 receptor signaling in development and B cell help of T follicular helper cells in mice. *J. Immunol.* 2012;189:1294.
145. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Van der Lelie H, Bron D, et al. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy sensitive non Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1995; 333(23): 1540-5.
146. Zu X, Zhang Q, Cao R, Liu J, Zhong J, Wen G, Cao D. Transforming growth factor- β signaling in tumor initiation, progression and therapy in breast cancer: an update. *Cell Tissue Res* 2011, Aug 16 (e-baskı). Erişim Tarihi: 14.09.2011.
147. Zheng SG. The Critical Role of TGF-beta1 in the Development of Induced Foxp3+ Regulatory T Cells. *Int J Clin Exp Med* 2008; 1: 192-202.
148. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factorbeta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 2007; 26: 579-91
149. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA: The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; 450: 566-9.
150. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol.* 2002;23, 313-320.
151. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 32-46.
152. Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev* 2007; 6(3): 169-75.
153. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006; 24: 677-88.
154. Adams DH, Eksteen B. Aberrant homing of mucosal T cells and extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2006;6:244–251.
155. Oo YH, Weston CJ, Lalor PF, Curbishley SM, Withers DR, Reynolds GM, et al. Distinct roles for CCR4 and CXCR3 in the recruitment and positioning of regulatory T cells in the inflamed human liver. *J Immunol* 2010;184:2886–2898.
156. Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:320–329.
157. Xu D, Fu J, Jin L, et al. Circulating and liver resident CD4+ cd25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J immunol.* 2006; 177(1):739-747.
158. Kawai T, Akira S: Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J Biochem* 2007, 141(2):137–145.
159. Barton GM: Viral recognition by Toll-like receptors. *Semin Immunol* 2007, 19(1):33–40.

160. Wu J, Lu M, Meng Z, Trippler M, Broering R, Szczeponek A, Krux F, Dittmer U, Roggendorf M, Gerken G, Schlaak JF: Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice. *Hepatology* 2007, 46(6):1769–1778.
161. Wu J, Meng Z, Jiang M, Pei R, Trippler M, Broering R, Bucchi A, Sowa JP, Dittmer U, Yang D, Roggendorf M, Gerken G, Lu M, Schlaak JF: Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 2009, 49(4):1132–1140.
162. Xiaojing Wang, Qin Ning. Review article: immune mediated liver failure innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection. *EXCLI Journal* 2014;13:1131-1144.
163. Zhang JY, Zhang Z, Lin F, et al. IL-17 producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010; 51:81-91.
164. Stoop JN, Van Der Molen RG, Baan CC, et al. Regulatory T cells contribute to the impaired immun response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2005;41(4):771-778.
165. Accapezzato D, et al. Hepatic expansion of a virus-specific regulator CD8+ T cell population in chronic hepatitis C infection. *J Clin Invest*. 2004;113,963-972.
166. Peppia D, et al. Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic Hepatitis B virus infection. *PLoS Pathog*. 2010;6, e1001227.
167. Das A, et al. IL-10 producing regulatory B cells in in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol*. 2012;189:3925-3935.
168. Tu Z, et al. TLR-dependent cross talk between human Kupffer cells and NK cells. *J Exp Med*. 2008;205, 233-244.
169. Gilliet M, and Liu YJ. Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Hum Immunol*. 2002;63(12):1149-1155.
170. Zhi-Jun Su, Xue-Ping Yu, Ru-Yi Guo, De-Song Ming, Lv-Ye Huang, Mi-Long Su, Yong Deng, Zhen-Zhong Lin. Changes in the balance between Treg and Th17 cells in patients with chronic hepatitis B. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013(76): 437–444.
171. Chisari FV, and Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Ann Rev Immunol*. 1995; 13:29-60.
172. Oldstone MD. Molecular anatomy of viral persistence. *J Virol*. 1991;65:6381-6386.
173. Parker DC. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev. Immunol*. 1993;11:331-360.
174. Milich DR, Mclachlan A. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen. *Science*. 1986;234:1398-1401.
175. Bottcher B, Wynne SA, and Crowther RA. *Nature*. 1997;386:88-91.
176. World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. World Medical Association. *JAMA*. 2013;310(20):2191-2194. doi:10.1001/jama.2013.281053
177. Horvat RT, Tegtmeier GE, Çeviri: İyigün CP, Avcı İY. Hepatit B ve D virüsleri. *Klinik Mikrobiyoloji (Manual of Clinical Microbiology)* 9. Baskı, ASM Press, Washington, USA, Atlas Kitapçılık 2009, Ankara, Türkiye, Editör; Murray P, Çeviri Editörü; Başustaoglu A.

178. Seyed Hossein Aalaei-Andabili, Seyed Moayed Alavian. Regulatory T cells are the most important determinant factor of hepatitis B infection prognosis: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine* 2012(30); 5595– 5602.
179. Soheil Tavakolpour, Seyed Moayed Alavian, and Shahnaz Sali. Manipulation of Regulatory Cells' Responses to Treatments for Chronic Hepatitis B Virus. *Hepat Mon.*2016(4):e37927.
180. Marchant A, Goldman M. Tcell-mediated immune responses in human newborns: ready to learn? *Clin Exp Immunol*, 2005; 141(1):10-18.
181. Gregg. R, C. M. Smith, F. J. Clark, D. Dunnion, N. Khan, R. Chakraverty, L. Nayak, and P. A. Moss. The number of human peripheral blood CD4+D25high regulatory T cells increases with age. *Clin. Exp. Immunol.* 2005;140:540–546.
182. Selçuk Kaya, Güçhan Alanođlu, Mümin Polat, Tansu SipahiSüleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi.nin 2000-2007 yılları tarama test sonuçları.S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 2009;16(2):13-15.
183. Miyara M, Sakaguchi S. Regulatory T cells and the Control of Auto-Immunity: From day 3 Thymectomy to FoxP3+ Regulatory T Cells. In: Jiang S, ed. *Regulatory T Cells and Clinical Application*. New York: Springer-Verlag;2008.
184. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155 (3): 1151-64.
185. West R. Tobacco control: present and future. *Br Med Bull* 2006; 77-78: 123-36.
186. Hanna Grindebacke. Phenotype and function of CD25+ regulatory T cells in infants and adults. Department of Rheumatology and Inflammation Research, Institute of Medicine, The Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Sweden 2010.
187. Peng G,Li S, Wu W, Sun Z, Chen Y, Chen Z. Circulating CD4+ CD25+ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection. *Immunology.*2008;123(1):57–65. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02691.x. [PubMed:17764450].
188. Barboza L, Salmen S, Goncalves L, Colmenares M, Peterson D, Montes H, et al. Antigen-induced regulatory T cells in HBV chronically infected patients. *Virology* 2007;368(November (1)):41–9.
189. MA Hui, ZHANG Heng-hui and WEI Lai. Frequency of T-cell FoxP3+ Treg and CD4+/CD8+ PD-1 expression is related to HBeAg seroconversion in hepatitis B patients on pegylated interferon. *Chinese Medical Journal* 2013;126 (2)
190. Ziegler, S.F. FOXP3: Of Mice and Men. *Annu. Rev. Immunol.*2006; 24:209–226).
191. Barath S, Sipka S, Szodoray P, Szegedi A, Aleksza M, Vegh J, Szegedi Gy, Bodolay E. Circulating regulatory T cells in patients with mixed connective tissue disease(MCTD). *Scand. J. Rheum.* 2006;35:300-304.
192. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettgenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)/CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *JExpMed.* 2001; 193:1285–94.
193. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)/CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *JExpMed.* 2001; 193:1303–10.

194. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance: Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF- β T cell transgenic mice. *J Immunol.* 2007; 178:179–85.
195. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol.* 2007;19, 345-354.
196. Walker M, Kasprowitz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest.* 2003;112: 1437-1443.
197. Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden L, de Vries RR, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Toes RE. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol.* 2005;66: 13-20.
198. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 2007;37:129-138.
199. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:6659-6664.
200. Snow JW, Abraham N, Ma MC, Herndier BG, Pastuszak AW, Goldsmith MA. Loss of tolerance and autoimmunity affecting multiple organs in STAT5A/5B-deficient mice. *J Immunol.* 2003;171:5042-5050.
201. Yao Z, Kanno Y, Kerenyi M, Stephens G, Durant L, Watford WT, Laurence A, Robinson GW, Shevach EM, Moriggl R, Hennighausen L, Wu C, O'Shea JJ. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood.* 2007;109: 4368-4375.
202. Caudy AA, Reddy ST, Chatila T, Atkinson JP, Verbsky JW. CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119, 482-487.
203. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, Brunkow ME. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet.* 2001;27: 18-20.
204. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15:430-435.
205. Murawski MR, Litherland SA, Clare-Salzler MJ, Davoodi-Semiromi A. Upregulation of Foxp3 expression in mouse and human Treg is IL-2/STAT5 dependent: implications for the NOD STAT5B mutation in diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1079: 198-204.
206. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 2000;192: 303-310.
207. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2000;192: 295-302.

208. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochoy G, Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009;30:899-911.
209. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science*. 2008;322:271-275.
210. Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E. et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J. Exp. Med.* 2000;192:1545.
211. Schaerli, P., Willmann, K., Lang, A. B., Lipp, M., Loetscher, P. And Moser, B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J. Exp. Med.* 2000;192:1553.
212. Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P. et al. CTLA-4 control over Foxp3(+) regulatory T cell function. *Science* 2008; 22:271.
213. Bour-Jordan, H., Grogan, J. L., Tang, Q., Auger, J. A., Locksley, R.M. and Bluestone, J. A. CTLA-4 regulates the requirement for cytokine-induced signals in T(H)2 lineage commitment. *Nat.Immunol.* 2003;4:182.
214. Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E. et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science* 1995;270:985.
215. Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A. and Sharpe, A. H. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995; 3:541.
216. Suri-Payer E, Cantor H. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4⁺CD25⁺ T cells. *J Autoimmun.* 2001;16:115-123.
- 217 Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol Rev.* 2001;182:58-67.
218. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med.* 2006; 203: 1701-1711.
219. Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG, Alexander SI, Solomon M, Lee S, Nanan R, Fazekas de Saint Groth B. Persistence of naive CD45RA⁺ regulatory T cells in adult life. *Blood.* 2006;107, 2830-2838.
220. Enarsson K, Lundgren A, Kindlund B, Hermansson M, Roncador G, Banham AH, Lundin BS, Quiding-Jarbrink M. Function and recruitment of mucosal regulatory T cells in human chronic *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma. *Clin Immunol.* 2006; 121: 358-368.
221. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003; 15: 430-435.
222. Antoniadis CG, Berry PA, Wendon JA, Vergani D. The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *J Hepatol* 2008;49:845-61.
223. Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, et al. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2086-2092.

224. Anna Parfieniuk-Kowerda, Jerzy Jaroszewicz, Robert Flisiak. Review article Immune regulation and viral diversity as correlates of natural and treatment induced immune control in persistent hepatitis B virus (HBV) infection. *Clinical and Experimental Hepatology*. 2015; 2: 35–38.
225. Niu Y, Liu H, Yin D, Yi R, Chen T, Xue H, et al. The balance between intrahepatic IL-17(+) T cells and Foxp3(+) regulatory T cells plays an important role in HBV-related endstage liver disease. *BMC Immunol* 2011;12:47.
226. Bauer T, Gunther M, Bienzle U, Neuhaus R, Jilg W. Vaccination against hepatitis B in liver transplant recipients: pilot analysis of cellular immune response shows evidence of HBsAg-specific regulatory T cells. *Liver Transpl* 2007;13(March (3)):434–42.
227. Stoop JN, Woltman AM, Biesta PJ, Kusters JG, Kuipers EJ, Janssen HL, et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits the suppressive effect of regulatory T cells on the hepatitis B virus-specific immune response. *Hepatology* 2007;46(September (3)):699–705.
228. Sakaguchi SN, Sakaguchi J, Shimizu S, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Semin Cancer Biol* 2006;16: 115–23.
229. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002;2: 389–400.
230. Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT. CD4+CD25+T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 2003;198(September (6)):889–901.