

**T.C.**  
**GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ**  
**ANABİLİM DALI**

**KRONİK HEPATİT B ENFEKSİYONUNDA**  
**TNF- $\alpha$  308 PROMOTOR GEN POLİMORFİZMİ**

**Dr. Ayfer ATAY**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. Hüseyin Şener BARUT**

**TOKAT**

**2014**

## TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince yakın çalışma olanağı bulduğum, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen başta Gaziosmanpaşa Üniversitesi Enfeksiyon hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Başkanımız ve değerli fikirleri ile tez çalışmama yön veren tez hocam sayın Doç.Dr.Hüseyin Şener BARUT'a, Doç.Dr.Özgür GÜNAL'a, Doç.Dr.Fazilet DUYGU'ya, tezimin genetik çalışmalarını yürüten Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Aydın RÜSTEMOĞLU'na, tezimin istatistiklerini gerçekleştiren Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Emre KUYUCU'ya, çalışma arkadaşım Dr.Feyza AYTEKİN' e, birlikte çalıştığım tüm öğretim üyelerine, asistan arkadaşlarıma ve asistanlık hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen aileme ve oğlum Kerem Mert Göral'a teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Amaç:** Tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) HBV'ye karşı konağın bağışıklık yanıtında önemli bir rol oynamaktadır ve sitokin üretim kapasitesi, genetik faktörlere bağlıdır. Bu çalışma, TNF- $\alpha$  308 gen promotor polimorfizminin Hepatit B virüsüyle (HBV) karşılaşma sonrası enfeksiyonun iyileşmesinin hem kronik HBV enfeksiyonlularda prognozla ilişkisinin olup olmadığını belirlemek için yapılmıştır.

**Materyal ve Metod:** Gaziosmanpaşa Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğine Mayıs 2012-Ağustos 2012 tarihleri arasında 52 kronik hepatit B hastası (Grup 1), 47 inaktif HBV taşıyıcısı (Grup 2) ve HBsAg negatif olan (anti-HBs pozitif veya negatif olan) 102 kontrol grubunu oluşturmak üzere çalışmaya alındı ve bu gruplarda PCR-RFLP yöntemi kullanılarak TNF- $\alpha$  geninin promotor bölgesindeki -308 G/A polimorfizimleri incelendi. Sonuçlar SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 11.5 programı kullanılarak değerlendirildi.

**Bulgular :** Ne hasta ve ne de kontrol grubunda A/A genotipine rastlanmazken, G/A genotipi sıklığı, kronik hepatit B grubunda % 11,5, inaktif HBV taşıyıcılarında % 6,4 ve kontrol grubunda % 17,6 bulunmuştur. G/A ve G/G genotiplerinin dağılımı açısından kronik hepatit B hastaları ile inaktif HBV hastaları arasında fark saptanmamıştır. Yine kronik HBV enfeksiyonlular (grup 1+2) ile kontrol grubu arasında da G/A ve G/G genotiplerinin dağılımı açısından fark gözlenmemiştir. TNF- $\alpha$  308 promotor geninde G/A (guanin adenin) genotipi sıklığı açısından HBV enfeksiyonu olan grup ile kontrol grubu arasında önemli farklılık yoktu. Kontrol grubundaki sadece anti-HBs >1 IU/ml ve 30 yaş üstü bireyler istatistiksel analize alındığında, G/A genotipi sıklığının kronik HBV enfeksiyonlularda ve inaktif HBsAg taşıyıcılarında kontrol grubundakilere göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü. Kronik hepatit B enfeksiyonlu hastalardan TNF-  $\alpha$  308 G/G VE G/A genotiplerine sahip olanlar arasında histopatolojik olarak orta-ciddi fibrozis (İshak>2) açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

**Sonuç:** Çalışmamız TNF- $\alpha$  308 polimorfizmi allel A varlığının, HBV enfeksiyonundan iyileşmeyi olumlu yönde etkileyebileceğini ancak bu konuda daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğuna işaret etmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Tümör nekroz faktörü- $\alpha$ , Hepatit B virüs, Gen Polimorfizmleri

## ABSTRACT

**Purpose:** Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) plays a significant role in immune response of host against HBV, and cytokine production capacity has a genetic component. The present study was carried out to determine whether TNF- $\alpha$  308 gene promoter polymorphism is associated with the recovery from infection after encountering with hepatitis B virus (HBV) and with prognosis in patients with chronic HBV infection.

**Materials and Method:** The study consisted of 52 chronic hepatitis B patients and 47 inactive HBV carriers who applied to Infectious Diseases polyclinics of Gaziosmanpaşa University during May 2012 and August 2012 period along with 102 healthy individuals who were HBsAg negative (anti-HBs positive or negative). Using PCR-RFLP method, -308 G/A polymorphisms of TNF- $\alpha$  gene was studied in these groups. Results were evaluated using SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows software (Ver. 11.5).

**Findings:** A/A genotype of TNF- $\alpha$  308 gene promoter was observed neither in patient nor in control groups. Frequency of G/A genotype was 11.5 % in chronic hepatitis B patients, 6.4 % in inactive HBV carriers and 17.6 % in control group. No difference was found for the distributions of G/A and G/G genotypes between chronic hepatitis B patients and inactive HBV carries. In addition, no difference was observed between subjects with chronic HBV infections (groups 1 + 2) and control group for the distributions of G/A and G/G genotypes. There was no difference between HBV infection and control groups for the frequency of G/A (guanine/adenine) genotype of TNF- $\alpha$  308 gene promoter. When only individuals in control group who had anti-HBs >1 IU/ml and older than 30 years of age were considered, frequency of G/A genotype in subjects with chronic HBV infections and inactive HBV carriers were statistically lower than that of control group. When chronic hepatitis B patients were grouped into TNF alpha 308 G/G and G/A genotypes and were studied histopathologically, no significant difference was detected between the groups for moderately severe fibrosis (Ishak>2).

**Conclusion:** The present study showed that presence of TNF- $\alpha$  308 allele Apolymorphism could positively affect the recovery from HBV infection, but larger scale studies are required.

**Key words:** Tumor necrosis factor- $\alpha$ , Hepatitis B virus, Gene Polymorphisms

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Hepatit B Virüsü.....	2
2.1.1 Tarihçe.....	2
2.1.2 Virion Yapısı ve Genomik Organizasyonu.....	2
2.1.3 HBV Mutantları.....	4
2.1.4 HBV Antijenleri.....	4
2.1.5 Duyarlılık ve Direnç.....	5
2.1.6 İmmunopatogenez.....	5
2.1.7 Epidemiyoloji .....	7
2.1.8 Bulaşma Yolları.....	7
2.1.9 Klinik Belirti ve Bulgular .....	7
2.1.10 Akut Hepatit B Virüs Enfeksiyonu.....	8
2.1.11 Kronik HBV Enfeksiyonu Tanımlar ve Evreler.....	9
2.1.11.1 HBV enfeksiyonu ile ilgili tanımlar.....	9
2.1.11.2 Kronik Hepatit B Evreleri.....	10
2.1.11.2.1 İmmün tolerans evresi (replikatif dönem).....	10
2.1.11.2.2 İmmün klirens evresi (HBeAg pozitif kronik hepatit) .....	10
2.1.11.2.3 İnaktif HBsAg taşıyıcılık evresi(nonreplikatif dönem) .....	11
2.1.11.2.4 Reaktivasyon evresi (HBeAg negatif KHB).....	11
2.1.13 HBV Enfeksiyonunda Mikrobiyolojik Tanı.....	12
2.1.13.1 Serolojik tanı yöntemleri.....	12
2.1.13.2 Moleküler tanı yöntemleri.....	12
2.1.14 Hepatit B Virüsü Enfeksiyonlarında Tedavi.....	13

2.1.14.1 Akut HBV enfeksiyonunda tedavi.....	13
2.1.14.2 Kronik HBV enfeksiyonunda tedavi .....	13
2.2 İnaktif Hepatit B .....	14
2.2.1 Tanım.....	14
2.2.2 Epidemiyoloji.....	15
2.2.3 İnaktif HBV Taşıyıcılığı ve İmmünespresif Hasta.....	16
2.2.4 İnaktif HBV Taşıyıcılığı ve Siroz İle HSK Gelişimi .....	16
2.2.5 İnaktif HBV Hastaları ve Takip .....	16
2.3 TNF Alfa (TNF- $\alpha$ ) ve TNF- $\alpha$ Gen Polimorfizmi .....	17
2.3.1 Tümör Nekrosis Faktör Alfa (TNF- $\alpha$ ).....	17
2.3.1.1 Tanım.....	17
2.3.1.2 Etki mekanizması.....	17
2.3.2 TNF- $\alpha$ Geni ve Polimorfizmleri.....	19
2.3.2.1 Polimorfizm ve SNP (tek nükleotid polimorfizmi)...	19
2.3.2.2 Sitokinler ve sitokin genleri.....	19
2.3.2.3 TNF- $\alpha$ 308 gen polimorfizmi.....	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	21
3.1 Hasta Seçimi .....	21
3.1.1 Çalışma Gruplarının Tanımlanması.....	21
3.1.2 Kontrol Grubu.....	22
3.1.3 Çalışmaya Alınmama Kriterleri .....	22
3.2 Etik Kurul İzni ve Bilgilendirilmiş Onam .....	22
3.3 Örneklerin Alınması ve Hazırlanması.....	22
3.3.1 Periferik Kan Lökositlerinden DNA İzolasyonu.....	22
3.3.2 Çalışma Yöntemi.....	23
3.3.3 Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Analizi...	24
3.4 İstatistiksel Yöntemler.....	25
4. BULGULAR.....	26
5. TARTIŞMA.....	33
6. SONUÇ.....	39
KAYNAKLAR.....	40



## KISALTMALAR

<b>HBV</b>	: Hepatit B virüs
<b>RV</b>	: Revers Transkriptaz
<b>Th2</b>	: Tip 2 T hücresi
<b>NKT</b>	: Doğal Öldürücü Hücre
<b>CD 8</b>	: Sitotoksik T Hücresi PZR:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RFL</b>	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm
<b>AFP</b>	: Alfa Fetoprotein
<b>SNP</b>	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
<b>MHK</b>	: Major Histokompatibilite Kompleksi
<b>HLA</b>	: Human Lökosit Antijen
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekrozis Faktör alfa
<b>TNFR-1</b>	: TNF Reseptör 1
<b>TNFR-2</b>	: TNF Reseptör 2
<b>AASLD</b>	: The American Association for the Study of Liver Diseases
<b>APASL</b>	: The Asian Pasian for the Study of the Liver
<b>EASL</b>	: European Association for the Study of the Liver
<b>NIH</b>	: National Institutes of Health
<b>HSK</b>	: Hepatosellüler Kanser
<b>KHB</b>	: Kronik Hepatit B
<b>SDKH</b>	: Son Dönem Karaciğer Hastalığı
<b>SR</b>	: Spontan İyileşme
<b>G</b>	: Guanin
<b>A</b>	: Adenin
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>ALT</b>	: Alanin Aminotransferaz
<b>ELISA</b>	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

## ŞEKİLLER VE TABLOLAR

Şekil 1. HBV Moleküler Virolojisi.....	3
Tablo 1.KHB'nin siroza progresyon riskini artıran faktörler.....	11
Tablo 2. HBV enfeksiyonunda görülen serolojik profiller .....	12
Tablo 3.TNF - $\alpha$ 308 (rs3091256) polimorfizm bölgesi çoğaltılması için kullanılan spesifik primerler ve reaksiyon bileşimi.....	23
Tablo 4.TNF - $\alpha$ geni -308 bölgesinin PZR ürünlerinin kesimlemesinde kullanılan enzim süre ve sıcaklık .....	24
Tablo 5. Hasta ve taşıyıcı grupların genel özellikleri.....	26
Tablo 6. Grupların yaş ve cinsiyet dağılımları .....	27
Tablo 7. Hasta ve taşıyıcı grup ile kontrol grubunun yaş ve cinsiyet dağılımları.....	27
Tablo 8. Grupların TNF- $\alpha$ gen polimorfizm açısından karşılaştırılması.....	28
Tablo 9. Hasta ve inaktif taşıyıcı ile kontrol grubunun TNF- $\alpha$ 308 gen polimorfizmi açısından karşılaştırılması .....	28
Tablo 10. Grupların TNF- $\alpha$ 308 gen polimorfizmi açısından karşılaştırılması (Kontrol Grubu, anti-HBs >1 IU/mL ve 30 yaş üstü kişiler olarak alınmıştır).....	29
Tablo 11. Hasta ve inaktif taşıyıcı ile kontrol grubunun TNF- $\alpha$ gen polimorfizmi açısından karşılaştırılması (kontrol grubu antiHBs >1 IU/mL ve 30 yaş üstü kişiler).....	29
Tablo 12. Kronik hepatit B hastalarında ( grup 1) G/A ve G/G genotiplerinin yaş, cinsiyet,İshak evre ve ALT açısından karşılaştırılması.....	30
Tablo 13. Entekavir veya tenofovir tedavisi alan hastaların GG ve GA genotiplerine göre İshak evre, HBV DNA 6. ay ve 12. ay takip değerlerinin karşılaştırılması.....	31
Tablo 14. Kronik HBV enfeksiyonu olanların (Grup 1 ve Grup 2) G/G VE G/A genotiplere göre yaş, cinsiyet, HBV DNA ve ALT özellikleri....	32

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik viral hepatit etkeni olan hepatit B (HBV) virüsü, karaciğer hücresinde yaptığı nekroinflamasyon ve replikasyon sonucu, fibrozis, siroz ve hepatosellüler kansere neden olan önemli bir patojendir. Kronik Hepatit B enfeksiyonu, dünyada 350 milyondan fazla insanı etkileyen bir halk sağlığı sorunudur (1, 2). Etkili bir aşısı olmasına, tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen önemini korumaktadır (1).

HBV enfeksiyonu hastalarda çeşitli klinik sonlanımlara sebep olur; HBV ile enfekte yetişkinlerin %90-95'i kendini sınırlayan hepatit ile virüsü başarıyla ortadan kaldırırken ve %5-10'u kronik HBV taşıyıcısı olurken, kronik enfeksiyonların %20-30'u karaciğer sirozuna yol açar ve %5'inde hastalık gidişatında uzun vadede hepatosellüler karsinom gelişir (1, 2).

Kronik hepatite ilerleme riski yaş, cinsiyet, karaciğerdeki fibrozis bulguları ve hepatitik alevlenmelere bağlıdır (3).Hepatit B virüsünün klirens sürecinde HBV'ye konak immün yanıtına katılan birkaç sitokin tanımlanmıştır. Özellikle, tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) HBV enfeksiyonunun immünpatogenezinde önemli bir sitokindir. Son kanıtlar, TNF- $\alpha$ 'nın karaciğerde HBV ekspresyonunun ve replikasyonunun nonsitolitik baskılanmasını indükleyebileceğini öne sürmektedir (4).

TNF- $\alpha$  geninin promotor bölgesindeki polimorfizmler, HBV enfeksiyonu ile ilişkisi açısından kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. TNF- $\alpha$ -308 promotor gen polimorfizminin HBV enfeksiyonunun klirensi ile ilişkisini araştıran çalışmaların sonuçları çelişkilidir (5).

Bu çalışmada TNF- $\alpha$ -308 gen promotor polimorfizmi ile kronik HBV enfeksiyonu arasındaki ilişki araştırılmak istenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Hepatit B Virüsü

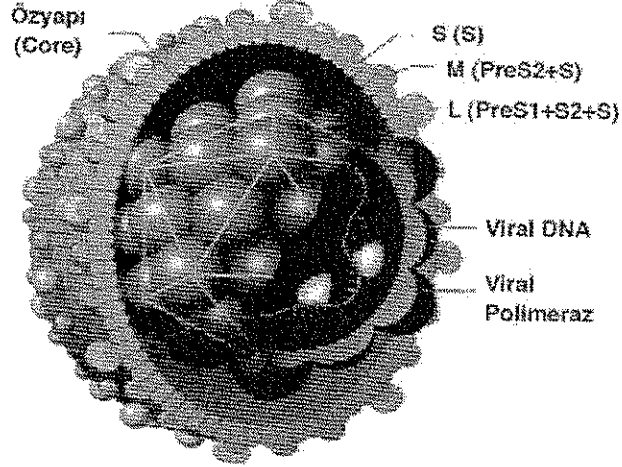
#### 2.1.1 Tarihçe

Hepatit B virüsü (HBV) ile enfekte olmuş kişilerle ilgili bilgilerin ilk kez Hipokrat tarafından ortaya konduğu bilinmektedir (6). Yakın tarihte ise HBV ilk defa Blumberg ve arkadaşları tarafından 1965 yılında Avustralyalı Aborjinlerin serumlarında izole edilmiş ve sonrasında "Avusturalya (Au) Antijeni" olarak tanımlanan bir serum proteini olarak rapor edilmiştir. 1970 yılında viriyonun elektron mikroskopik görüntüleri saptanarak "Dane Partikülleri" adını almıştır. HBV infeksiyöz partikülü olan 42 nm büyüklüğündeki Dane partikülleri dışında 22 nm'lik sferik ve 22 x 100-200 nm büyüklüğündeki filamentöz partiküller de elektron mikroskopunda tarif edilmiş, daha sonraki yıllarda da çeşitli çalışmalarda virüsün genomik yapısı ve proteinleri tespit edilmiştir (7).

HBV kanatlı ve memelilerde enfeksiyon oluşturan, genom organizasyonu, doku tropizmi ve replikasyon stratejisi açısından birbirine benzerlikler gösteren çeşitli virüslerden oluşan Hepadnaviridae ailesinde sınıflandırılmaktadır. HBV sadece insan ve şempanzelerin karaciğerlerinde enfeksiyon oluşturur (8).

#### 2.1.2 Virion Yapısı ve Genomik Organizasyonu

HBV zarflı bir DNA virüsüdür. Viral genom yaklaşık 3200 nükleotitten ve kısmen çift ( $\approx$  % 70), kısmen tek iplikli ( $\approx$  % 30) çembersel DNA'dan oluşur ve ikozahedral bir kapsid içerisinde bulunur; bunun dışında da lipit bir zarf vardır ve bu zarf üç farklı yüzey antijenini taşır (Şekil 1). HBV bir DNA virüsü olduğu halde Revers Transkriptaz (RT) enzimi kodlar ve RNA aracısı üzerinden replike olur. Zarflı bir virüs olmasına rağmen eter, düşük pH, ısı, dondurma ve çözmeye oldukça dirençlidir. Bu özellikler virüsün kişiden kişiye geçişteki etkinliğine katkıda bulunur ve dezenfektan direncini sağlar (8,9).



Şekil 1. HBV Moleküler Virolojisi (10)

Hepatit B virüsü, bilinen tüm hayvan DNA virüsleri içinde genomu en küçük olan virüstür. Genomik yapısı 3200 nükleotidden oluşur. Hepatotropik bir virüs olmasının yanısıra karaciğer dışı doku ve organ tutulumu da (kemik ilgi, lenf bezleri, periferik kan mononükleer hücreleri, dalak) söz konusudur. HBV ile enfekte hastaların kanları elektron mikroskobunda incelendiğinde; büyüklük, yapı ve miktar bakımından birbirine benzemeyen üç ayrı viral partikül varlığı gösterilmiştir (1).

- Yaklaşık 42 nm çapında, enfektif özellikte, tam bir virion yapısında küresel şekilli, Dane partikülleri;
- Yaklaşık 22 nm çapında, içinde nükleik asit bulunmayan, non-enfektif, küresel partiküller.
- Özellikle replikasyonun olduğu kişilerin serumunda bulunan, 22 nm çapında, 50-500 nm uzunluğunda nükleik asit içermeyen, non-enfektif, tübüler partiküllerdir (1, 11,12).

Her üç partikül de immünojeniktir ve anti-HBs antikorları ile reaksiyon verirler. Enfekte konak serumunda yüksek miktarda (200-500 µg/ml) saptanabilen HBsAg adı verilen ortak yüzey antijeni içerirler (11,13).

HBV genomları arasında farklılıklar olduğu moleküler çalışmalarla gösterilmiş ve A' dan H' ye kadar sıralanan sekiz genotip belirlenmiştir. Genotip A Kuzeybatı Avrupa, Sahra Altı Afrika ve Amerika' da, genotip B ve C sıklıkla

Güneydoğu Asya, Okyanusya' da, genotip D Akdeniz Ülkeleri, Batı Asya ve Güney Amerika' da daha sık görülmektedir. Genotip E Batı Afrika ile sınırlıdır. Genotip F Orta ve Güney Amerika' da saptanmış nadir bir genotiptir. Genotip G ve H dağılımı ile ilgili yeterli bilgi yoktur (14, 15,16). Türkiye'de yapılan çalışmalar, genotip D'nin ülkemizde yaygın olduğunu göstermektedir. Ülkemizde görülen alt tip ise ayw olarak saptanmıştır (17, 18).

### 2.1.3 HBV Mutantları

HBV enfeksiyonu, yüksek düzeyde virion üretimi ve yıkımı ile karakterizedir. İlaçlar ya da immün sistem tarafından baskılanmazsa günde yaklaşık  $10^{11}$  virion oluştuğu tahmin edilmektedir (19, 20).

Yüksek virion üretimi olmasına karşın HBV RT (Reverse Transcriptase) enziminin proofreading aktivitesinin olmaması, replikasyonda yüksek düzeyde hata oluşmasına neden olmaktadır. HBV Polimerazının hata oranı, yılda nükleotid başına  $1.4 \times 10^{-5}$ - $5 \times 10^{-5}$  ile DNA virüslerinden  $10^4$  kat yüksektir (21).

Oluşan viral mutantlara bağlı olarak enfekte kişideki virüs popülasyonu genetik olarak yakın ancak birbirinden farklı özellikler taşıyan varyantlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Konakta virüse avantaj sağlayan mutasyonu taşıyan virüsler seçilerek baskın popülasyon haline gelmektedir (1, 2, 22).

### 2.1.4 HBV Antijenleri

A. HBsAg ve yüzey (kılıf) proteinleri: HBV' nin S geni tarafından kodlanan yüzey proteinleri altı farklı polipeptitten oluşur. Bu proteinler partikül yüzeyinde farklı oranlarda bulunurlar. HBV enfeksiyonunda S proteinine karşı antikor oluşması hastalıktan koruyucudur (1).

B. Kor (nükleokapsid) proteinleri: HBcAg ve HBeAg: Ortak determinantlara sahip bu iki proteinin antijenik özellikleri farklıdır. HBcAg sadece karaciğerde bulunmasına rağmen dolaşımda bulunan HBeAg' i albumin, immünglobulin ve  $\alpha$ -antitripsinle bağlanır, yapısındaki HBcAg ile ilgili yapılar maskelenir ve anti-HBe (Hepatit B virüs e antikor) ile reaksiyon verir. HBeAg' nin görevi tam olarak bilinmese de replikasyon için gerekli değildir (1).

HBcAg, intrasellüler yerleşimlidir. HBcAg dolaşımında sadece Dane partikülleri içinde bulunduğundan serolojik olarak tespit edilemez. Ancak aktif hastalık döneminde ve aşırı viral replikasyon gösteren olgularda sitoplazmada gösterilebilir. HBcAg' nin immünojenitesi HBsAg' den daha fazla olduğundan, T hücre bağımsız antijen özelliği vardır. HBV kor proteini kronik hepatit B' de immün yanıt için ana hedefdir (1).

C. P proteini: HBV genomunun yaklaşık %75' ini oluşturan P geni tarafından kodlanır. P proteini, RT, endonükleaz, DNA ve RNA (Ribonükleik asit) bağımlı polimerazaktivitesine sahiptir. DNA sarmalının sentezinde düzenleyici rolü vardır (1).

D. X proteini (HBx): HBV genomundaki en küçük gen bölgesi olan X geni ürünü olan X proteini, virüs replikasyonu için gereklidir. HBx viral genom transkripsiyonunda aktivatör role sahiptir. Hepatit B x antijeni (HBxAg)' nin tümör süpresör gen ürününün (p53) işlevini bozarak hepatosellüler kanser gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir (1).

### **2.1.5 Duyarlılık ve Direnç**

HBV, serum içinde 30-32°C' de 6 ay, -20°C' de ise 15 yıl canlılığını korur. Serum içinde 60°C' ye 4 saat dayanabilir. Kurutulmuş virüs 25°C' de saklandığında 1 hafta süreyle canlılığını devam ettirir. Kuru sıcak hava ile 180°C' de 1 saatte, otoklavda 121°C' de 15 dakikada, kaynatma ile 10-20 dakikada inaktive olur. Virüsün, 500 ppm klor solüsyonunda 10 dakikada, %0.1-2 sıvı gluteraldehid, %70 izopropil alkol, %80 etil alkolde 2 dakikada inaktive olduğu gösterilmiştir (23).

### **2.1.6 İmmunopatogenez**

Karaciğer, gastrointestinal sistem ve sistemik dolaşım arasında yer aldığından çok sayıda antijen ve toksik materyale maruz kalır, bu antijenlerle aktive hale gelmiş sitotoksik T hücreleri (CD8 hücreler) karaciğerde tutulur ve apoptozise uğrar, T hücreleri tip 2 T hücresi (Th-2) olmaya yönelir ve böylece her karşılaşmada antijene gereksiz immün yanıt oluşturulması engellenmiş olur (24). HBV sitopatojenik olmadığı halde, virüsün varlığında konağın immün cevabının Hepatit B enfeksiyonu

patogenezinin sorumlu olduğu kabul edilmektedir (25). Hepatit B varlığında karaciğer kuppfer hücreleri, doğal öldürücü hücreler (naturel killer; NKT) aktive edilir ve NK hücreleri interferon gamma ve tümör nekroz faktör alfa üreterek kemokin ligandlarının ekspresyonunu artırır ve aktive T hücreleri bölgeye çevrilir. Karaciğerin HBV ile karşılaştığı durumlarda konak immün sistem ile HBV arasında galibi belirsiz bir savaş başlar (26, 27).

Hepatit B virüsüne karşı konakçının immün yanıtı karaciğerde hasara neden olmaktadır. Hücresele immün yanıt iki yolla olur:

I-HLA klas I CD8+CTL kontrolündeki yol:

Bu yoldaki hücresele immün yanıtta, Hepatit B virüsünün küçük proteinleri (özellikle de HBcAg) CD 8' e sunulmak için hepatosit içinde belirli süreçlerden geçirilir, bu süreçlerden sonra oluşan süreç hepatosit yüzey membranına getirilir, hepatosit yüzey membranındaki bu süreçler direkt olarak CD 8 sitotoksik T lenfositler ile birleşir ve infekte hücrenin ölümüne neden olur (28). Hepatit B virüs proteinlerin residü peptidlerini düzenlemek sınırlı olduğundan, klas I' deki bağlanma oluşunda değişiklik yapılarak, bu residü peptidlerin bağlanmaları sağlanabilir. Günümüzde Major- Histokompatibilite- Kompleks (MHC)' deki bağlanma alanları polimorfik natürde olması bunu desteklemektedir ve bu immüno-dominant Hepatit B virüs peptidlerinin çok çeşitli bağlanma afinitesi olduğundan akut Hepatit B virüs enfeksiyonu sonrasında, virüse karşı gelişen immün yanıtın şeklini belirler (29).

II. HLA klas II CD4 + Helper T-hücre kontrolündeki yol:

Hepatosit dışındaki viral proteinlerin peptid parçacıkları karaciğere özgü olmayan antijen sunan hücreler (özellikle makrofajlar) tarafından hücre içine alınır. Bu antijen sunan hücrelerin sitoplazmasında yine benzer şekilde süreçler oluşturulur ve bu süreçler hücre membranına getirilir. Bu süreçler CD4 T hücreleri ile birleşir, bu birleşim, T hücre çoğalmasını, T hücreleri tarafından sitokin (bu sitokinler hepatositlerde hasara ve antijen sunan hücrenin ölümüne neden olur) salgılanmasını ve B hücrelerinin uyarılmasını tetikler.

Bu farklı immün yanıtlar sonrasında virüs başarılı şekilde temizlenir, virüsün başarılı şekilde temizlenebilmesi için konakta, Major- Histokompatibilite- Kompleks molekülü, spesifik T- hücrelerine antijen sunumu ve T-hücreleri arasındaki uyuma



(yani konakta hiçbir immün yetmezlik durumunun olmamasına) bağlıdır. Eğer bu tanınmada ve aktive olmada yetmezlik olursa, enfekte tüm hücreler parçalanır, viral replikasyon ürünleri açığa çıkar ve HBsAg' ye karşı oluşan antikör hepatositlerin yeniden enfekte olmasını önleyemediğinden, başka hepatositler enfekte olur. Yani, yeterli immün yanıt olmazsa enfeksiyon devam eder (30). Sitotoksik T lenfositler, viral replikasyonu direkt olarak inhibe ederek, enfekte hepatositleri öldürmeden HBV' yi inaktive ederler (31).

### **2.1.7 Epidemiyoloji**

Hepatit B Virüsü (HBV) akut / kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinomun önemli etkenlerinden birisidir. Tüm dünyada 350 milyondan fazla insanın HBV ile kronik olarak enfekte olduğu bilinmektedir. Etkili bir aşısı olan HBV enfeksiyonları bütün dünyada ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak önemini sürdürmektedir (2). Türkiye' de HBsAg (HBV yüzey antijeni) seroprevalansı yaklaşık olarak %2,1 olup yaklaşık 3-4 milyon insanın HBV taşıyıcısı olduğu tahmin edilmektedir. Ülkemizde anti-HBs pozitifliği ise %20,6 ile % 86,9 arasındadır (32). Diğer Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de genotip D daha sık görülür (33, 34, 35, 36).

### **2.1.8 Bulaşma Yolları**

Virüsün en önemli rezervuarı insandır. HBV' nin dört ana bulaşma yolu vardır; enfekte kan ya da vücut salgıları ile parenteral temas (perkütan), cinsel temas, enfekte anneden yeni doğana bulaşma (perinatal-vertikal), enfekte kişilerle cinsellik içermeyen yakın temas (horizontal). Hava yoluyla, içme sularıyla ve böceklerle enfeksiyonun geçişi rapor edilmemiştir (37).

### **2.1.9 Klinik Belirti ve Bulgular**

Hepatit B virüsünün inkübasyon periyodu 45 ile 180 gün arasındadır. Hepatit B enfeksiyonu, asemptomatik enfeksiyondan fulminan karaciğer hastalığına kadar değişebilen farklı klinik seyir göstermektedir. Hastalık çocuklarda ve gençlerde yetişkinlere göre daha hafif ve asemptomatik olarak seyretmektedir. HBV

enfeksiyonunun 4 yaşın altındaki çocuklarda %90, 30 yaşın üzerindeki yetişkinlerde ise 2/3 oranında asemptomatik olarak geçirildiği bildirilmektedir (38). Hastalar halsizlik, yorgunluk, bulantı, üst kadranda abdominal ağrı, kas ve eklem ağrıları gibi spesifik olmayan şikayetlerle başvurabilir. Akut hepatit B enfeksiyonu subklinik, anikterik hepatit, ikterik hepatit şeklinde olabilir. Çoğu kronik hepatit B hastasının dekompanse siroz gelişmediği sürece belirgin bir semptomu olmaz. Semptomlar akut hepatitte olduğu gibi genellikle özgül olmayan semptomlardır. abuk yorulma, halsizlik, kas ağrıları, bulantı, iştah değişiklikleri başlıca semptomlardır. Fizik muayeneleri normal olabilir. Kronik hepatitli hastaların bir kısmı siroza ilerlediği için hastalarda karaciğer sirozuna ait semptomlar da olabilir. Sirozu olan hastalarda sarılık, splenomegali, asit, spider anjioma, periferik dem ve ensefalopati görülebilir (39). KHB hastalarının %10-20'sinde dolaşan immün komplekslere bağlı olduğu düşünülen karaciğer dışı bulgular olabilir. En önemli karaciğer dışı iki komplikasyon poliarteritis nodosa ve glomerülonefrittir (40).

#### **2.1.10 Akut Hepatit B Virüs Enfeksiyonu**

Hepatit B virüsünün alındığı yaş, HBV' nin akut enfeksiyonunda klinik, seyir ve sonuçları açısından en önemli faktördür. Neonatal veya erken yaşta alındığında kronikleşme fazla olur ve hastalık subklinik geçirilirken, erişkin yaşta alındığında ise kronikleşme oranı azalır ancak semptomatik geçirme oranı artar. Yenidoğan döneminde anneden enfeksiyonu alanlar > %90 kronik HBV taşıyıcısı haline gelirken, yenidoğan dönemi sonrası ile 5 yaş arasında enfeksiyonu alanlarda kronikleşme %30 civarında olmaktadır (42, 43 ,44).

Akut HBV enfeksiyonu yaklaşık %95' i 2-3 ay içinde klinik iyileşme ile seyreder. Yaklaşık 4-10 haftalık bir inkübasyon dönemini takiben HBsAg serumda ölçülebilir hale gelir ve hemen sonra Anti-HBc IgM pozitifleşir. HBsAg' nin belirmesinden sonraki 2-6 hafta içinde aminotransferazlar yükselir ve ikter gibi klinik bulgular ortaya çıkar. Serumda kolayca belirlenebilen bir diğer serolojik marker HBeAg' dir ve HBeAg ya HBsAg ile birlikte veya ondan kısa bir süre sonra ortaya çıkar. Akut dönemde özellikle HBeAg' nin pozitif olduğu dönemde HBV DNA seviyeleri oldukça yüksektir ve sıklıkla 200 milyon IU/mL - 200 milyar IU/mL ( $10^9$ - $10^{12}$  kopya/mL) arasındadır. İyileşen enfeksiyonda HBeAg negatifleşişip anti-

HBe oluşur, HBsAg negatifleşir, anti-HBs oluşur ve Anti-HBc IgM yerini anti-HBc IgG' ye bırakır. Oluşan anti-HBs antikorları koruyucu antikorlardır (45). İyileşen enfeksiyon hastada çoğu kez ömür boyu bağışıklık kazandırır (46). HBV ile akut enfekte olan olguların yaşa göre değişmekle beraber yaklaşık % 0,5-1' inde fulminan hepatit oluşmaktadır (47).

## **2.1.11 Kronik HBV Enfeksiyonu Tanımlar ve Evreler**

### **2.1.11.1 HBV enfeksiyonu ile ilgili tanımlar**

Kronik HBV enfeksiyonunun doğal seyrinde dört evre bulunmaktadır. Her hastada her evre görülmeyebilir. Kronik HBV enfeksiyonunun evrelerini açıklamadan önce HBV enfeksiyonu ile ilgili bazı tanımlardan bahsetmek gerekir (41).

**Kronik B Hepatiti:** Hepatit B virusu varlığının ve karaciğerde nekroinflamatuvar aktivitenin 6 aydan fazla devam etmesi. HBV DNA'nın anlamlı düzeyde ölçülebilir olması gerekir ( $>10^4$  kopya/ml).

Kronik B Hepatiti tanısal kriterler;

- a) HBsAg(+) > 6 ay veya HBsAg(+) / anti-HBc Ig M(-) > 6 ay
- b) HBV DNA >  $10^4$  kopya/ml
- c) Sürekli veya intermittan transaminaz yüksekliği
- d) Karaciğer biyopsisinde nekroinflamatuvar aktivite  $\pm$  fibrozis

**İnaktif hepatit B virüs enfeksiyonu (inaktif HBV taşıyıcılığı):** HBV enfeksiyonu devam etmesine rağmen virüs replikasyonunun önemsiz düzeyde, HBeAg negatif, transaminazlarda sürekli normal olduğu durumdur. Karaciğerde önemli histopatolojik bozukluk yoktur.

İnaktif HBV taşıyıcılığı tanısal kriterler (AASLD 2009):

- a) HBsAg(+) > 6 ay veya HBsAg(+) / anti-HBc Ig M(-) > 6 ay
- b) HBeAg(-) ve anti-HBe(+)
- c) Serum HBV DNA < 2000 IU/ml ( $10^4$  kopya/ml)
- d) Sürekli normal transaminaz değerleri
- e) Yapılırsa karaciğer biyopsisinde normal veya minimal değişiklikler

## **2.1.11.2 Kronik hepatit B evreleri**

### **2.1.11.2.1 İmmün tolerans evresi (replikatif dönem)**

Bu evrede klinik ve patolojik değişiklikler az, buna karşın HBV replikasyonu yüksek orandadır. HBV DNA yüksek seviyede, HBeAg pozitif, anti-HBe negatif, alanin aminotransferaz (ALT) düzeyi normal ve karaciğer biyopsisinde herhangi bir özellik yoktur (48, 49).

Muhtemelen konakçının immün sisteminin olgunlaşmaması nedeniyle HBV ile infekte hepatositlere karşı yeterli immün yanıt gelişmemektedir. Bunun sonucunda HBV alabildiğine replike olmakta, fakat immün yanıt olmadığı için karaciğerde nekroinflamasyon ve fibrozis gelişmemektedir. Bundan dolayı transaminaz değerleri normal olmaktadır. Bu dönemde karaciğer biyopsisi yapılmasına gerek yoktur. Ancak yapılırsa normal ya da minimal aktiviteli hepatit gözlenir (50).

Bu dönem daha çok perinatal kazanılmış HBV enfeksiyonunda gözlenir ve 10-40 yıl devam edebilir (51).

### **2.1.11.2.2 İmmün klirens evresi (HBeAg pozitif kronik hepatit)**

Bu evrede karaciğerde inflamasyon olur ve serum ALT düzeyi artar. Virüsle enfekte hepatositler immün sistem tarafından temizlenir (52). Komplikasyon olarak hepatik dekompanzasyon meydana gelebilir (53). Bu aşamada ALT yüksekliği ve hepatit gelişimi, konağın HBV'ye karşı immün yanıtı nedeniyle olur. ALT düzeyinin yüksek olması HBV'ye karşı immün yanıtın şiddetini ve yaygın hepatosit hasarını göstermektedir. Bu olayın devamında ise HBeAg serokonversiyonu ve/veya HBV DNA'da negatifleşme görülür. HBeAg serokonversiyonunun olması ise % 85 oranında klinik remisyon (inaktif kronik HBV enfeksiyonu) anlamına gelmektedir (54, 55).

İmmün klirens döneminin süresi ve hepatit alevlenme sıklığı ile siroz ve HSK gelişme riski arasında ilişki vardır. Hepatit alevlenme tekrarlaması erkeklerde daha fazla olur. Bu durum, HBV'ye bağlı siroz ve HSK' in erkeklerde kadınlardan neden daha sık olduğunu açıklayabilir (56).

### 2.1.11.2.3 İnaktif HBsAg taşıyıcılık evresi (nonreplikatif dönem)

Bu evrede HBeAg yoktur, anti-HBe oluşmuştur, ALT normaldir ve HBV DNA düşük veya ölçülemeyecek düzeydedir. Karaciğer biyopsisi genellikle hafif hepatit ve minimal fibrozisi gösterir. Nonreplikatif dönemdeki bu hastalarda yıllık %0,1-2 oranında HBsAg kaybı gelişebilir (57).

### 2.1.11.2.4 Reaktivasyon evresi (HBeAg negatif KHB)

Bu dönemde HBeAg negatif, anti-HBe pozitif, HBV DNA yüksek ve ALT artmıştır. Karaciğerde nekroinflamasyon devam eder (58). Bu evredeki hastalar genelde yaşlıdır ve ileri evre karaciğer hastalıkları mevcuttur. Reaktivasyon kendiliğinden veya immün supresyon sonucu olabilir (59, 60).

KHB enfeksiyonu olan hastalarda spontan HBsAg serokonversiyonu yılda %0,5-1 oranında bildirilmiştir (61, 62). Kronik Hepatit B hastalarının yaklaşık olarak %15-40'ı siroz ve son dönem karaciğer hastalığına ilerler (63). Siroz olanlarda HSK gelişme riskinin her yıl için %2,5-5 arasındadır ve siroza gidişi hızlandıran faktörlerin varlığı bilinmektedir (64, 65, 66) (Tablo 1).

Tablo 1. KHB'nin siroza progresyon riskini artıran faktörler

Konak faktörleri	Viral faktörler	Çevresel Faktörler
İleri yaş <sup>z</sup>	Yüksek HBV replikasyonu <sup>z</sup>	Eşlik eden Enfeksiyon (HCV*, HDV, HFV)
Erkek cinsiyet*	Genotip C>B*	Alkol bağımlılığı*
İmmün durum	Mutant HBV	Diyabetes mellitus**
Tanı yaşı		Obezite**

\*: Çalışmalarla kanıtlanmış.

\*\* : Kanıtlanmamış.

### 2.1.13 HBV Enfeksiyonunda Mikrobiyolojik Tanı

#### 2.1.13.1 Serolojik tanı yöntemleri

HBV ile enfeksiyon oluştuğunda organizmada virüse ait çeşitli antijenlere (HBsAg, HBcAg ve HBeAg) karşı antikorlar meydana gelmektedir. HBV enfeksiyonlarının özgül tanısını koymak amacıyla hasta serumunda bu antijenlerin ve antikorların varlığı araştırılmaktadır. Bu amaçla ELİSA testleri kullanılmaktadır. ELİSA test sonuçlarına göre hastalık tanısı, Tablo 2'ye göre yapılır (67, 68).

Tablo 2: HBV enfeksiyonunda görülen serolojik profiller

	HBsAg	Anti-HBs	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HBc IgM	Anti-HBc IgG
İnkübasyon periyodu	+	-	+	-	-	-
Akut enfeksiyon	+	-	+	-	+	-
Akut enfeksiyon pencere dönemi	-	-	+/-	+/-	+	+/-
Kronik enfeksiyon	+	-	+/-	+/-	-	+
Geçirilmiş iyileşmiş enfeksiyon	-	+	-	+	-	+
Aşı ile immünite	-	+	-	-	-	-

#### 2.1.13.2 Moleküler tanı yöntemleri

Günümüzde HBV ile ilgili çalışmalarda moleküler yöntemler kullanılarak HBV DNA araştırılması gittikçe yaygınlaşmaktadır. Hem kalitatif hem de kantitatif yönden HBV DNA araştırılabilmektedir. Bu testler serumda 10 kopya/ml gibi az bir virüs miktarını bile saptayacak kadar yüksek duyarlılıktadır. Ancak çeşitli kantitatif test sonuçları arasında standardizasyon sorunu bulunmaktadır (69).

Moleküler yöntemlerin kullanım alanları; serolojik yöntemlerin tanıda yetersiz kaldığı durumlar, mutant suşların tespiti, antiviral ilaç direncinin belirlenmesi, antiviral tedaviye karar verme ve tedavinin izlenmesi ve genotip tayini olarak özetlenebilir (69).

## **2.1.14 Hepatit B Virüsü Enfeksiyonlarında Tedavi**

### **2.1.14.1 Akut HBV enfeksiyonunda tedavi**

Akut HBV enfeksiyonunda öncelikli tedavi destek tedavisidir. Rutin olmamakla beraber ciddi seyirli akut hepatit B vakalarında antiviral ajanların kullanılabileceği ileri sürülmektedir (67).

### **2.1.14.2 Kronik HBV enfeksiyonunda tedavi**

Tedaviye başlamadan önce kronik hepatit B enfeksiyonlu hastalarda başlangıç değerlendirilmesi yapılmalıdır. Başlangıç değerlendirmesi, anemnez, fizik muayene, ailede hepatit ve karaciğer kanser hikâyesi, diğer enfeksiyon için risk faktörleri ve alkol kullanımı içermektedir. Hastalar hepatit B virüs enfeksiyonun geçiş yolları hakkında bilgilendirilmelidir, eşi ve ailesinde hepatit B enfeksiyonu araştırılmalı ve immun olmayanlar aşılanmalıdır. Tüm hastaların aşırı alkol almaları engellenmelidir ve sirozlu hastaların alkoldan uzak durmaları tavsiye edilir. Tüm kronik hepatit B' li hastalar, hepatit A' ya karşı immün yanıtları yoksa hepatit A aşısı olmaları tavsiye edilir. Aşı başlangıç ve 6 veya 12 ayda olmak üzere toplam 2 kez yapılır (69).

Tedavi öncesi hastaların mutlaka AST, ALT ve HBV DNA düzeylerine bakılmalıdır. ALT ve AST düzeyleri normal olan hastalar izlenerek bunların immuntoleran veya inaktif taşıyıcı olup olmadıklarına karar verilmelidir. İmmuntoleran ve inaktif taşıyıcı olanlara karaciğer biyopsisine ve tedaviye gerek yoktur.. Karaciğer biyopsisi, HBV DNA değeri yüksek olup ALT düzeyi normalin 1-2 katı yüksek olan 40 yaşından büyük olgularda önerilir. The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) ve The Asian Pasific Association for the Study of the Liver (APASL) rehberlerinde karaciğer biyopsisinde orta veya şiddetli inflamasyon veya belirgin fibrozis saptanan olgularda tedavi önerilir. European Association for the Study of the Liver (EASL) rehberinde ise biyopsi sonucu >A2 veya >F2 ise tedavi önerilmektedir. Sirotik hastalarda HBV DNA düzeyi ne olursa olsun oral antivirallerle tedavi verilmelidir. (70,73).

Kronik aktif HBV enfeksiyonunun tedavisi interferonlar ve oral antiviral ilaçlarla yapılmaktadır. Antiviral tedavisindeki ana hedef, HBV DNA ve HBeAg' nin kaybolması ile viral replikasyonun inhibisyonudur. İkincil hedefler ise, semptomları azaltmak ve siroz ile HSK gelişimini önlemektir (67).

Günümüzde kronik hepatit B hastalarının tedavisi, interferon ile bağışıklık sisteminin uyarılması ve antiviral ajanlar ile viral replikasyonun baskılanması şeklinde yapılmaktadır (71, 72, 73 ).

#### **Kronik Hepatit B Tedavisinde Kullanılan İlaçların Dozu ve Süresi (74) :**

İlaç	Doz	Süre
Peginterferon alfa-2a	180µg /haftada bir kez	48 hafta
Peginterferon alfa-2b	1.5 µg/kg haftada bir kez	48 hafta
Lamivudin	100 mg/gün	En az 1 yıl*
Adefovir	10 mg/gün	En az 1 yıl*
Entekavir	0.5 mg/gün-1.0 mg/gün**	En az 1 yıl*
Tenofovir	300 mg/gün	En az 1 yıl*
Telbivudin	600 mg/gün	En az 1 y

\*HBeAg pozitif olgularda tedavi AntiHBe oluşuktan sonra en az 6-12 ay sürdürülür. HBeAg negatif olgularda tedavi süresinde nihai hedef HBsAg değeri negatif olana kadardır.

\*\* Lamivudin refrakter veya lamivudine dirençli hastada

## **2.2 İnaktif Hepatit B**

### **2.2.1 Tanım**

Kronik HBsAg taşıyıcılığı, HBsAg pozitifliğinin 6 aydan uzun sürmesi ile karakterizedir. İnaktif HBsAg taşıyıcılığı bundan farklı bir kavramdır (75). 2000' de yapılan NIH (National Institutes of Health) uzlaşısı toplantısında asemptomatik veya sağlıklı HBsAg taşıyıcılığı yerine inaktif HBsAg taşıyıcılığı kavramının kullanılmasına karar verilmiştir (76).

Kronik HBV enfeksiyonu olan hastaların % 70-90' ında karaciğer enzimlerinin normal olduğu saptanmıştır (77). Yakın zamana kadar normal aminotransferaz değerlerinin ve anti- HBe oluşumunun kronik hepatit B



infeksiyonun inaktif ve masum bir durumun göstergesi olduğu kabul edilmekteydi (78). Bu hastalara daha önce "sağlıklı HBsAg taşıyıcısı" olarak kabul edildiklerinden bu hastalara karaciğer biyopsisi yapmak anlamsız ve etik olarak da sakıncalıydı (79). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise bu karaciğer enzimleri normal ve anti-HBe pozitif olan hastaların bir kısmının HBeAg negatif kronik hepatit B hastası olduğu ALT ve HBV DNA düzeylerinin dalgalanmalarla seyrettiği ve bu hasta grubunda histopatolojik olarak tedavi gereksinimi olabileceği saptanmıştır (70).

### 2.2.2 Epidemiyoloji

Dünyada yaklaşık 350 milyondan fazla HBV taşıyıcısı vardır (2) Ülkemizde ise sosyoekonomik koşullardaki düzelme ve 1998' den beri hepatit B aşısının ulusal rutin çocuk aşılama programına dahil edilmesi nedeniyle taşıyıcılık oranı % 5' den % 3-4' e düşmüştür (80).

İnaktif HBsAg taşıyıcılığı tanı kriterleri (AASLD 2009):

- 1) >6 ay HBsAg pozitifliği
- 2) HBeAg(-), anti-HBe (+) olması
- 3) Serum HBV DNA <2.000 IU/mL olması
- 4) Sürekli normal ALT/AST değerleri
- 5) Karaciğer biyopsisinde belirgin hepatit bulgularının olmamasıdır.

İnaktif taşıyıcıların yaklaşık % 20-30' unda immunosupresyona bağlı ya da spontan olarak, HBeAg seroreversiyonu olsun ya da olmasın HBV DNA ve ALT seviyelerinde tekrar yükselmeye kendini gösteren HBV reaktivasyonu gelişebilir. Reaktivasyonlar genellikle asemptomatiktir. Bu alevlenmelerin %20-30' u HCV, HDV ve HAV' a bağlı süperenfeksiyonlar sonucu olabilir (81) . Kalıcı veya tekrarlayan reaktivasyonlar ilerleyici karaciğer hasarına, siroza neden olabilir (82) .

İnaktif taşıyıcıların %5' inde spontan reaktivasyon ile HBeAg pozitifliği görülebilir (83). Bu hastalarda çoğu zaman precore/core mutasyon suşları vardır (84). İnaktif HBV taşıyıcılarındaki HBV DNA düzeyinin dalgalı seyri nedeniyle HBeAg

negatif kronik hepatit B hastalarını inaktif taşıyıcılardan ayırt etmek güçtür ve bu ayırımı kesin olarak yapabilecek bir HBV DNA seviyesi net bir değer belirlenememiştir (85). Şu an için belirlenen sınır EASL klavuzuna göre HBV DNA seviyesi 2000 IU/ml dir ve inaktif taşıyıcı diyebilmek için bir yıl boyunca ALT seviyelerini normal seyretmesi gerekmektedir. İnaktif HBV taşıyıcılarında spontan HBsAg seroklirensi, yüksek endemik bölgelerde yılda %0.1-0.8 arasında iken düşük endemisite alanlarında %1-2.1 arasında değişir (86).

### **2.2.3 İnaktif HBV Taşıyıcılığı ve İmmünyüpresif Hasta**

İmmünyüpresif veya kemoterapi alacak inaktif HBV olgularında lamivudin profilaksisi fatal komplikasyon ve alevlenmeleri önler (87).

### **2.2.4 İnaktif HBV Taşıyıcılığı ve Siroz İle HSK Gelişimi**

HSK gelişimi açısından yüksek riskli hastalar (88):

- 1) 40 yaş üstü Asyalı erkek ya da 50 yaş üstü Asyalı kadın olmak,
- 2) Ailede HSK anemnezi olmak
- 3) Siroz varlığı
- 4) 40 yaş üzerinde sürekli veya aralıklı ALT yüksekliği saptanan ve/veya HBV DNA >2000 IU/mL olan her taşıyıcı

### **2.2.5 İnaktif HBV Hastaları ve Takip**

İnaktif HBV taşıyıcıları hayat boyu izlenmelidir. Antiviral tedavi alan veya spontan HBsAg kaybı olan inaktif taşıyıcıların yarısında serumda HBV DNA saptanmıştır. HBsAg kaybı olan olgularda yıllar sonra bile hepatosellüler kanser görülmüş ve bunun kayıptan önce gelişen karaciğer harabiyetine bağlanacağı bildirilmiştir (88). Ülkemizde başlıca bulaşın çoğunlukla çocukluk döneminde perinatal ya da horizontal olduğu düşünülürse 40 yaş üstünde ve/veya ailede HSK anemnezi olan (yaştan bağımsız olarak) inaktif HBsAg taşıyıcıları 6 ayda bir HSK açısından taranmalıdır . Klinik takiplerde kullanılan ultrasonografinin duyarlılığı ve

özgüllüğü yüksek olsa da tanısal doğruluk hekimin deneyimine bağlı olduğu için ultrasonografi ile eş zamanlı AFP takibi de eşlik etmelidir (75).

## **2.3 TNF Alfa (TNF- $\alpha$ ) ve TNF- $\alpha$ Gen Polimorfizmi**

### **2.3.1 Tümör Nekrosis Faktör Alfa (TNF- $\alpha$ )**

#### **2.3.1.1 Tanım**

TNF- $\alpha$ , inflamatuvar fonksiyonları olan ve endojen immün yanıtta rol oynayan potent bir sitokindir. TNF- $\alpha$  bakteriyel toksinlere ve inflamasyonlara farklı yanıtlar verir. Genellikle aktive olmuş makrofajlar tarafından üretilirken astrosit, fibroblast, mast hücresi, natural killer hücresi, düz kas ve epidermal hücreler gibi normal hücrelerin yanında bazen de malign hücre tipleri tarafından da üretilir (89).

TNF- $\alpha$ ' nın biyolojik fonksiyonu karmaşıktır. Akut durumlarda TNF- $\alpha$ ' nın lokal üretimi faydalıdır. Vasküler endoteldeki adezyon moleküllerinin üretimini artırarak immün hücrelerin, özellikle nötrofil ve makrofajların, doku hasarı veya enfeksiyonun olduğu bölgeye gitmesine izin verir. Bunun yanısıra TNF- $\alpha$  fagositleri aktive ederek, onların enfekte edici ajanları ve hücre enkazlarının temizlemesini sağlar (89). Fakat TNF- $\alpha$ ' ya sistemik ve uzun süreli maruz kalmak zararlı olabilir. Dolaşımdaki fazla TNF- $\alpha$  seviyesi, toksik şok ve travma hastalarında metabolizmanın bozulması ile ilişkili bulunmuştur (90). TNF- $\alpha$  hem protümörijenik hem de antitümörijenik özellik göstermektedir. Yüksek dozda lokal TNF- $\alpha$  uygulaması, tümör kan damarlarını tahrip eder ve güçlü bir anti-tümör aktivitesine sahiptir. Fakat düzensiz ve fazla üretildiğinde kanser gelişimine yol açtığı görülmüştür (91).

#### **2.3.1.2 Etki mekanizması**

TNF- $\alpha$ , spesifik reseptörüne bağlanmak suretiyle etki eder. TNF- $\alpha$ , etkisini birçok hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlerinden, reseptör I ve II (TNFR-I ve TNFR-II) aracılığıyla gösterir (92). TNF- $\alpha$  TNFR-2' ye olan afinitesi, TNFR-1' den 5 kat fazla olmasına rağmen, TNF- $\alpha$ ' nın biyolojik aktivitesinin çoğunluğunu TNFR-1 başlatır (93). TNFR-1 bütün hücre tiplerinde eksprese olmasına rağmen, TNFR-2' nin ifadesi çoğunlukla immün hücrelerle sınırlıdır. Bu iki reseptör arasındaki temel fark, TNFR-2' de eksik olan, fakat TNFR-1' de bulunan ölüm

domainidir (DD = Death domain). Bu yüzden, TNFR-1, apoptotik hücre ölümünü indükleme yeteneğine sahip ölüm reseptör ailesinin önemli bir üyesidir. TNFR-1, apoptozisin yanı sıra, hücre yaşam sinyalleriyle de uyum sağlama özelliğine sahiptir. TNFR-2 ise, apoptozisi indüklemekle beraber, doku tamiri ve anjiogenezisi de sağlayabilir (94). Hepatosit hücrelerinde TNF- $\alpha$  ve hepatosit membranındaki TNF- $\alpha$  reseptörü arasında etkileşim ile dört farklı yanıt gelişir:

- 1) Kaspase 8 etkileşimi ile apoptozise neden olur.
- 2) Sfingomiyelinaz aktive edilerek, lipid peroksidazizasyonuna neden olur ve nekroze sebep olur.
- 3) Jun-N-terminal kinaz aktivasyonu ve epidermal growth faktör gibi yardımcı mitojenlerle birlikte hepatosit proliferasyonuna sebep olur.
- 4) Mitokondrideki TNF ile ilişkili mitokondrial reaktif oksijen ürünlerinin üretimini artırır. Hepatositler için yaşamsal önemi olan faktörlerinin sentezine neden olur. TNF- $\alpha$ 'nın reseptörle etkileşmesi ile apoptozis ve nekroz görülebildiği kadar hücrenin yaşamsal sinyalleri ve hücre proliferasyonuna da neden olur (95).

Karaciğerde TNF- $\alpha$ , viral hepatitin, alkolik karaciğer hastalığının, nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının ve iskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde rol oynar. Bu sitokin dikkate değer bir zıt fonksiyonel etkiler gösterir; yalnızca hepatotoksisitenin mediyatörü değildir, aynı zamanda hepatosit proliferasyonun ve karaciğer rejenerasyonunun indükleyicisidir (96).

Son kanıtlar TNF- $\alpha$  ve interferon gama gibi hedef bölgelerdeki doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sistemlerinin aktive edilmiş efektör hücreleri tarafından salınan antiviral sitokinlerin karaciğerdeki HBV ekspresyon ve replikasyonunun non-sitolitik baskılamasını indükleyebileceğini ileri sürmektedir (97).

İn-vitro deneyler, rekombinant TNF- $\alpha$ 'nın, HBV m-RNA bozulmasına hızlı bir şekilde aracılık ettiğini ve HBV kor promoter bölgesini etkileyerek HBV replikasyonunu önlediğini ortaya çıkarmıştır (98). Dolaşımdaki TNF- $\alpha$  düzeyleri HBV enfeksiyonu esnasında artar (99). Karaciğerde HBV ekspresyonu yapan transgenik farelerde artmış hepatik TNF- $\alpha$  düzeyleri, HBV replikasyonun baskılanması ile ilişkilidir (100).

TNF- $\alpha$ 'nın anjiyogenez sürecinde de etkili olduğu gösterilmiştir. HBV ile enfekte hastaların karaciğerindeki neoanjiyogenez, TNF- $\alpha$ 'nın viral hepatit ilişkili karaciğer tümörlerinin gelişiminde de bir rolü olabileceğini ileri sürmektedir (101).

### **2.3.2 TNF- $\alpha$ Geni ve Polimorfizmleri**

#### **2.3.2.1 Polimorfizm ve SNP (tek nükleotid polimorfizmi)**

İnsan genomunun dizilenmesiyle birlikte, DNA'nın yaklaşık %99.9'unun bütün insanlarda benzer olduğu görülmüştür. %0.1'lik fark, bireyler arası varyasyondan ve her bireyin bireysel fenotipinden sorumludur (102). Tek baz değişimi şeklinde görülen bu küçük genetik varyasyonlar, SNP (tek nükleotid polimorfizmi) olarak adlandırılır. SNP'ler genel popülasyonda sıklıkla oluşan (>%1) genetik değişimler olarak sınıflandırılırken, proteinler üzerinde fonksiyonel değişiklikler oluşturan nadir varyantlar ise mutasyon olarak sınıflandırılır. Mutasyonlarla karşılaştırıldığı zaman SNP'ler, fonksiyonel olarak anlamsız olarak düşünülmekte iken, sonraki bulgular dikkate değer bir kısmının proteinlerin iç özelliklerini ve fonksiyonlarını çeşitli derecelerde etkilediğini göstermiştir (103). SNP'ler insan genomunda en fazla görülen genetik değişimlerdir (104). SNP'ler, bireyler arasındaki kan basıncı, ilaç metabolizması, kan pıhtılaşması ve kardiyovasküler fonksiyon bozuklukları gibi birçok fizyolojik fonksiyon çeşitliliğinden sorumludur (105).

#### **2.3.2.2 Sitokinler ve sitokin genleri**

İmmün sistem, insanları enfekte edici ajanlara ve tümör gelişimine karşı korumak için gelişmiş karmaşık bir hücreler ağıdır. Sitokinler immün sistemin bir parçasıdır ve özel uyaranlara cevap olarak hücreler tarafından salgılanan immün düzenleyici proteinler veya glikoproteinlerdir. Hedef hücreler üzerinde aktivite göstererek bu hücrelerdeki sitokin reseptörlerine bağlanırlar ve bu hücreler içindeki sinyal iletimi ve ikincil mesaj yolunu başlatırlar. Bu olaylar, mitotik bölünme, farklılaşma, göç veya apoptoza yol açan gen aktivasyonu ile sonuçlanabilir. İmmün hücreler sitokinin üretiminde ve inflamatuvar immün cevapta kritik rol oynar (106).

Sitokinler ve sitokin reseptör genleri, yüksek derecede polimorfiktir. Sitokinler, enfeksiyonel, alerjik, otoimmün veya kardiyovasküler hastalıklar gibi

birçok hastalıkta etkin rol oynamasından yola çıkarak sitokin gen polimorfizmlerinin bu hastalıklarla ilişkisinin incelendiği çok sayıda genetik çalışma yapılmıştır (107, 108).

### 2.3.2.3 TNF- $\alpha$ 308 gen polimorfizmi

TNF- $\alpha$  geni 1984 yılında klonlanmıştır (109). TNF- $\alpha$  geni, 6. kromozomun kısa kolunun sınıf III HLA-DR lokusunda 850 kb telomer yerleşimlidir ve insan lökosit antijeni (HLA) gen kümeleri ile yakından bağlantılıdır (110). TNF- $\alpha$  geninin promotorundaki polimorfizmler, transkripsiyon hızını ve sitokin salınımını etkilemekten sorumlu tutulurlar. Şu ana kadar, -163 G/A, -238 G/A, -244 A/G, -308 G/A, -376 G/A, -575 A/G, -857 C/T, -863 C/A, -1031 T/C, -1125 G/C ve -1196 C/T baz çiftleri de dahil olmak üzere, TNF- $\alpha$  geninin promotor bölgesinde yaklaşık 11 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) bilinmektedir (111). Bu polimorfizmler, TNF- $\alpha$  geninin transkripsiyonel aktivitesini etkileyebilir ve serum TNF- $\alpha$  düzeyine farklı etkileri vardır. -308 A alleli, yüksek serum TNF- $\alpha$  düzeyi ve periferik kan mononükleer hücreleri tarafından yüksek TNF- $\alpha$  üretimi ile ilişkilendirilmiştir (112).

Genel olarak, polimorfizmler ile sitokin üretimi arasındaki ilişki üzerine bir görüş birliği bulunmamaktadır. Bütün bu polimorfizmler içinde, -308 lokusundaki polimorfizmler diğerlerinden daha geniş bir şekilde araştırılmıştır (113). TNF- $\alpha$  geninde en sık gözlenen ve promotor bölgede bulunan G>A polimorfizmi genin transkripsiyonel aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu noktada, guanin (G) nükleotidinin, adenin (A) nükleotidine dönüşümü şeklinde (GG>GA) bir değişim gözlenir (114).

Yapılan çalışmalar, -308A allelini içeren hücrelerin, -308G allelini içeren hücrelere göre altı kat daha fazla mRNA sentezlediğini göstermiştir (115). TNF- $\alpha$  -308 promotorundaki polimorfizmler ile romatoid artrit, serebral malarya, inflamatuvar barsak hastalığı, astım, Hodgkin lenfoma ve kronik lenfositik lösemi arasında ilişkiyi gösteren yayınlar bulunmaktadır (116, 117, 118).

Günümüzde Hepatit B immünopatogenezine her gün eklenen yeni bilgilerle TNF- $\alpha$  -308 promotorundaki polimorfizmin Hepatit B infeksiyonunu nasıl etkilediği ilgi çekici konulardan biri haline gelmiştir.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1 Hasta Seçimi

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Polikliniğine Mayıs 2012 - Ağustos 2012 tarihleri arasında ardısıra başvuran 18-80 yaşları arasında inaktif hepatit B taşıyıcısı 47 hasta ve kronik aktif hepatit B tanısı alan 52 hasta, ayrıca kontrol grubu olarak aynı dönemde polikliniğimize hepatit testleri açısından başvuran ve akut ya da kronik hepatit B enfeksiyonu saptanmayan sağlıklı 102 erişkin hasta cinsiyet ayrımı yapılmaksızın çalışmamıza alındı.

##### 3.1.1 Çalışma Gruplarının Tanımlanması

Hastalar 2009 AASLD Viral Hepatit Guideline'ında belirtilen tanımlara uygun olarak gruplandırıldı (70). Hasta grupları ve tanımları aşağıda belirtilmiştir. Aşağıdaki özellikleri taşıyan hastalar inaktif HBsAg taşıyıcısı ve kronik hepatit B hastası olarak kabul edilmiştir.

Inaktif HBsAg taşıyıcısı:

- 1) HBsAg 6 aydan fazla pozitif,
- 2) HBeAg negatif, anti HBe pozitif,
- 3) Serum HBV DNA < 2.000 IU/ml (<10<sup>4</sup>kopya/mL),
- 4) Normal ALT/AST,
- 5) Anti-HDV negatif
- 6) Karaciğer biyopsisinde normal veya minimal değişiklikler görülmesi.

Kronik Hepatit B hastası:

- 1) HBsAg 6 aydan fazla pozitif,
- 2) HBV DNA > 2.000 IU/ml,
- 3) Sürekli veya intermittan transaminaz yüksekliği,
- 4) Karaciğer biyopsisinde orta ya da yüksek nekroinflamasyon ve/veya fibrozis görülmesi.

### **3.1.2 Kontrol Grubu**

Kontrol grubu olarak Gazismanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinin Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğine Mayıs 2012 – Ağustos 2012 tarihleri arasında hepatit testleri açısından başvuran ve akut ya da kronik hepatit B enfeksiyonu saptanmayan sağlıklı 102 erişkin hasta cinsiyet ayrımı yapılmaksızın çalışmamıza alındı. Bu bireylerin anti-HBs sonuçları kayıtlardan elde edildi.

### **3.1.3 Çalışmaya Alınmama Kriterleri**

Çalışmaya 18 yaşından küçük, 80 yaşından büyük olan, akrabalık bağı olan, anti-HCV veya anti-HIV pozitif olan denekler alınmadı. Otoimmün hepatit , toksik hepatit , bilier siroz gibi karaciğer hastalıklarının herhangi birine sahip olanlar çalışmadan çıkarılmıştır.

## **3.2 Etik Kurul İzni ve Bilgilendirilmiş Onam**

Araştırmaya katılan tüm bireylere araştırma ile ilgili ayrıntılı bilgi verilmiş ve onam formu kan örneği alınmadan önce imzalatılmıştır. Çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Etik Kurulu tarafından 1/11/2011 tarih 217 sayılı toplantısında 11 –BADK-111 numaralı kararıyla onaylanmıştır.

## **3.3 Örneklerin Alınması ve Hazırlanması**

### **3.3.1 Periferik Kan Lökositlerinden DNA İzolasyonu**

Çalışmanın genetik araştırma kısmı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (AD) tarafından yapılmıştır. Bunun için hasta bireylerden ve kontrol bireylerinden EDTA (Etilendiamin Tetra Asetik Asit) içeren tüplere alınan 5 ml periferik kan örnekleri Tıbbi Biyoloji AD Moleküler Genetik laboratuvarına ulaştırıldı. Burada kandan 200 µl alınarak İnvitrogen kan DNA izolasyon kiti (Kat. No: K1820-02) ile hasta ve kontrol gruplarının DNA' ları elde edildi.



### 3.3.2 Çalışma Yöntemi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile İlgili Gen Bölgesinin Amplifikasyonu PZR nükleik asitlerin in-vitro olarak, uygun koşullar altında istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerle çoğaltılmasına dayanan bir yöntemdir. PZR döngüsü sırasıyla, DNA iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (Denatürasyon-94°C); sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (Hibridizasyon-LEP 55°C-LEPR 60°C) ve zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması (Polimerizasyon-72°C) aşamalarından meydana gelir. PZR için doğal DNA replikasyonu sırasında gerekli olan temel elementler kullanılır. Bir PZR reaksiyonu için gerekli olan maddeler, hedef DNA, bir çift sentetik primer, deoksinükleotidler (dNTP) ve uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan tampon karışımı, yüksek ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi ve MgCl<sub>2</sub>' den (ortamda bulunan serbest dNTP' ler ile bir araya gelerek Taq DNA polimerazın tanıyabileceği çözünebilir bileşikler meydana getirir) oluşmaktadır. TNF $\alpha$ -308 (rs3091256) polimorfizm bölgesi ısı döngü cihazında çoğaltılması için kullanılan spesifik primerler ve reaksiyon bileşimi Tablo 3' de ve ısı döngü programları aşağıda verilmiştir.

Primerler:

5'-CTCAAGCTGCCACCAAGC-3' (forward) ve

5'AGGGAGCGTCTGCTGGCTG-3' (reverse)

Tablo 3. TNF $\alpha$ -308 (rs3091256) polimorfizm bölgesi çoğaltılması için kullanılan spesifik primerler ve reaksiyon bileşimi

PZR öğeleri	$\mu$ l/Tüp
Su(dH <sub>2</sub> O)	15,35
10x Tampon (Buffer Mg Free) (İnvitrogen, Lot:WF1B1a)	2,5
MgCl <sub>2</sub> (İnvitrogen, Lot:WBNB1d) (50mM-1ml)	1,0
dNTP (Sigma, Lot: 104K6024) (25mM)	1,0
Forward primer (İnvitrogen, 119761, S4421) (20pmol/ $\mu$ l)	1,0
Reverse primer (İnvitrogen, 119761, S4421) (20pmol/ $\mu$ l)	1,0
Taq DNA polimeraz (İnvitrogen, 10966-030) (5U/ $\mu$ l)	0,15
DNA (25-50ng/ $\mu$ l)	3
Toplam	25

Isı Döngü programı:

.....96 °C 2 dk  
.....96 °C 1 dk } 35 döngü  
.....60 °C 1 dk }  
.....72 °C 1 dk  
.....72 °C 7 dk

Uygulanan PZR koşullarıyla, TNF $\alpha$  geni -308 bölgesinin 565 bç'lik PZR ürünleri elde edildi. Ve bu ürünler %2'lik agaroz jel hazırlanarak jel görüntüleme sistemi yardımıyla görüntülendi.

### 3.3.3 Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Analizi

Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'nın farklı büyüklükteki parçalara ayrılması RFLP olarak adlandırılır. Bu yöntemi kullanarak TNF $\alpha$  geni -308 bölgesinin PZR ürünleri Tablo 4' de verilen restriksiyon enzimleri ile aşağıda belirtilen koşullarda kesimlendi.

Tablo 4. TNF $\alpha$  geni -308 bölgesinin PZR ürünlerinin kesimlemesinde kullanılan enzim süre ve sıcaklık

Enzim	Kesim Dizisi	Süre	Sıcaklık (oC)
<i>NcoI</i>	5'-C↓CATG G-	1 saat	37

***NcoI***: TNF- $\alpha$  geni -308 bölgesinin 10  $\mu$ l PZR ürünü, 0,3  $\mu$ l 3U (ünite) (10U/ $\mu$ l) *NcoI* (Fermentas) restriksiyon endonükleaz enzimi, 2,5  $\mu$ l tampon (10X Buffer 1 ml), 12,2  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O toplam hacim 25  $\mu$ l olacak şekilde 37 C'de bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesim ürünlerinin boylarının belirlenmesi için 25  $\mu$ l kesim ürününden 9  $\mu$ l, 1  $\mu$ l (10X) jel yükleme tamponuyla pipetaj yapıp, uzunlukları bilinen marker eşliğinde %2'lik agaroz jele yüklendi. Kesim ürünleri jelde 130 Volt' da yaklaşık 30 dk olacak şekilde yürütüldükten sonra jel görüntüleme cihazına konarak UV ışığı altında görünür hale getirildi. PZR sonucunda elde edilen ürünler içerdikleri allele göre kesinleme gerçekleşir veya gerçekleşmez. Eğer örnek G alleleline sahipse 565bç PZR ürünü enzim tarafından kesilir ve sonucunda 240 bç ve

325 bç uzunluğunda iki parça oluşur. Eğer rnek A alleleline sahipse kesim gerçekleşmez. Böylece kesim ürünlerinin %2' lik agaroz jelde ayrılmasıyla örneğin genotipi belirlenmiş olur.

### **3.4 İstatistiksel Yöntemler**

Çalışma gruplarının genel özellikleri hakkında bilgi vermek amacı ile tanımlayıcı analizler yapılmıştır. Sürekli değişkenlerin dağılımlarının normallik değerlendirilmesinde Kolmogorov-Smirnov testi kullanılmıştır. Sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında normallik değerlendirilmesine göre Bağımsız rnek T testi veya Mann-Whitney U-testi kullanılmıştır. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ise Ki-kare testi kullanılmıştır. Sürekli değişkenlere ait veriler ortalama±standart sapma; kategorik değişkenlere ait veriler n (%) şeklinde verilmiştir. p değerleri 0.05' den küçük hesaplandığında istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Hesaplamalar hazır istatistik yazılımı ile yapılmıştır (IBM SPSS Statistics 19, SPSS inc., an IBM Co., Somers, NY).

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda “kronik hepatit B hastaları” Grup 1 (n=52), “inaktif hepatit B taşıyıcıları” Grup 2 (n=47) olarak isimlendirilmiştir. Kontrol grubu ise 102 kişiden oluşturuldu. Grup 1’ deki hastaların 40’ ı erkek (%76,9), (yaş ortalamaları 47,96±13,22 yıl) Grup 2’ deki hastaların 30’u (%63,8) erkek, (yaş ortalamaları 46,36±14,18 yıl) olarak saptanmıştır. Tablo 5’ te, Grup 1 ve 2’ deki hastaların yaş, cinsiyet, ortalama serum alanin aminotransferaz (ALT) değerleri, HBV DNA düzeyleri, histopatolojik değerlendirme sonuçları (İshak fibrozis 2’ nin altında ve üstünde olanların sayıları) sunulmuştur.

Kronik hepatit B hastalarından 3 ‘ü (%3,8) interferon tedavisini bitirmiş, 37’si (%74), tenofovir ve entekavir, 12’si (%23,1) lamivudin ve telbivudin tedavisi almaya devam eden hastalardı. Bu hastaların hepsi HBeAg negatif ve anti-HBe pozitif.

Tablo 5. Hasta ve taşıyıcı grupların genel özellikleri

		Hasta (n=52)	Taşıyıcı (n=47)
Yaş		47,96±13,22	46,36±14,18
Cinsiyet	Kadın	12(23,1)	17(36,2)
	Erkek	40(76,9)	30(63,8)
ALT (U/ml)		91,42±65,02	27,36±11,84
HBV DNA (IU/ml)	<2000000	19(36,5)	47(31,3)
	≥2000000	33(63,5)	0
İshak Evre	≤2	28(57,1)	1(100,0)
	>2	21(42,9)	0

Grup 1 ve 2 arasında yaş ortalaması açısından fark yokken (p>0.05), her iki grubun yaş ortalamasının kontrol grubundan yüksek olduğu görüldü. Tüm grupların

yaş yönünden ikişerli karşılaştırmaları yapıldığında özellikle Grup 2' nin yaş ortalamasının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptandı. (Tablo 6)

Hastaların 40 (%76,9) 'ı ve taşıyıcıların 30 (% 63,8)'u erkekti. Bu iki grup arasında cinsiyet açısından fark yoktu ( $p=0,227$ ). Ancak hasta ve taşıyıcı gruplarında erkek cinsiyet hakimiyeti varken bu cinsiyet eğilimi kontrol grubuna göre farklılık göstermekteydi (grup 1 ve 3 karşılaştırması için  $p<0,001$  grup 2. ve 3 karşılaştırması için  $p=0,039$ ) (Tablo 6).

Kronik HBV enfeksiyonlu (hasta ve inaktif taşıyıcı) hastaların yaş ortalaması  $47,20\pm 13,64$  yıl iken kontrol grubundaki bireylerin yaş ortalaması  $40,25\pm 18,39$  yıl idi ve iki grup arasındaki bu yaş farkı istatistiksel olarak önemli derecede farklı idi ( $p=0,003$ ). Kronik HBV enfeksiyonlu hastalarda erkek cinsiyet oranı %70,7 iken kontrol grubunda %44,1 olarak belirlenmiş ve iki grup arasında da cinsiyet dağılımı açısından önemli fark olduğu saptanmıştır. ( $p<0,001$ ) (Tablo 7).

Tablo 6. Grupların yaş ve cinsiyet dağılımları

		Hasta (n=52)	Taşıyıcı (n=47)	Kontrol (n=102)	P
Yaş		$47,96\pm 13,22$	$46,36\pm 14,18$	$40,25\pm 18,39$	$P^1=0,563$ , $p^2=0,134$ , $p^3=0,045$
Cinsiyet	Kadın	12(23,1)	57(55,9)	57(55,9)	$P^1=0,227$ , $p^2<0,001$ , $p^3=0,039$
	Erkek	40(76,9)	45(44,1)	45(44,1)	
Veriler Ort±SS veya n(%) şeklinde verilmiştir. P <sup>1</sup> : Hasta ve taşıyıcılar arasındaki p değeri P <sup>2</sup> : Hasta ve kontrol grubu arasındaki p değeri P <sup>3</sup> : Taşıyıcı ve kontrol grubu arasındaki p değeri					

Tablo 7. Hasta ve taşıyıcı grup ile kontrol grubunun yaş ve cinsiyet dağılımları

		Hasta+Taşıyıcı (n=99)	Kontrol (n=102)	P
Yaş		$47,20\pm 13,64$	$40,25\pm 18,39$	0.003
Cinsiyet	Kadın	29(29,3)	57(55,9)	<0.001
	Erkek	70(70,7)	45(44,1)	
Veriler Ort±SS veya n(%) şeklinde verilmiştir.				

Her üç grup, tekli nukleotid polimorfizmi genotip belirlemesi için analiz edildi ve hiçbir grupta A/A genotipi saptanmadı. Kronik hepatit B hastalarının 6' sında (%11,5) G/A genotipi saptanırken, kalan 46 (%88,5) hastada G/G genotipi saptandı. Grup 2' de G/A ve G/G genotipi olanların sayıları sırasıyla 3 (%6,4) ve 44 (%93,6) bulundu. Kontrol grubundaki 18 (%17,6) kişide G/A genotipi saptanırken, diğerlerinin G/G genotipine sahip oldukları görüldü. Bu gruplar TNF- $\alpha$  308 G/G veya G/A genotiplerinin görülme sıklığı açısından birbiriyle karşılaştırıldığında, kronik hepatit B hastaları ve inaktif hepatit B taşıyıcıları arasında ayrıca hem Grup 1'in hem de Grup 2'nin kontrol grubu ile karşılaştırılmasında önemli fark saptanmadı. ( $p>0,05$ ) (Tablo 8). Yine kronik HBV enfeksiyonu olan hastalar (hasta ve inaktif taşıyıcı) ile kontrol grubu arasında TNF- $\alpha$  308 G/G ve G/A genotipleri yönünden fark saptanmadı ( $p=0,116$ ) (Tablo 9).

Tablo 8. Grupların TNF  $\alpha$  gen polimorfizm açısından karşılaştırılması

		Hasta (n=52)	Taşıyıcı (n=47)	Kontrol (n=102)	P	P (1-2)	P (1-3)	P (2-3)
TNF 308	G/G	46(88,5)	44(93,6)	84 (82,4)	0.155	0.492	0.451	0.113
	G/A	6(11,5)	3(6,4)	18 (17,6)				
Veriler n(%) şeklinde verilmiştir. P1-2: Hasta ve taşıyıcılar arasındaki p değeri P1-3: Hasta ve kontrol grubu arasındaki p değeri P2-3: Taşıyıcı ve kontrol grubu arasındaki p değeri								

Tablo 9. Hasta ve inaktif taşıyıcı ile kontrol grubunun TNF- $\alpha$  308 gen polimorfizmi açısından karşılaştırılması

		Hasta ve Taşıyıcı (n=99)	Kontrol (n=102)	P
TNF- $\alpha$ 308	G/G	90 (90,9)	84 (82,4)	0.116
	G/A	9 (9,1)	18 (17,6)	

Kontrol grubunda 4 hastanın anti-HBs sonucu yoktur. Anti-HBs sonucu olanlardan 81 kişinin anti-HBs değeri >1 IU/mL' dir. Toplumumuzda yaşla beraber HBV enfeksiyonu geçirme olasılığı yaşla beraber arttığı için bundan sonraki analizde kontrol grubundaki bireylerden Anti-HBs değeri >1 IU/mL ve 30 yaş üstünde olanlar değerlendirmeye alınmıştır. Bu kriterlere uyan kontrol grubundaki birey sayısı 49'dur. TNF- $\alpha$  308 gen polimorfizmi açısından Grup 1 ve bu kontrol grubu arasında fark yokken Grup 2 ile aynı kontrol grubu arasında önemli fark saptandı (p=0,031). Ayrıca kontrol grubu ile hasta ve inaktif taşıyıcı gruplarının ikisini de içine alan kronik HBV enfeksiyonlu hastalar karşılaştırıldığında TNF- $\alpha$  308 gen polimorfizmi açısından istatistiksel olarak önemli fark saptandı (p<0,05) (Tablo 10 ve Tablo 11)

Tablo 10. Grupların TNF- $\alpha$  308 gen polimorfizmi açısından karşılaştırılması \*

		Hasta (n=52)	Taşıyıcı (n=47)	Kontrol (n=49)	P	P (1-2)	P (1-3)	P (2-3)
TNF 308	G/G	46(88,5)	44(93,6)	37 (75,5)	<b>0,031</b>	0,492	0,150	<b>0,031</b>
	G/A	6(11,5)	3(6,4)	12 (24,5)				
<p>*Kontrol grubu antiHBs &gt;1 IU/mL ve 30 yaş üstü kişiler olarak alınmıştır. Veriler n (%) şeklinde verilmiştir. P1-2: Hasta ve taşıyıcılar arasındaki p değeri P1-3: Hasta ve kontrol grubu arasındaki p değeri P2-3: Taşıyıcı ve kontrol grubu arasındaki p değeri</p>								

Tablo 11. Hasta ve inaktif taşıyıcı ile kontrol grubunun TNF-  $\alpha$  308 gen polimorfizmi açısından karşılaştırılması\*

		Hasta ve Taşıyıcı (n=99)	Kontrol (n=49)	P
TNF- $\alpha$ 308	G/G	90 (90,9)	37 (75,5)	<b>0,023</b>
	G/A	9 (9,1)	12 (24,5)	
<p>*Kontrol grubu anti-HBs &gt;1 IU/mL ve 30 yaş üstü kişiler olarak alınmıştır. Veriler n (%) şeklinde verilmiştir.</p>				

Grup 1 hastalar TNF- $\alpha$  308 gen polimorfizmi açısından G/A ve G/G olarak 2 gruba ayrıldığında (GG genotipi olanlar 46 kişi, GA genotipi olanlar 6 kişi) grupların yaş, cinsiyet, serum ALT düzeyi, histopatolojik olarak İshak evresi ve HBV DNA düzeyleri açısından karşılaştırılması Tablo 12’ de sunulmuştur.

Hastaların yaş ortalaması G/G genotipi olanlarda  $48 \pm 13,34$  yıl ve G/A genotipi olanlarda  $47,17 \pm 13,42$  yıl bulundu. G/G genotipine sahip olanların 10 (%21,7)’ u kadın, 36 (%78,3) tanesi erkek iken, G/A genotipine sahip olanların 2 (%33,3)’ si kadın ve 4 (%66,7)’ ü erkekti. G/G ve G/A genotipli hastalar arasında yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak önemli fark saptanmadı ( $p=0,877$   $p=0,612$ ) (Tablo 12). Serum ALT düzeyi ortalaması G/G genotipi taşıyanlarda  $92,28 \pm 62,72$  U/L ve G/A genotipinde  $84,83 \pm 87,51$  U/L bulundu ( $p=0,795$ ).

G/G genotipi olanların 16 (% 34,8)’ sında HBV DNA  $\leq 2$  milyon IU/ml, 30 (%65,2)’ unda HBV DNA  $> 2$  milyon IU/ml iken G/A genotipi taşıyanların 3 (%50)’ ünde HBV DNA  $> 2$  milyon IU/ml, 3 (%50)’ ünde HBV DNA  $> 2$  milyon IU/ml idi. G/G ve G/A genotipine sahip hastalar arasında HBV DNA düzeyleri açısından istatistiksel açıdan önemli fark yoktu ( $p=0,612$ ,  $p=0,656$ ) (Tablo 12).

Orta ve ciddi fibrozis (İshak evre  $> 2$ ) G/A genotipi olan kronik hepatit B hastalarının % 50’sinde görülürken G/G genotipi olanların % 41,9 unda saptandı. G/A genotipi olanlarla G/G genotipi olanlar arasında İshak evre açısından önemli fark saptanmadı ( $p=0,999$ ) (Tablo 12).

Tablo 12. Kronik hepatit B hastalarında (Grup 1) G/A ve G/G genotiplerinin yaş, cinsiyet İshak evre, HBV DNA ve ALT açısından karşılaştırılması

		GG (n=46)	GA (n=6)	P
Yaş		$48,07 \pm 13,34$	$47,17 \pm 13,42$	0.877
Cinsiyet	Kadın	10(21,7)	2(33,3)	0.612
	Erkek	36(78,3)	4(66,7)	
İshak evre	$\leq 2$	25 (58,1)	3 (50,0)	0.999
	$> 2$	18 (41,9)	3 (50,0)	
HBV DNA (IU/ml)	$\leq 2$ 000000	16 (34,8)	3 (50,0)	0,380
	$> 2$ 000000	30 (65,2)	3 (50,0)	
ALT (U/L)		$92,28 \pm 62,72$	$84,83 \pm 87,51$	0.795
Veriler Ort $\pm$ SS veya n (%) şeklinde verilmiştir. ALT: Alanin Aminotransferaz				



Tenofovir veya Entekavir tedavisi alan hastaların (Ülkemizde sağlık uygulama tebliğine göre entekavir veya tenofovir başlanan tüm hastaların başlangıç HBV DNA düzeyleri 2 milyon IU/ml'nin üzerindedir) HBV DNA düzeylerinde tedavinin 6. ay ve 12. aylarında saptanan negatiflik oranları ve histopatolojik evreleri (İshak) Tablo 13' de sunulmuştur.

G/G genotipine sahip hastalarda orta-ciddi fibrozis (İshak evre >2) 17 hastada (%53,1) görülürken, G/A genotipine sahip 2 (%66,7) hastada orta-ciddi fibrozis saptanmıştır. Fibrozis evresi açısından G/G ve G/A genotipi taşıyan hastalar arasında istatistiksel olarak önemli fark saptanmadı (p=1.00) (Tablo 13).

Entekavir veya tenofovir tedavisi alanlardan 34 hasta G/G, 3 hasta G/A genotipine sahipti. G/G genotipine sahip hastaların 9 (%26,5)' unun HBV DNA değeri 6. ayda negatifleşirken 25 (%73,5)' inin HBV DNA değeri ise hala pozitif. Yine tenofovir veya entekavir tedavisi alan hastaları ele aldığımızda G/A genotipine sahip hastaların 2 (%66,7)' sinin HBV DNA değeri 6. ayda negatifleşmişken 1 (%33,3)' inin HBV DNA değeri pozitif. G/G genotipine sahip hastaların 12. ayda 23 (%69,7)' ünün HBV DNA değeri negatifleşirken, 10 (%30,35)' unun HBV DNA değeri hala pozitif. G/A genotipine sahip hastaların ise %100' ünün 12. ayda HBV DNA değeri negatifleşmişti. Tedavide 6. ay ve 12. ay HBV DNA değeri açısından G/A ve G/G genotipi taşıyan hastalar arasında istatistiksel olarak önemli fark saptanmadı (p:0,205 ve p:0,545) (Tablo 13).

Tablo 13. Entekavir veya tenofovir tedavisi alan hastaların G/G ve G/A genotiplerine göre İshak evre, HBV DNA 6. ay ve 12. ay takip değerlerinin karşılaştırılması

		G/G (n=34)	G/A (n=3)	P
İshak evre	≤2	15 (46,9)	1 (33,3)	1,000
	>2	17 (53,1)	2 (66,7)	
Tedavide 6. ay HBV DNA	>50 IU/ml	25 (73,5)	1 (33,3)	0,205
	≤50 IU/ml	9 (26,5)	2 (66,7)	
Tedavide 12. Ay HBV DNA	>50 IU/ml	10 (30,35)	-	0,545
	≤ 50 IU/ml	23 (69,7)	3 (100,0)	
Veriler n (%) şeklinde verilmiştir.				

Kronik HBV enfeksiyonu olanların (Grup 1 ve Grup 2) G/G ve G/A genotiplerine göre bölündüklerinde yaş, cinsiyet, HBV DNA ve serum ALT düzeyleri karşılaştırması Tablo 14’ te sunulmuştur. Kronik HBV enfeksiyonu olanların 90’ ı G/G ve 9’ u G/A genotipine sahipti. Kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda G/A ve G/G genotiplerine göre yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak önemli fark saptanmadı (p=0,589, p=0.442). Serum ALT düzeyleri ortalaması G/G genotipinde 60,31±56,02 U/L ve G/A genotipinde 68,00±73,76 U/L idi (p=0.626) (Tablo 14).

G/G genotipine sahip olan Kronik HBV enfeksiyonu olanların 60 (%66,7)’ unda HBV DNA ≤2 milyon IU/mL, 30 (%33,3)’ unda HBV DNA >2 milyon IU/mL iken, G/A genotipine sahip olanların 6 (%66,7)’ unda HBV DNA ≤2 milyon IU/mL ve 3 (%33,3)’ ünde HBV DNA >2 milyon IU/mL idi. Kronik HBV enfeksiyonu olanlarda G/G ve G/A genotiplerine göre HBV DNA değerleri açısından istatistiksel olarak önemli fark saptanmadı (p=1.000) (Tablo 14).

Tablo 14. Kronik HBV enfeksiyonu olanların (Grup 1 ve Grup 2) G/G ve G/A genotiplere göre yaş, cinsiyet, HBV DNA ve ALT özellikleri

		G/G (n=90)	G/A (n=9)	P
Yaş		47,26±13,63	46,67±14,22	0.589
Cinsiyet	Kadın	25 (27,8)	4 (44,4)	0.442
	Erkek	65 (72,2)	5 (55,6)	
HBVDNA (IU/ml)	≤2 000000	60 (66,7)	6 (66,7)	1.000
	>2 000000	30 (33,3)	3 (33,3)	
ALT (U/L)		60,31±56,02	68,00±73,76	0.626
Veriler Ort±SS veya n (%) şeklinde verilmiştir.				

## 5. TARTIŞMA

Hepatit B enfeksiyonunun kronikleşme patogeneğinde konak immün yanıtının önemli rolü vardır. Konak immün yanıtının hem hepatosellüler hasardan hem de viral klirensten sorumlu olduğu düşünülmektedir. Hepatosit hasarı, doku makrofaj Kupffer hücreleri aracılığıyla inflamatuvar bir cevap oluşumuna yol açar. Bu aktive edilmiş hücreler, enfekte karaciğerde HBV'nin baskılanması ya da klirensinin merkezinde bulunduğu düşünülen antiviral sitokinleri salgılar (119).

HBV' nin konak immün yanıtı aracılığıyla viral klirensine katılan birkaç sitokin tanımlanmıştır. Bunların içinde TNF- $\alpha$  fibrogenezise katkıda bulunan ve konağın immün yanıtındaki en önemli sitokindir (120). Sitokin genlerindeki polimorfizmlerin, gen transkripsiyonunu etkilediği, dolayısıyla sitokin üretiminde bireyler arası değişikliklere sebep olduğu tanımlanmış ve gösterilmiştir (121). Sitokin gen polimorfizmlerinin, enfeksiyon hastalıkları da dahil olmak üzere bazı hastalıkların duyarlılıklarını, şiddetini ve klinik sonuçlarını etkilediği gösterilmiştir (122, 123). Guillain-Barre'sendromu (124), tüberküloz (125) ve ANCA ilişkili vaskülit (126) bu hastalıklardan birkaçıdır. Kronik B enfeksiyonu sırasında, karaciğerde TNF- $\alpha$ , viral hepatitin, alkolik karaciğer hastalığının, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının ve iskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde rol oynar. Bu sitokin dikkate değer bir zıt fonksiyonel etkiler gösterir; yalnızca hepatotoksisitenin mediyatörü değildir, aynı zamanda hepatosit proliferasyonun ve karaciğer rejenerasyonunun indükleyicisidir (127). Son kanıtlar, TNF- $\alpha$  ve interferon gamma gibi hedef bölgelerdeki doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sistemlerinin aktive edilmiş efektör hücreleri tarafından salınan antiviral sitokinlerin, karaciğerdeki HBV ekspresyon ve replikasyonunun non-sitolitik baskılamasını indükleyebileceğini ileri sürmektedir (128). İn-vitro deneyler, rekombinant TNF- $\alpha$ ' nın, HBV mRNA bozulmasına hızlı bir şekilde aracılık ederek ve HBV kor promotör bölgesini etkileyerek HBV replikasyonunu önlediğini ortaya çıkarmıştır (129). Bunu destekleyecek şekilde, hepatit B virüsünün reaktivasyonu, anti-TNF- $\alpha$  antikoruyla tedavi edilen hastalarda gözlenmiştir (130).

Hepatit B enfeksiyonunun kronikleşmesinde, sitokinlerin, özellikle TNF- $\alpha$ ' nın rolü olduğu düşünülmektedir. Hastalığın ilerlemesinde genetik özelliklerin rolü

olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmada, kronik hepatit B enfeksiyonu olan hastalarla sağlıklı kontrol grubunda TNF- $\alpha$  308 gen polimorfizmleri değerlendirildi ve GA genotipine sahip olmanın kronik hepatit B ile enfekte olmada düşük riske sahip olduğu gösterildi.

TNF- $\alpha$  308 gen promotor polimorfizminin serum TNF- $\alpha$  düzeyine etkileri üzerine görüş birliği yoktur. TNF- $\alpha$  308' de A alelinin varlığının insanlarda artmış serum TNF- $\alpha$  düzeyleri ile ilişkili bulunduğu dair yayınlar bulunmaktadır (131,132).

Zhang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise kronik HBV enfeksiyonlu hastalarda sağlıklı kontrol (HBs Ag: negatif, Anti-HBs: pozitif) grubuna kıyasla serum TNF- $\alpha$  düzeylerinde anlamlı yükseklik olmasına rağmen, TNF- $\alpha$  308 gen polimorfizminin serum TNF- $\alpha$  düzeyi ile hiçbir ilişkisi olmadığı gösterilmiştir (133).

Kronik HBV enfeksiyonunda TNF- $\alpha$  308 gen promotor polimorfizmlerinin etkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar gözleendiğinden net değerlendirme yapılamamaktadır. Bu çalışmada, TNF- $\alpha$  308 G/A polimorfizminin hem hepatit B virüsüyle karşılaşma sonrası enfeksiyonun iyileşmesi ile, hem de kronik HBV enfeksiyonlulardaki prognozla ilişkisini araştırarak genetik özelliklerin, hastalığın patogenezindeki rolünü belirlemeyi amaçladık.

Yapılan çalışmalarda, TNF- $\alpha$  308 gen promotor polimorfizmi ile kronik HBV hastalığının sonlanması ile ilgili 3 farklı sonuç mevcuttur.

Birinci grup çalışmalar "hiçbir ilişki yok" demek demektedir.

TNF- $\alpha$  308 gen promotor polimorfizmi ile kronik HBV hastalığı arasında ilişki olmadığını savunan çalışmalardan biri, Japonya'da Miyazoe ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. 53 siroz ve 147 inaktif hepatit B hastasını ve 52 sağlıklı kontrol grubunu içeren çalışmada, TNF- $\alpha$  308 gen polimorfizmi açısından HBV taşıyıcıları ile HBV den spontan iyileşmiş (SR- HBsAg negatif , anti-HBs pozitif ve anti - HBc IgG pozitif) kontrol grubu karşılaştırılmış, gruplar arasında anlamlı fark olmadığını göstermişlerdir (134).

Benzer şekilde Niro ve arkadaşları, 184 kronik hepatit B taşıyıcısı hastayı HBV enfeksiyonundan spontan iyileşmiş 96 vaka ile TNF- $\alpha$  308 gen promotor

polimorfizmleri açısından karşılaştırmışlar ve HBV taşıyıcısı grubunda TNF- $\alpha$  308 gen polimorfizmlerinin GG ve GA açısından dağılımının kontrol grubuna göre farklı olmadığını ve TNF- $\alpha$  308 gen promotör polimorfizminin HBV enfeksiyonundan temizlenmesinde belirleyici olmadığını göstermişlerdir. Dekompansé olanlarda G/G genotipinin daha hafif karaciğer hastalığı olanlara göre daha sık görüldüğü, G/G genotipi varlığının HBV enfeksiyonlu hastalarda kötü prognoza neden olduğu belirlenmiştir (135). Bizim çalışmamızda da G/G genotipi ile fibrozis arasında ilişki saptanmadı. Bu farklı sonucun nedeni bizim çalışmamızdandekompanse siroz vakalarının olmaması olabilir.

İran'da yapılan bir çalışmada 100 kronik HBV enfeksiyonlu hasta ve 91 HBV enfeksiyonundan spontan iyileşmiş vakada, TNF- $\alpha$  geninin promotör bölgesinde TNF- $\alpha$  308 G/A polimorfizmi incelenmiş ve TNF- $\alpha$  308 gen promotör polimorfizminin, kronik HBV enfeksiyonu gelişimi ile hiçbir ilişkisi olmadığı sonucuna varılmıştır (136).

Höhler ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 71 kronik hepatit B hastası ve HBV enfeksiyonundan spontan iyileşen 99 sağlıklı kontrol alınmış ve TNF- $\alpha$  308 gen polimorfizmi açısından bu gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır (137).

Bizim çalışmamızda, kronik HBV enfeksiyonu olanlarda sağlıklı kontrol grubuna göre GG genotipinin daha fazla görüldüğü ancak GA genotipi açısından Anti-HBs 'ye bakılmaksızın seçilen kontrol grubuna göre anlamlı farklılık saptanmadı.

İkinci grup çalışmalar, TNF- $\alpha$  308 gen promotör polimorfizmlerinin ya "kronik HBV enfeksiyonunun istenmeyen prognozu" ile ya da HBV enfeksiyonun kronikleşme riskinin artışı ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Conde ve arkadaşlarının 28 siroz ve 30 inaktif hepatit B taşıyıcısı ile kontrol grubu olarak HBV' den spontan iyileşme gösteren 100 sağlıklı bireyi içeren bir çalışmada TNF- $\alpha$  308 G/A genotipinin sirotik hastalarda ve inaktif HBV hastalarında anlamlı oranda sık olduğunu göstermiştir (138).Bizim çalışmamız da inaktif HBV taşıyıcıları ile kontrol grubu 30 yaş üstü ve anti-HBs>1 IU/ml alındığında G/A polimorfizmi açısından anlamlı fark saptandı.

Baena ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, TNF- $\alpha$  308 G/A genotipinin sıklığının kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda, HBV enfeksiyonundan spontan

iyileşen kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde az olduğu sonucuna varılmıştır (139). Bu çalışmalar, bizim çalışmamızın aksine G/A genotipinin, HBV enfeksiyonun kronikleşmesine eğilimi artırdığını göstermiştir.

Üçüncü grup çalışmalar da “TNF- $\alpha$  308 protomor gen polimorfizmi ve HBV enfeksiyonunun iyileşmesi arasında pozitif bir ilişki olduğunu” söylemekte ve TNF- $\alpha$  308 G/A ya da A/A genotiplerinin HBV klirensiyle ilişkili olduğunu göstermektedir.

Kim ve arkadaşlarının 1109 kronik HBsAg taşıyıcısı ve 291 HBV’ den spontan iyileşmiş sağlıklı kontrol grubu ile yaptığı bir çalışmada, TNF- $\alpha$  308 G/A ve A/A varlığının HBV enfeksiyonunun iyileşmesi ile güçlü şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir (140).

Güney Çin Bölgesi’nde Xu ve arkadaşlarının 171 HBV ile enfekte hasta ve 227 HBV enfeksiyonundan spontan iyileşmiş kontrol grubu ile yaptığı ve TNF- $\alpha$  308 gen polimorfizminin değerlendirildiği bir çalışmada, kontrol grubunda allel A ve G/A genotip sıklığı anlamlı olarak fazla bulunmuştur. Bu sonuçlar TNF- $\alpha$  308 G/G genotipi taşıyan kişilerde, G/A genotipiyle karşılaştırıldığında, HBV ‘nin kronikleşme riskinin anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermektedir (141).

Kore’de yapılan bir çalışmada, 412 hasta (72 inaktif taşıyıcı, 261 kronik hepatit B hastası 79 karaciğer sirozlu) ve 204 HBV’ den spontan iyileşmiş kontrol grubu TNF- $\alpha$  308 gen polimorfizmi açısından karşılaştırılmış ve TNF- $\alpha$  308 G/G genotipi varlığının hepatit B enfeksiyonunun kronikleşmesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmanın inaktif hepatit B hastaları kolunda da progresif karaciğer hastalığı olanlara benzer genotip sonucu çıkmıştır (142).

HBV enfeksiyonunda TNF- $\alpha$ -308 gen promotor polimorfizmleri ile ilgili 21 çalışmanın bulunduğu bir metaanaliz yapılmıştır (143). 4320 kronik HBV hastası ve 2905 HBV enfeksiyonundan spontan iyileşmiş (SR) kişi ve sağlıklı kişilerden (HBsAg , anti -HBcIgG ve anti HBcIgM negatif) oluşan kontrol grubunun TNF- $\alpha$  308 gen promotor polimorfizmi açısından incelendiği bu metaanalizde farklı etnik kökenler Kafkasoidler (Avrupa kıtası İran, İtalya, Almanya, Türkiye, İsrail kökenli insanlar) ve Mongoloidler (Doğu Asya –Çin, Kore, Japonya kökenli insanlar) olarak kategorize edilmiştir. Çalışmalara dahil olan hasta ve kontrol grupları yaş ve cinsiyet

olarak uyumlu bulunmuştur. Tüm hastalar ve kontrol grubu TNF- $\alpha$  308 varyant fenotipleri (G/A ve A/A) açısından incelenmiştir. Metaanaliz, TNF- $\alpha$  308 A heterozigotlarının (G/A) anlamlı ölçüde azalmış kronik hepatit B (KHB) gelişim riskine sahip olduklarını ve TNF- $\alpha$  308 A aleli homozigotları (A/A) ve taşıyıcılarının (G/A+A/A) anlamlı derecede azalmış KHB riski olduğunu göstermektedir. Kontrol grubu olarak SR grubu ele alındığında 308 varyant genotipleri (G/A ve A/A) varlığı KHB açısından koruyucudur ancak sağlıklı kontrol gruplarıyla karşılaştırma yapıldığında HBV enfeksiyonu ile anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Etnik kökene göre alt grup analizlerinde Mongoloid popülasyonlarda TNF- $\alpha$  308 varyant genotipleri (G/A ve A/A) anlamlı derecede azalmış risk ile ilişkiliyken, Kafkasoidler ile ilgili hiçbir anlamlı bağlantı bulunamamıştır.

Bu metaanalizin bazı kısıtlamaları bulunmaktadır: İlk olarak, genetik polimorfizmler, farklı vaka gruplarında (inaktif taşıyıcı, KHB, karaciğer sirozu) araştırılmıştır ve bu vakalar içinde spesifik genetik etkiler mevcut olabilir. İkinci olarak yaş, etnik köken, aile geçmişi, çevresel faktörler ve hayat tarzı gibi değişkenlere göre uyarlanmamış tahminler bulunmaktadır ve alt grup analizlerinde Kafkasoidlerin sayısı görece olarak azdır. Bu kısıtlamalara rağmen, bu metaanaliz TNF- $\alpha$  308 A alelinin kronik HBV enfeksiyonu için, özellikle Mongoloid ve spontan iyileşen kontrol gruplarında koruyucu bir faktör olduğunu ileri sürmektedir (143).

Bu çalışmalara benzer şekilde, bizim çalışmamızda da G/G genotipinin kronik hepatit B hastalarında sağlıklı kontrol grubuyla benzer oranda fakat spontan iyileşen kontrol grubuna göre daha sık görüldüğü, genotipik özelliklerin, kronikleşmede etkili olabileceği gösterildi. Ancak genetik özellikler toplumlara göre değişebilmektedir. Bu nedenle, Türkiye’de bu konuda yapılan çalışmaları da değerlendirmek gerekmektedir. Bilkay ve arkadaşlarının, HBV enfeksiyonuna bağlı son evre karaciğer hastası (SDKH) 27 hasta, 23 tane inaktif HBV taşıyıcısı ve 60 tane HBV enfeksiyonundan spontan iyileşmiş kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada, TNF- $\alpha$  308 G/G polimorfizmi sıklığı, SDKH hastası ve inaktif HBV taşıyıcısı grubunda, kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulunmuştur. Bilkay ve arkadaşları bu çalışmada, HBV ile enfekte hastalarda TNF- $\alpha$  308 G/G gen polimorfizminin, HBV inhibisyonunu azalttığını, bu nedenle kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda SDKH gelişimi için değerli bir gösterge olabileceğini

öne sürmektedir. Bu çalışmada da bizim çalışmamıza benzer şekilde TNF- $\alpha$  308 G/G gen polimorfizmi sıklığı HBV enfeksiyonlularda (hasta ve inaktif taşıyıcı) sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (144).

Çalışmamızda, hasta ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyetleri birbirinden farklıydı. Ancak gen çalışmalarda, bu farklılığın önemi olmadığından çalışma gruplarının yaş ve cinsiyetlerinin benzer olması için planlama yapılmadı.

Bu çalışmada, HBV DNA düzeyleri ile TNF- $\alpha$  308 gen polimorfizmi arasında ilişki saptanmadı. Ayrıca, kronik hepatit B hastalarının histopatolojik evrelerine göre gen polimorfizmi farklılıkları değerlendirildi. TNF- $\alpha$  308 gen polimorfizminin, hafif karaciğer hasarı ile orta-ileri karaciğer hasarı bulunan hastalarda benzer olduğu görüldü. İnaktif HBsAg taşıyıcıları ile hastalar arasında fark yoktu. Sonuç olarak hepatit B virus klirensinde, G/A genotipinin etkili olabileceği, G/G genotipine sahip olmanınsa HBV enfeksiyonun kronikleşmesinde etkili olabileceği düşünüldü.



## 6. SONUÇ

Kronik hepatit B enfeksiyonu, aşılama çalışmalarına rağmen, dünyada ve ülkemizde önemli sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Hastalık ilerlediğinde mortalitesi yüksek hepatosellüler karsinom ve karaciğer sirozu ile sonuçlanmaktadır.

Dünyada, genetik özelliklerin hepatit B enfeksiyonu ile ilişkisi gösterilmiş ancak Türkiye’ de bu konuda kısıtlı hasta sayısı ile çalışmalar yapılmıştır.

Hastalığa yakalanmada genetik riskleri bilmenin, alınacak tedbirleri yönlendirmede önemli olduğunu düşünmekteyiz. Bu çalışmada, hastalığın patogeneğinde etkili olduğu bilinen sitokinlerden TNF- $\alpha$  308’ in G/A ve G/G gen polimorfizmleri değerlendirildi. G/G genotipine sahip olmanın, hepatit B virüs enfeksiyonunun kronikleşmesinde risk faktörü olabileceğini, G/A genotipine sahip olmanın HBV enfeksiyonundan iyileşmede olumlu bir faktör olabileceğini gösterdik.

Daha fazla hasta sayısı ile yapılacak çalışmalarla desteklenirse, TNF- $\alpha$  308 gen polimorfizminin kronik hepatit B sürecindeki etkilerinin daha iyi anlaşılabilceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Koziel MJ, Siddiqui A. Hepatitis B viruses and Hepatitis delta viruses. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia, Churchill Livingstone. 2005: 1864-90.
2. Lacanchy D. Hepatit B virüs epidemioloji, disease burden, treatment and current and emerging prevantion and controll measures. J.Viral Hepat 2004;11;97-107.
3. Park BK, Park YN, Ahn SH, Long term outcome of chronic hepatitis B based on histological grade and stage, 1 Gastroenterol Hepatol 2007;22:383-388.
4. Chen Y, Wei H, Gao B, Hu Z, Zheng S, Tian Z. Activation and function of hepatic NK cells in hepatitis B infection: an underinvestigated innate immune response. J Viral Hepat 2005;12:38-45.
5. Negoro K, Kinouchi Y, Hiwatashi N, Takahashi S, Takagi S, Satoh J, et al. Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 50 -flanking region of the tumor necrosis factor gene. Gastroenterology 1999;117:1062-8.
6. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of Hepatiti B virüs infection. Clin Microbiol Rev. 1999; 12: 351-66.
7. Ganem D, Schneider R. Hepadnaviridae: the virüses and theirreplication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2001:2923-70.
8. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virüs biology. Microbiol Mol Bio Rev 2000;64(1):51-68.
9. Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virüs nucleocapsid. Virüs Res 2004;106(2):199-209.
10. Viral Hepatit 2007. Tabak F, Tekeli E, Balık İ (Editorler). 1.Baskı, İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği. 2007; 96-101.
11. Lau JY, Wright TL: Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. Lancet 1993; 342:1335-40.

12. Kıyan M. Hepatit B Virüsü. Tekeli E, Balık İ (editörler). Viral Hepatit 2003. 1. Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği. 2003: 86-120.
13. Robinson WS: Hepadnaviridae and Their Replication. Fields BN, Knipe DM (eds): *Fundamental Virology*. 2<sup>nd</sup> ed. Lippincott, Raven Press Ltd, 1991: 989-1201.
14. Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying hepatitis B virüs genotypes. *Intervirology*. 2003; 46: 329-38.
15. Odemuyiwa SO, Mulders MN, Oyedele OI, Ola SO, Odaibo GN, Olaleye DO, Muller CP. Phylogenetic analysis of new hepatitis B virüs isolates from Nigeria supports endemicity of genotype E in West Africa. *J Med Virol*. 2001; 65: 463-9.
16. Tong CY. Genetic variations of hepatitis B virüs. *Curr Opin Infect Dis*. 2000;13: 481-7.
17. Özdemir FT, Duman D, Ertem D, et al. Determination of hepatitis B genotypes in patients with chronic hepatitis B virüs infection in Turkey. *Turk J Gastroenterol* 2005; 16 183-7.
18. Leblebicioglu H, Eroglu C; Members of the Hepatitis Study Group. Acute hepatitis B virüs infection in Turkey: epidemiology and genotype distribution. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10: 537-41.
19. Fares MA, E.C. Holmes EC. A revised evolutionary history of hepatitis B virüs (HBV). *J Mol Evol* 2002; 54: 807-14.
20. Hannoun C, Horal P, Lindh M. Long-term mutation rates in the hepatitis B virüs genome. *J Gen Virol* 2000; 81: 75-83.
21. Knipe DM, Howley PM, eds. *Hepadnaviridae: The virüses and their replication*. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott- Raven; 2001: 2923-70.
22. Sheldon J, Rodes B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. Mutations affecting the replication capacity of hepatitis B virüs. *J Viral Hepat* 2006; 13: 427-434.
23. Vyas GN, Yen TSB Hepatitis B virüs-Biology, pathogenesis, epidemiyology, clinical description and diagnosis. In: Specter S. *Viral Hepatitis-Diagnosis, therapy and prevention*. New Jersey: Humana Pres 1999: 35.

24. Ahmad A, Alvarez F. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HBV-induced hepatitis. *J. Leuk* 2004; 76:743-48.
25. Rehermann B, Nascimben M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5: 215-29.
26. Carayannopoulos LN, Recognition of infected cells by natural killer cells, *Curr Opin Immunol* 2004; 16:26.
27. Fisicaro P, Valdatta C, Massari M. Antiviral intrahepatic T cell responses can be blocking programmed death-1 pathway in CHV, *gastroenterology* 2010 138,862-693
28. He Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathology. *Springer Semin Immunopathol* 1995; 17:261-8129.
29. Ferrari C, Chisari FV, Fiaccadori F. The cellular immune response to hepatitis B virus infection. In: *Viral hepatitis A to F: an update*. Chicago: American Association for the Study of Liver Diseases, 1994).
30. William M. Lee, M.D. Hepatitis virus infection. *N. Engl J Med.* Volume 337; Number 24:1733-45 1997
31. Guidotti LG, Chisari FV. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol* 1996; 8:478-83).
32. *Viral Hepatitis 2013* Tabak F, Tosun S (eds). *Viral Hepatitis Savaşım Derneği, Medikal Sağlık Yayıncılık İstanbul* 2013, 36-38.
33. Sunbul M, Leblebicioglu H. Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. *World J gastroenterol* 2005; 11: 1976-80.
34. Özbilge H., Ulukanlıgil M, Taşçı S, Aslan G. Değişik gruplarda hepatit B seroprevalansı. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg.* 2000; (30): 46-8.
35. Yalcin K, Degertekin H, Bahcecioglu IH, Demir A, Aladag M, Yildirim B, Horasanli S, Ciftci S, Badur S. Hepatitis B virus genotype D prevails in patients with persistently elevated or normal ALT levels in Turkey. *Infection* 2004; 32: 24-29.
36. Bozdayi G, Türkyilmaz AR, Idilman R, Karatayli E, Rota S, Yurdaydin C, Bozdayi AM. Complete genome sequence and phylogenetic analysis hepatitis B virus

isolated from turkishpatients with chroronc HBV infection. *J Med Virol* 2005; 76: 476-81.

37. Mast EE, Margolis HS, Fiore AE, et al. A comprehensive immünization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immünization Practices (ACIP) part 1: immünization of infants, children, andadolescents. *MMWR Recomm Rep* 2005; 54: 1-31.

38. Koff RS. Viral Hepatitis. In: Schiff L and Schiff ER, eds. *Diseases of the Liver*: Philadelphia, JB Lippincott Company, 1993: 492-577.

39. Balcıoğlu İ, Özdemir S. Kronik hepatitli hastalarda nöropsikiatrik bulgular. *Viral Hepatit* 2005. Ankara, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2005; 76-82.

40. Foster GR, Goldin RD, Thomas HC. Chronic hepatitis C virüs infection causes a significant reduction in quality of life in the absence of cirrhosis. *Hepatology* 1998; 27: 209-12.

41. Lok AS, McMahon BJ: Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007;45:507-39.

42. Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia, Churchill Livingstone. 2005: 1426-41.

43. Chang MH. Natural history of hepatitis B İnfection İn children. *J Gastroenteroi Hepatol* 2000; 15 (Suppl): E1ö-9.

44. Tassopoulos NC, Papaevangelou GJ, Sjogren MH, Kara-yannis AR, Gerin JL, Purcell RH. Natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in Greek adults, *Gastroenterology* 1987;92:1844-1850.

45. Ribeiro RM, Lo A, Perelson AS. Dynamics of hepatitis B virüs infection. *Microbes infect*. 2002;4:829-835.

46. McMahon BJ, Alivard WL, Hail DB, et al, Acute hepatitis B virüs infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsecjuent development of the carrier state. *infect Dis*. 1985; 151: 599-603.

47. Wright TL, Mamish D, Combs C, et al, Hepatitis B virüs and apparent fulminant non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1992; 339; 952-955.

48. Chang MH, Hwang LY, Hsu HC, et al. Prospective study of asymptomatic HBsAg carrier children infected in the perinatal period: Clinical and liver histologic studies. *Hepatology* 1988; 8:374.
49. Lok AS, Lai CL. A longitudinal follow-up of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive Chinese children. *Hepatology* 1988; 5:11.
50. Chang MH, Hsu HY, Hsu HC, et al. The significance of spontaneous hepatitis e antigen sero-conversion in childhood: with special emphasis on the clearance of hepatitis e antigen before 3 years of age. *Hepatology* 1995;22:1387-92.
51. Chu CM, Hung SJ, Lin J, Tai DI, Liaw YF. Natural history of hepatitis B e antigen to antibody seroconversion in patients with normal serum aminotransferase levels. *Am J Med* 2004; 116: 829-34.
52. Tsai SL, Chen PJ, Lai MY, Yang PM, Sung JL, Huang JH, et al. Acute exacerbations of chronic type B hepatitis are accompanied by increased T cell responses to hepatitis B core and e antigens: implications for hepatitis B e antigen seroconversion. *J Clin Invest* 1992; 89: 87-96.
53. Sheen IS, Liaw YF, Tai DI, Chu CM. Hepatic decompensation associated with hepatitis B e antigen clearance in chronic type B hepatitis. *Gastroenterology* 1985; 89: 732-5.
54. Liaw YF, Leung N, Guan R et al: Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2005 update. *Liver Int* 2005; 25: 472-89.
55. Marcellin P, Lau GKK, Bonino F et al: Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HbeAg negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004; 351: 1206-17.
56. Lok AS, Lai CL. Acute exacerbations in Chinese patients with chronic hepatitis B virüs infection. Incidence, predisposing factors and etyology. *J Hepatol* 1990; 10: 29-34.
57. Alward, WL, McMahan, BJ, Hall, DB, et al. The long-term serological course of asymptomatic hepatitis B virüs carriers and the development of primary hepatocellular carcinoma. *J Infect Dis* 1985; 151: 604.

58. Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34: 617-24.
59. Lok AS, Liang RH, Chiu EK, Wong KL, Chan TK, Todd D. Reactivation of hepatitis B virüs replication in patients receiving cytotoxic therapy: report of a prospective study. *Gastroenterology* 1991; 100: 182-8.
60. Lok ASF, Lai CL, Wu PC, et al. Spontaneous hepatitis B e antigen to antibody seroconversion and reversion in Chinese patients with chronic hepatitis B virüs infection. *Gastroenterology* 1987; 92: 1839-1843.
61. McMahon BJ, Holck P, Bulkow L, Snowball M. Alaska Natives chronically infected with hepatitis B virüs. *Ann Intern Med* 2001; 135: 759-768.
62. Manno M, Camma C, Schepis F, Bassi F, Gelmini R, Giannini F, et al. Natural history of chronic HBV carriers in northern Italy: morbidity and mortality after 30 years. *Gastroenterology* 2004; 127: 756-63.
63. Maddrey WC. Hepatitis B: an important public health issue. *J Med Virol* 2000; 361: 2.
64. Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, Kuo E, You S L, et al. Viral load not serum ALT is the primary predictor of progression to cirrhosis in persons chronically infected with HBV: results from a long-term prospective study. *J Hepatol* 2005; 42 (Suppl): 180.
65. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118: 554-9.
66. Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, et al. Influence of hepatitis B virüs genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology*. 2003; 37: 19-26.
67. Bilgiç A, Özaçar T. Hepatit B virüs, (Ed) Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M . *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri. 2002; 1350-70.

68. Yalçın K, Değertekin H. Akut Viral Hepatitler Ankara. Türk Gastroenteroloji Vakfı. 2002; 467- 77.
69. Türk Karaciğer Araştırmaları Derneği; Kronik B Hepatiti Tanı, Yaklaşım, Tedavi, Takip Kılavuzu 2007.
70. Anna S. F. Lok and Brian J. McMahon. AASLD Practice Guidelines Chronic Hepatitis B: Update 2009.
71. Viral Hepatit 2013 Tabak F, Tosun S (Ed) 1. Baskı İstanbul 2013, 267-283
72. Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B. Journal of Hepatology 2009; 50: 1-16.
73. Viral Hepatitle Savaşım Derneği; 2008 HBV Konsensus Raporu. [www.vhsd.org/docs/VHSD Konsensus HBV 2008](http://www.vhsd.org/docs/VHSD_Konsensus_HBV_2008).
74. Sherman M, Shafran S, Burak K, et al. Management of chronic hepatitis C: consensus guidelines. Can J Gastroenterol 2007; 21 (SupplC): 25-34.
75. Mert A. İnaktif HBsAg Taşıyıcılığı. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (editörler). Viral Hepatit 2007 Kitabı, s:48-59.
76. Lok AS, Heathcote EJ, Hooghiaghe JH. Management of hepatitis B: 2000 summary of a workshop. Gastroenterology 2001; 120; 1828-5.
77. Franchis R, Meyce G, Vecchi M, Tatarella M, Colombici M, Del Ninno E, Rumi MG, Donato MF and Ronchi G, The Natural History of Asymptomatic Hepatitis B Surface Antigen Carriers. Ann Intern Med 1993; 118:191-4.
78. Ikeda K, Arase Y, Saitoh S, Kobayashi M, Someya T, Ho-saka T, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Suzuki F, Kumada H. Long-term Outcome of HBV Carriers with Negative HBe antigen and Normal Aminotransferase. Am J Med 2006; 119:977-85.
79. Caccioia I, Spatari G, Pollicino T, Costantino L, Zimbaro G, Brancateili S, Fcnga C, Caccamo G, Scjuadrino G, Rai-mondo G- Virological profiles in hepatitis B virüs inaktif ve carriers; monthly evaluation in 1-year follow-up study. Uver International 2005; 25: 555-563.
80. Mistik R. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (editörler), Türkiye'de Viral Hepatit Epidemiyolojisi-Yaymların İrdelenmesi Viral Hepatit 2007 Kitabı. s9-50.



81. Tassopoulos NC, Papaevangelou GJ, Sjögren MH, et al.; Natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in Greek adults. *Gastroenterology* 1987; 92.
82. Hsu YS, Chien RN, Yeh CT, Sheen IS, Chiou HY, Chu CM, et al Longterm outcome after spontaneous HBeAg sero-conversion in patients with chronic hepatitis B, *Hepatology* 2002,-35:1522-7.
83. Shindo M, Hamada K, Koya S, Sokawa Y, Okuno T. The clinical significance of core promoter and precore mutations during the natural course and interferon therapy in patients with chronic hepatitis B. *Am j Gastroenteroi* 1999; 94:237-45.
84. Sarin SK, Kumar M, Epidemiology, Screening, and Natural History of Chronic Hepatitis B Infection, Shetty K, Wu GY (eds). *Chronic Viral Hepatitis Diagnosis and Therapeutics*, New York: Humana Press, 2009:185-24.
85. Kumar M, Sarin SK, Hissar S, Pande C, Sakhuja P, Sharma BC, Chauhan R, Bose S. Virologic and histologic features of chronic hepatitis B virus-infected asymptomatic patients with persistently normal ALT. *Gastroenterology* 2008;134(5):1376-84-8.
86. Sharma SK, Saini N, Chwla Y. Hepatitis B Virus: Inactive carriers. *Virol J* 2005;2:82.
87. Pelizzari M, Motta M, Cariani E, Turconi P, Borlenghi E, Rossi G. Frequency of hepatitis B virus mutant in asymptomatic hepatitis B virus carriers receiving prophylactic lamivudine during chemotherapy for hematologic malignancies. *The Hematology Journal* 2004; 5:325-328.
88. Chu CM, Liaw YF, HBsAg Seroclearance in Asymptomatic Carriers of High Endemic Areas; Appreciably High Rates During a Long-Term Follow-Up. *Hepatology* 2007; 45-47.
89. Barbara J.A., Van ostade X., Lopez A. Tumour-necrosis factor-alpha (TNFalpha):the good, the bad and potentially very effective. *Immunol Cell Biol*, 1996; 434-443.

90. Tracey K.J., Beutler B., Lowry S.F., Merryweather J., et al Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*, 1989 : 470-474.
91. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002. 13, 135-141.
92. Chen G, Goeddel DV. TNF-RI signaling a beautiful pathway. *Science* 2002 296:1634-16.
93. Tartaglia L.A. ve Goeddel D.V. Two TNF receptors. *Immunol Today*, 1992 13-17.
94. Hollegaard M.V., Bidwell J.L. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. *Genes Immun*, 2006-7(4), 269-270.
95. Aggarwal BB, Reddy S. Tumor necrosis factor (TNF). *Guidebook to Cytokines and Their Receptors*. (Ed. Nicola NA), Sambrook & Toozee Publication-Oxford University Press, Oxford, 1994, 103–104.
96. R. F. Schwabe and D. A. Brenner, “Mechanisms of liver injury. TNF- $\alpha$ -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways,” *American Journal of Physiology—Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2006 vol. 290, no. 4, 583–589.
97. Guidotti, L.G, Rochford, R., Chung, J., Shapiro, M., Purcell, R. and Chisari, F.V. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science*, 1999, 284, 825-829.
98. Tsui, L.V., Guidotti, L.G., Ishikawa, T., Chisari, F.V., Posttranscriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995,2, 12398–12402.
99. A.Mohamadkhani, K.Sayemiri, R.Ghanbari, E.Elahi, H.Poustchi and G.Montazeri, “The inverse association of serum HBVDNA level with HDL and adiponectin in chronic hepatitis B infection,” *Virology Journal*, 2010, vol.7, p.228.
100. R.F.Schwabe and D.A.Brenner, “Mechanisms of liver injury TNF $\alpha$  induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways,” *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2006 ,vol. 290, 583–589.

101. E. Lara-Pezzi, P. L. Majano, M. Go' mez-Gonzalo et al., "The hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor  $\alpha$  gene expression in hepatocytes," *Hepatology*, 1998 vol. 28, no. 4, 1013–1021.
102. Kotnis A., Sarin R., Mulherkar R. Genotype, phenotype and cancer: Role of low penetrance genes and environment in tumour susceptibility. *J Biosci*, 2005, 93-102.
103. Mehriani-Shai R., Reichardt J.K.. A renaissance of "biochemical genetics"? SNPs, haplotypes, function and complex diseases. *Mol Genet Metab*, 2004, 83, 47.
104. Don Haeng L. ve Ki-Baik H. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 22, 1465-1472.
105. Herrington D.M. Role of estrogen receptor in pharmacogenetics of estrogen action. *Curr Opin Lipidol*, 2003 14, 145-150.
106. Tempfer C.B., Hefler L.A., Schneeberger C., Huber J.C. How valid is single nucleotide polymorphism (SNP) diagnosis for the individual risk assessment of breast cancer? *Gynecol Endocrinol*, 2006 ,22(3),155-159.
107. Howell W.M. ve Rose-Zerilli M.J. Cytokine polymorphisms, cancer susceptibility and prognosis. *J Nutr*, 137, 2007 194-199.
108. Aggarwal B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double edged sword. *Nat Rev Immunol*, 3, 2003,745–756.
109. Pennica D., Nedwin G., Hayflick J., Seeburg P.H., Derynck R., Palladino M.A. Kohr W.J., Aggarwal B.B., Goeddel D.V. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. 1984, *Nature*, 312, 724.
110. Kamizono S, Hiromatsu Y, Seki N, Bednarczuk, Matsumoto H, Kimura A et al. A polymorphism of the 5' flanking region of tumour necrosis factor  $\alpha$  gene is associated with thyroid-associated ophthalmopathy in Japanese. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000; 52:759–64.
111. Posch P.E., Cruz I., Bradshaw D., Medhekar B.A. Novel polymorphisms and the definition of promoter 'alleles' of the tumour necrosis factor and lymphotoxin  $\alpha$  loci: inclusion in HLA haplotypes. *Genes Immun*, 2003, 4, 547-558.

112. Balog A., Klausz G., Gál J., Molnár T., Nagy F., Ocsovszky I., Gyulai Z., Mándi Y. Investigation of the prognostic value of TNF-alpha gene polymorphism among patients treated with infliximab, and the effects of infliximab therapy on TNF-alpha production and apoptosis. *Pathobiology*, 2004, 274-28.
113. M.C.Warle', A.Farhan, H.J.Metselaaretal., "Are cytokine gene polymorphism related to in vitro cytokine production profiles Liver Transplantation, 2002, vol.9, no.2.
114. Wilson A.G., di Giovine F.S., Blakemore A.I.F., Duff G.W. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF-) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet*, 1992 1(5): 353.
115. Cabrera M., Shaw M.A., Sharples C., Williams H., Castes M., Convit J., Blackwell J.M. Polymorphism in tumor necrosis factor gene associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*, 1995 182, 1259-1264.
116. McGuire W., Hill A.V., Moffatt M.F., Cookson W.O. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet*, 6, 1997 551-554.
117. Allsopp C.E., Greenwood B.M., Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*, 371, 508-510.
118. Demeter J., Porzolt F., Ramisch S., Schmidt D., Schmid M., Messer G. Polymorphism of tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 9, 1997; 107-112.
119. R.Gonzalez Amaro, C.Garcia Monzon, L.Garcia Buey et al., "Induction of tumor necrosis factor  $\alpha$  production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis," *Journal of Experimental Medicine*, 1994 vol.179 841-848.
120. M.Koulentaki, G.Notas, E.Petinaki et al., "Nitric oxide and proinflammatory cytokines in acute hepatitis B," *European Journal of Internal Medicine*, 2004 vol.15, no.1, 35-38.
121. Kroeger, K.M., Carville, K.S., Abraham, L.J., The 308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. 1998, *Mol. Immunol.* 34, 391-399.

122. Cipriano, C, Caruso, C, Lio, D., Giacconi, R., Malavolta, M., Muti, E., Gasparini, N, Franceschi, C, Mocchegiani, E., The 308G/A polymorphism of TNF- $\alpha$  influences immunological parameters in old subjects affected by infectious diseases. *Int. J. Immunogenet.* 2005,32, 13.
123. Y.Y.Li, "Tumor necrosis factor alphas 308 alpha gene polymorphism and essential hypertension:a metaanalysis involving 224 participants" *PLoS ONE* 2012 vol.7, no.4, ArticleID 35408.
124. L.Y.Wu, Y.Zhou, C.Qin, and B.L.Hu, "The effector TNF $\alpha$ , Fc $\gamma$  and CD1 polymorphisms on Guillain-Barre Syndrome risk:evidences from a meta-analysis," *Journal of Neuroimmunology*, 2012 vol.243, no.1-2, 18–24.
125. Q. Wang, P.Zhan, L.X. Qiu, Q. Qian, and L.K.Yu, "TNF-308 Gene polymorphism and tuberculosis susceptibility a metaanalysis involving 18 studies," *Molecular Biology Reports*, 2012 ,vol.39, no.4, 3393-3400.
126. Y. H. Lee, S. J. Choi, J. D. Ji, and G.G. Song, "CTLA-4 and TNF- $\alpha$  promoter-308A/G polymorphisms and ANCA-associated vasculitis susceptibility:a metaanalysis," *Molecular Biology Reports*, 2012 vol.39, no.1, 319–326.
127. R.F.Schwabe and D.A.Brenner, "Mechanisms of liver injury. TNF- $\alpha$ -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways," *American Journal of Physiology—Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2006 vol. 290, no.4, 583–589
128. Guidotti, L.G, Rochford, R., Chung, J., Shapiro, M., Purcell, R. and Chisari, F.V Viral clearance with out destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science*, 1999, 284, 825-829.
129. Tsui, L.V., Guidotti, L.G., Ishikawa, T., Chisari, F.V., Posttranscriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995, 12398–12402.
130. Esteve, M., Saro, C, Gonzalez-Huix, F., Suarez, F., Forne, M., Viver, J.M., Chronic hepatitis B reactivation following infliximab therapy in Crohn's disease patients: need for primary prophylaxis, 2004 , *Gut* 53, 1363-1365.

131. K.M.Kroeger, K.S.Carville, and L.J.Abraham, "The 308 tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter polymorphism effects transcription," *Molecular Immunology*, 1997 vol.34, no.5, 391–399.
132. G.Wilson, J.A.Symons, T.L.McDowell, H.O.Mc Devitt, and G.W.Duff, "Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter on transcriptional activation.
133. Guoyu Zhang, Zhu Lia, Qunying Hana, Na Lia, Altered TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  levels associated with PD1 but not TNFA polymorphisms in patients with chronic HBV infection *Infection, Genetics and Evolution* Volume 11, Issue 7, October 2011, 1624–1630.
134. S.Miyazoe, K.Hamasaki, K.Nakataetal., "Influence of interleukin 10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitisB virus," *American Journal of Gastroenterology*, vol.97, no.8,2002, 2086–2092,
135. G.A.Niro, R.Fontana, D.Gioffredaetal., "Tumor necrosis factor gene polymorphisms and clearance or progression of hepatitisB virus infection," *Liver International*, 2005 vol.25, no.6, 1175–1181.
136. H.Somi, L. Najafi, B.Noori Netal., "Tumornecrosis factor alphas gene promoter polymorphism in Iranian patients with chronic hepatitisB," *Indian Journal of Gastroenterology*, 2006, vol.25, no.1, pp.14–15.
137. Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Buschenfeld K, Rittner C. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection. *J Med Virol* 1998;54:173-7.
138. Simone R.S. Condeab, Rosimar N.M. Feitosaa Felipe Bonfim Freitas a Renata B. Hermes Association of cytokine gene polymorphisms and serum concentrations with the outcome of chronic hepatitis B *Cytokine* 61, 2013, 940–944.
139. A.Baena, J.Y. Leung, A.D.Sullivanetal., "TNF alfa promoter single nucleotide polymorphisms are markers of human ancestry," *Genes and Immunity*, 2002 vol.3, 482-485.

140. Y.J.Kim, H.S.Lee, J.H.Yoonetal., "Association of TNF $\alpha$  promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis-B virusinfection," *Human Molecular Genetics*, 2003, vol.12, no.19, 2541–2546.
141. Jianhua Xu a,b,1, Sanjiao Zhang a,1, Zhaofeng Zhang b, TNF-alpha promoter region polymorphisms affect HBV virus clearance insouthern Chinese Clinica Chimica, 2013; 90-92.
142. J.Y.Cheong, S.W.Cho, I.L.Hwangetal., "Association between chronic hepatitisB virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor  $\alpha$  gene promoterpolymorphisms," *Journal of Gastroenterologyand Hepatology*, 2006, vol.21, no.7, 1163–1169.
143. M.H.Zheng, L.X.Qiu, Y.N.Xin, H.F.Pan, K.Q.Shi, and Y.P.Chen, "Tumor necrosis factor- $\alpha$ -308A allele may have aprotective effect for chronic hepatitis B virus infectionin Mongoloid populations," *International Journal of Infectious Diseases*,2010, vol.14, no.7, 580–585.
144. B.Basturk, Z.Karasu, M.Kilic, S.Ulukaya, S.Boyacioglu, and B.Oral, "Association of TNF- $\alpha$  308 polymorphism with the out come of hepatitis Bvirus infection in Turkey," *Infection, Genetics and Evolution*, 2008, vol.8, no.1, 20–25.