ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Ersin AKGÖLLÜ

HLA GENİ RS3077 VE RS9277535 POLİMORFİZMLERİ İLE KRONİK HEPATİT B VİRÜS ENFEKSİYONU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2016

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HLA GENİ RS3077 VE RS9277535 POLİMORFİZMLERİ İLE KRONİK HEPATİT B VİRÜS ENFEKSİYONU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Ersin AKGÖLLÜ

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez 17/02/2016 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

…….....	……	…..….....
Prof. Dr. Ramazan BİLGİN	Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL	Prof. Dr. Lülüfer TAMER
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

...…….....	…….
Prof. Dr. Mustafa CANLI	Yrd. Doç. Dr. Yener TEKELİ
ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2013D16

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir. .

ÖZ

DOKTORA TEZİ

HLA GENİ RS3077 VE RS9277535 POLİMORFİZMLERİ İLE KRONİK HEPATİT B VİRÜS ENFEKSİYONU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Ersin AKGÖLLÜ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
Yıl: 2016, Sayfa: 105
Jüri : Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
: Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Lülüfer TAMER
: Prof. Dr. Mustafa CANLI
: Yrd. Doç. Dr. Yener TEKELİ

Hepatit B Virüs (HBV) enfeksiyonu dünya genelinde yaklaşık 350 milyon insanı etkilemektedir. Kronik hepatit B (KHB) taşıyıcılarının %10-15'inde karaciğer sirozu, karaciğer bozukluğu ve hepatoselüler kanser gelişebilmektedir. HLA genindeki varyantlar HLA mRNA ekspresyonunu ve antijen sunumunu etkilemektedir. Bu vaka-kontrol çalışmasında HLA rs3077 ve rs9277535 polimorfizmlerininin HBV enfeksiyonunun kronikleşmesindeki etkisi araştırılmıştır. 294 KHB'li hasta grubu ile 234 doğal bağışık kontrol grubu RT-PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon) yöntemi ile çalışılmıştır. HBV grubu ile kontrol grubu arasında rs9277535 alel sıklığı yönünden anlamlı bir fark bulunmuştur (P=0.05). Ayrıca AG haplotip bloğunun HBV'nin kronikleşmesine karşı koruyucu etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (P=0.003). Bu çalışma kontrol grubunun doğal bağışık bireylerden oluştuğu beyaz popülasyondaki ilk çalışmadır. Bu çalışmada HLA-DPB1 geni rs9277535 A alelinin özellikle erkeklerde majör bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir. Fakat rs3077 polimorfizminin anlamlı bir etkisi belirlenememiştir.

Anahtar Kelimeler: HLA polimorfizmi, rs3077, rs9277535, HBV klirensi

ABSTRACT

PhD THESIS

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN CHRONIC HEPATITIS B VIRUS INFECTION WITH HLA GENE RS3077 AND RS9277535 POLYMORPHISMS

Ersin AKGÖLLÜ

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF CUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
Year: 2016, Pages: 105
Jury : Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
: Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Lülüfer TAMER
: Prof. Dr. Mustafa CANLI
: Asst. Prof. Dr. Yener TEKELİ

Hepatitis B virus (HBV) affects approximately 350 million people worldwide. 10–15% of chronic carriers develop liver cirrhosis (LC), liver failure and hepatocellular carcinoma (HCC). Genetic variants in HLA genes influence HLA mRNA expression which might also affect antigen presentation. We evaluated the association between HLA gene polymorphisms and the risk for persistent HBV infection. HLA gene polymorphisms were investigated in a case–control study of 294 chronic HBV carriers and 234 persons with HBV natural clearance by using a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). There was a significant association between the control and the case groups for rs9277535 allele frequencies (P=0.05), but not significant for rs3077. Additionally, the AG haplotype block showed a protective effect against the risk of persistent HBV infection (P=0.003). Our results demonstrate for the first time that HLA-DPB1 gene rs9277535 A allele, especially in male, has a major effect on the risk of persistent HBV infection, but not for rs3077.

Key Words: HLA polymorphism, rs3077, rs9277535, HBV clearance.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca çalışmalarımın her aşamasında her türlü desteğini gördüğüm, insanlara yaklaşımını, bilimsel yönlerini ve kültürel birikimlerini kendime örnek aldığım çok kıymetli danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Ramazan BİLGİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmamda bana her türlü desteği veren, bilimsel ufkumu açan Ç.Ü Tıp Fakültesi Gastroenteroloji BD'dan Prof. Dr. Hikmet AKKIZ hocama,

Çalışmalarımda bana her zaman manevi destek olan Ç.Ü Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü/Biyokimya ABD'dan Sayın Hocalarım, Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL'e, Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e, Doç. Dr. Deniz YILDIM'a ve Öğr. Gör. Dr. Dilek ALAGÖZ'e,

Öğrenim süresince yanımda olan, destek veren ve görmekten mutluluk duyduğum Biyokimya Laboratuvarından değerli arkadaşlarım Dr. Yakup AKKOÇ'a, Arş. Gör. Ali TOPRAK'a ve Öğr. Gör Ahmet Umay'a

Ç.Ü Tıp Fakültesi Gastroenteroloji BD'dan Dr. Yakup ÜLGER'e, Dr. Berrin YALINBAŞ KAYA'ya ve değerli gastroenteroloji çalışanlarına,

Beni her zaman seven ve destekleyen varlığını hep yanımda hissettiğim değerli eşim Sevgi AKGÖLLÜ'ye,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmama maddi olarak destek sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim**.**

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİN VI
ŞEKİLLER DİZİN VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR X
1. GİRİŞ 1
1.1. Bağışıklık (İmmün) Sistemi ve İşleyiş Mekanizması 6
1.1.1. Bağışıklık Sistemi İki Bölümden Oluşur……... ……7
1.1.2. Karaciğerin HBV'ye İmmün Yanıtı 15
1.1.3. Hepati B Virüsüne Humoral Yanıt 18
1.2. Hepati B Virüs Enfeksiyonu 20
1.2.1. Hepati B Virüsünün Epidemiyolojisi 21
1.2.2. Kronik HBV Enfeksiyonunun (KHB) Doğal Seyri. 24
1.2.3. Kronik HBV (KHB) Enfeksiyonunun Fazları 25
1.2.4. HBV'nin İmmün Sistemden Kaçması ve Kronikleşmesi 27
1.2.5. HBV'yi ve Hücresel Yolakları Etkileyen Karşılıklı Etkileşimler 29
1.2.6. HBV Enfeksiyonunun Tedavisi 30
1.2.6.1. Uygulanan Tedaviler 31
1.3. Majör Histokompatibilite Kompleksi (MHC) 34
1.3.1. İnsan Lökosit Antijeni Moleküllerinin Yapısı 36
1.3.2. HLA Moleküllerinin Antijen Sunumu 39
1.3.3. HLA Polimorfizmleri 42
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 45
2.1. HLA Polimorfizmi İle İlgili Yapılan Çalışmalar 45
3. MATERYAL VE METOT 51
3.1. Materyal 51
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar 51

3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler 51
3.1.3. Hasta ve Kontrol Grubu 52
3.2. Metot 53
3.2.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu 53
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 54
3.2.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) 57
3.2.4. Deneyde Kullanılan Hibridizasyon Problarının Çalışma Prensibi 59
3.2.5. HLA rs3077 Bölgesi ile Primerler ve Hibridizasyon Probları 60
3.2.6. HLA rs9277535 Bölgesi ile Primerler ve Hibridizasyon Probları 61
3.2.7. HLA Geni Rs3077 ve Rs9277535 Polimorfizmlerinin Real Time PCR Yöntemi ile Genotiplendirilmesi 62
3.2.7.1. HLA-DPA1 Rs3077 Polimorfizmi için Erime Eğrisi Pikleri .. 63
3.2.7.2. HLA-DPB1 Rs9277535 Polimorfizmi için Erime Eğrisi Pikleri 65
3.2.8. İstatistiksel analizler 66
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 67
4.1. Bulgular 67
4.2. Tartışma 76
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 81
5.1. Sonuçlar 81
5.2. Öneriler 82
KAYNAKLAR 85
ÖZGEÇMİŞ 105

ÇİZELGELER DİZİN **SAYFA**

Çizelge 1.1. Türkiye'nin Bazı Şehirlerindeki HBV Prevalansı 23
Çizelge 1.2. Türkiye'nin Bazı Şehirlerindeki HBV Prevalansı. 24
Çizelge 3.1. Kullanılan Kimyasallar için Uygulanan Deney Protokolü 62
Çizelge 3.2. Kullanılan RT-PCR Deney Protokolü 63
Çizelge 4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik ve Laboratuvar Özellikleri 68
Çizelge 4.2. KHB Grubu ile Kontrol Grubunun HLA-DPA1 rs3077 Polimorfizminin Alel ve Genotiplerinin Karşılaştırılması..... 69
Çizilge 4.3. KHB Grubu ile Kontrol Grubunun HLA-DPB1 rs9277535 Polimorfizminin Alel ve Genotiplerinin Karşılaştırılması..... 71
Çizilge 4.4. KHB Grubu ile Kontrol Grubundaki Erkeklerde ve Kadınlarda HLA-DPA1 rs3077 Polimorfizminin Alel ve Genotip Sıklığının Karşılaştırılması 73
Çizelge 4.5. KHB Grubu ile Kontrol Grubundaki Erkeklerde ve Kadınlarda HLA-DPB1 rs9277535 Polimorfizminin Alel ve Genotip Sıklığının Karşılaştırılması 75
Çizelge 4.6. KHB Grubu ile Kontrol Grubunun HLA rs3077 ve rs9277535 Polimorfizmlerinin Haplotip Sıklıklarının Karşılaştırılması 76

ŞEKİLLER DİZİN **SAYFA**

Şekil 1.1. Hepatit B Virüsünün Genomunun Yapısı ve Organizasyonu 2
Şekil 1.2. Hepatit B Virüsünün Yaşam Döngüsü..... 5
Şekil 1.3. HBV'ye İmmünolojik Yanıtta Farklı Hücre Sistemleri..... 16
Şekil 1.4. HBV'nin Dünyadaki Prevalansı 22
Şekil 1.5. HBV İnfeksiyonunun Fazları..... 25
Şekil 1.6. HLA Molekülünün Genomdaki Yeri ve Organizasyonu 35
Şekil 1.7. HLA Sınıf I Molekülünün Yapısı 37
Şekil 1.8. HLA Sınıf II Molekülünün Yapısı..... 38
Şekil 1.9. HLA Sınıf I ve Sınıf II Antijen Sunumu..... 41
Şekil 3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu..... 57
Şekil 3.2. Fret Teknolojisi ile Hibridizasyon Probu..... 59
Şekil 3.3. HLA-DPA1 Rs3077 Bölgesine Primerlerin ve Probların Bağlanması..... 61
Şekil 3.4. HLA-DPB1 Rs9277535 Bölgesine Primerlerin ve Probların Bağlanması..... 62
Şekil 3.5. Amplifikasyon (çoğalma) Eğrisi 63
Şekil 3.6. Rs3077 Homozigot GG Genotipinin Erime Piki 64
Şekil 3.7. Rs3077 Homozigot AA Genotipinin Erime Piki 64
Şekil 3.8. Rs3077 Heterozigot GA Genotipinin Erime Eğrisi 64
Şekil 3.9. Rs9277535 Homozigot AA Genotipinin Erime Piki 65
Şekil 3.10. Rs9277535 Homozigot GG Genotipinin Erime Piki 65
Şekil 3.11. Rs9277535 Heterozigot AG Genotipinin Erime Piki 66

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFP : Alfa fetoprotein
ALT : Alanin aminotransferaz
antiHBs : HBsAg antikoru
AST : Aspartat aminotransferaz
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu
CBC : Tam kan sayımı
cccDNA : Kovalent kapalı sirküler DNA
CTL : Sitotoksik T lenfosit
DNA : Deoksiribonükleik asit
DNMT : DNA metil transferaz
DR1 : Direk tekrar dizisi
ECDC : Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
ECM : Ekstrasellüler matriks
Enh : Enhansır
FRET : Floresans rezonans enerji transferi
GWAS : Tüm genom bağlantı çalışmaları
HAİ : Histolojik aktivite indeksi
HBcAg : HBV kor antijeni
HBeAg : Hepatit B e antijeni
HBsAg : HBV yüzey antijeni
HBV : Hepatit B Virüs
HBx : HBV X proteini
HCC : Hepatocellular carcinoma
HDL : High density lipoprotein
HLA : İnsan Lökosit Antijeni
HSP : Heat Shock Protein
IFN-γ : İnterferon gama
IL : İnterlökin
INR : Uluslararası normalleştirme oranı

JAK : Janus kinaz
KC : Karaciğer
KHB : Kronik hepatit B
KVY : Kalıcı virolojik yanıt
LC : Liver cirrhosis
LDL : Low density lipoprotein
MHC : Temel doku-uygunluğu bileşeni
MICA : MHC Class-II Endosomal Compartment
mRNA : Mesajcı RNA
NF-kB : Nükleer faktör kappa B
NK : Doğal öldürücü hücreler
NTCP : Sodyum-taurokolat kotransport polipeptit
NUC : Nükleoz(t)it analogları
PCR : Polimeraz zincir reaksiyon
PgRNA : Pregenomik RNA
PTZ : Protrombin zamanı
RNA : Ribonükleik asit
RcDNA : Relaxed circular DNA
RT-PCR : Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon
SNP : Tek nükleotit polimorfizmi
STAT : Sinyal ileticiler ve transkripsiyon aktivatörleri
TAP : Transporter Associated with Antigen Processing
TCR : T hücre reseptörü
Th : Yardımcı T hücreleri
TKAD : Türk Karaciğer Araştırma Derneği
TLR : Toll-like reseptör
TNF-α : Tümör nekroz faktör alfa

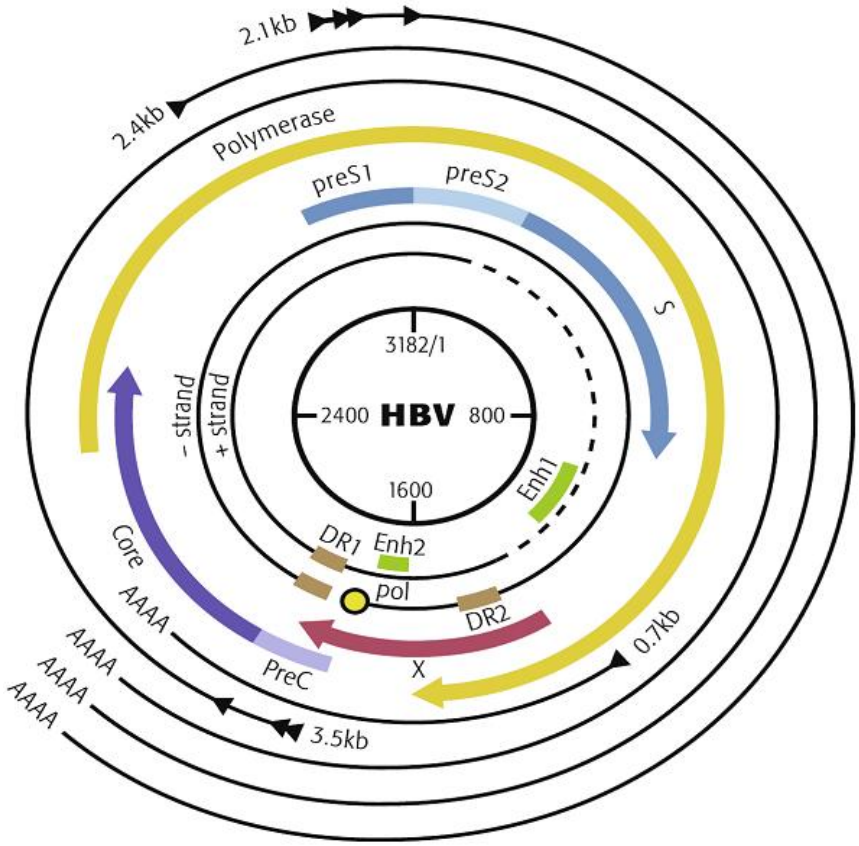
1. GİRİŞ

Hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonu tüm dünyada en önemli sağlık sorunlarından biri olup yaklaşık 2 milyar kişi virüsle enfektedir. Dünya genelinde yaklaşık 350 milyon kişi kronik olarak HBV ile enfektedir. Her yıl yaklaşık 1 milyon kişi HBV ile ilgili karaciğer hastalığından (dekompanse siroz veya HSK) kaybedilmektedir.(Evans, 1998; Lee, 1997). Dünyada yılda beş milyondan fazla akut hepatit B olgusu ortaya çıkmaktadır. Hastalığın karaciğerde yaratacağı hasar kişinin immün cevabına göre değişkenlik göstermektedir. HBV akut hastalık olarak başlayıp iyileşebilmekte ya da kronikleşebilmektedir. Kronik HBV gelişme riski hepatit B e antijeni (HBeAg) pozitif anneden yeni doğan bebeklerde % 90, 5 yaşın altında çocuklarda % 25-30 ve yetişkinlerde % 5 den daha azdır (Beasley ve ark., 1983; Coursaget ve ark., 1987). Ülkemizde yapılan çalışmalarda hepatit B prevalansının batıdan doğuya doğru gittikçe arttığı, Eskişehir, Antalya, Adana, Elazığ, Sivas ve Erzurum'da yüksek oranlarda bulunduğu, Diyarbakır'da HBsAg pozitiflik oranı % 10'lara ulaştığı bildirilmektedir (Karaaslan ve ark., 2009).

Hepatit B virüsü (HBV) çift-kılıflı partiküller olup, 40-42 mm çapında, dış kısmı üç adet zarf glikoproteinleri (yüzey proteinleri, HBsAg) ile kaplıdır (Dane ve ark., 1970; Ganem ve ark., 1991). Bu zarflı yapının içinde viral nükleokapsit vardır. Viral kapsit içinde kısmen çift sarmallı 3.2 kb'lık viral DNA ve reverse transkriptaz özelliğine sahip viral polimeraz bulunmaktadır. Viral polimeraz viral DNA'ların ve mRNA'ların sentezinde görev almaktadır (Robinson ve Lutwick, 1976). HBV farklı coğrafik bölgelerde çoklu viral genotiplere ve serotiplere sahiptir. HBV ile infekte hücreler viral lipoproteinlerin 2 farklı partikülünü üretirler. Bunlar 20 nm çapında küresel ve fibröz formdadır. Bu hepatit B yüzey antijenleri (HBsAg) zarf glikoproteinleri ve konakçanın lipidlerinden oluşmaktadır.(Kao, 2002; Robinson ve Lutwick, 1976).

HBV kısmen çift sarmallı DNA içermektedir, bunlardan tam sarmal olanı negatif iplik ve tamamlanmamış DNA sarmalı ise pozitif iplik olarak tanımlanmıştır. Viral genom 4 promotör, 2 enhansır bölge (Enh1, Enh2) ve 2 direk tekrar dizisi (DR1, DR2) içermektedir. Virüs replikasyonu süresince kısmen çift iplikli DNA

sarmalı (RC=relaxed circular DNA), kovalent kapalı sirküler DNA'ya (ccc DNA) tamamlanır. Bu aşamada polimeraz uzaklaştırılır ve hücresel proteinler kullanılır. Mekanizma tam olarak bilinmemektedir (Warner ve Locarnini, 2012; Nassal, 2008). cccDNA bir minikromozom görevi görür ve viral transkripsiyon için kalıp olarak kullanılarak viral mRNA'lar üretilir (3.5-2.4-2.1 ve 0.7 kb'lık). 3.5 kb'lık mRNA'dan pre-kor proteini olan HBeAg antijeni sentezlenmektedir (Warner ve Locarnini, 2012). 3.5 kb'dan daha kısa olan pregenomik RNA (PgRNA)'dan kor (HBcAg) ve polimeraz proteinleri sentezlenir. Ayrıca bu pregenomik RNA viral replikasyonda kalıp olarak kullanılır. 2.4 kb'lık mRNA'dan (pre-Sl mRNA) büyük yüzey antijeni (L), 2.1 kb'lık pre-S2 mRNA'dan orta (M) yüzey antijeni, S mRNA'dan ise küçük (S) yüzey antijeni ve 0.7 kb'lık mRNA'dan X proteini sentezlenir (Ganem, 1991; Robinson ve Lutwick, 1976; Warner ve Locarnini, 2012) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Hepatit B Virüsünün Genomunun Yapısı ve Organizasyonu (Gish ve ark., 2015)

HBV genomu 4 açık okuma parçasına (ORF) sahiptir. Genomun preS1/pre-S2 /S bölgelerinden 3 viral yüzey antijeni kodlanır. 24 kD'luk küçük yüzey proteini (S'den), (M) orta yüzey proteini (PreS2'den) ve büyük yüzey proteini (L) (PreS1'den). Küçük yüzey proteini (S-HBsAg) zarf proteinlerinin çoğunluğunu oluşturur. HBsAg (L) proteini virüsün konakça-hücre reseptörüne bağlanmasında ve virionların oluşturulmasında ve hücreden salınmasında önemli rol oynar (Walsh ve Locarnini, 2012).

PC (Pre-kor) / CP (kor) bölgeleri hepatit B'nin kor antijeni (HBcAg) ile e antijenini (HBeAg) kodlamaktadır. PC bölgesi bir sinyal dizisini kodlayarak HBeAg antijeninin Golgide işlenip salgılanmasını sağlar. HBeAg viral toplanmada (paketlenmede) rol almaz, konakçanın immün yanıtını düzenlemede rol oynar (Ganem ve ark., 1991; Warner ve Locarnini, 2012). PC bölgesi viral replikasyon için gerekli olmamasına rağmen, bu bölgede meydana gelen mutasyonlar HBeAg sentezine engel olur (Walsh ve Locarnini, 2012). HBcAg antijeni virionların kapsit ile paketlenmesinde, replikasyonun düzenlenmesinde ve yeni cccDNA'ların oluşturulması için kısmen çift iplikli DNA'nın çekirdeğe transportunun gerçekleştirilmesinde büyük rol oynar. Ayrıca yeni sentezlenen virüslerin olgunlaşmasına ve salgılanmasına katkıda bulunur. HBcAg proteini ayrıca HBV cccDNA'nın CpG (sitozin-fosfat-guanin) adalarına bağlanarak cccDNA'yı epigenetik işlemlere açık hale getirir (Bock ve ark., 1996; Lewellyn ve Loeb, 2011; Scaglioni ve ark., 1997; Guo ve ark., 2011).

Polimeraz kodlama bölgesinden multifonksiyonel enzim olan viral polimeraz sentezlenir. Viral polimeraz DNA polimeraz, revers transkriptaz ve RNaz H aktivitesine sahiptir. Viral polimeraz enzimi DNA sentezini ve oluşan RNA'ların kapsitlenmesinde rol oynar (Soussan ve ark., 2000).

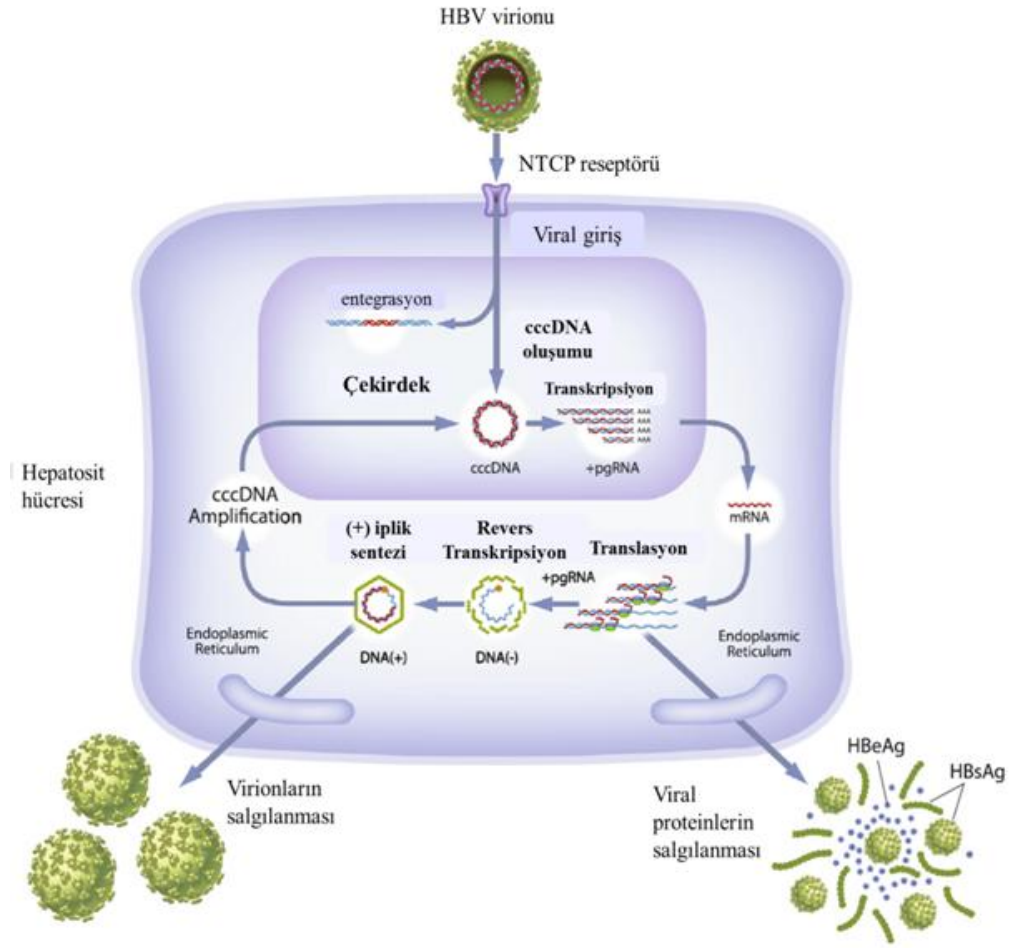
X geni açık okuma çerçevesinden viral X proteini (HBx) kodlanmaktadır. HBx proteini konakça-hücre sinyal iletimini düzenler ve direk veya indirek olarak konağın ve viral genlerin ekspresyonunu etkilemektedir (Tang ve ark., 2006). X proteini verimli bir *in vivo* replikasyonu ve virüsün yayılması için gereklidir. X proteini viral enfeksiyonun kronikleşmesini infekte hepatositlerde immün-aracılıklı apopitozisi önleyerek gerçekleştirmektedir. Ayrıca fibrozis oluşumunu ve

devamlılığını sağlayarak siroz zemini hazırlamakta ve ekstrasellüler matriksin (ECM) tekrardan şekillenmesini sağlayarak tümör gelişim sürecine katkıda bulunmaktadır (Feitelson ve ark., 2009). HBV DNA'nın kısmen veya tamamen konakça genomuna entegre olması karaciğer kanserinin (HCC) gelişmesine neden olmaktadır. HBV DNA'nın entegre olma mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Saitta ve ark., 2015; Tarocchi ve ark., 2014).

Hepatit B Virüsünün Hepatosit Hücresine Girişi: Hepatit B virüsü sodyum-taurokolat kotransport polipeptit (NTCP: sodium-taurocholate cotransporting polypeptide) reseptör aracılığı ile hepatosite girerek hepatosit sitoplazmasında viral kılıfından kurtulur (Şekil 1.2). Kor partikülleri hepatosit çekirdeğine geçerek viral DNA serbest hale gelir ve kovalent kapalı sirküler (cccDNA) DNA'ya dönüştürülür (Yan ve ark., 2015). Ayrıca viral DNA histon ve nonhiston proteinlerle etkileşerek konakçanın kromatinine girebilmektedir. cccDNA konakça genomuna entegre olmaz. HBV DNA dizileri enfekte hepatositlerde entegre olsa bile özellikle DNA hasarının varlığında ve hücre döngüsünde bu olay tipik olarak her zaman olan bir şey değildir (Petersen ve ark., 1998; Mason ve ark., 2005). cccDNA konakçanın RNA polimeraz II için transkripsiyonel kalıp olarak hizmet eder. Bu enzim 5 önemli RNA transkripti üretir. Bunlardan 2'si genomik ve 3'ü subgenomik RNA transkriptidir. Sitoplazmada pregenomik RNA'dan (pgRNA) kor proteini ile viral polimeraz sentezlenir. Subgenomik RNA'dan 3 zarf proteini ile X proteini sentezlenir. Daha sonra nükleokapsitler sitozolde genomik RNA ve viral polimeraz ile birlikte yeni virionları oluşturmak üzere birleşirler (Gish ve ark., 2015).

Kapsitlenen viral RNA'dan sonra revers transkripsiyon işlemi başlamaktadır. İki viral DNA ipliğinin sentezi ardışık olarak yapılır. Birinci DNA ipliği (eksik iplik) kapsitlenmiş pregenomik RNA'dan sentezlenir (Pregenomik RNA'nın kapsidi viral polimerazın ribonükleaz H fonksiyonu ile degrade edilir). Oluşturulan birinci DNA ipliği kalıp olarak kullanılarak ikinci pozitif DNA ipliği sentezlenir. Oluşan kısmen çift iplikli HBV DNA (rcDNA) içeren kor partikülleri ya yeni cccDNA'ları oluşturmak üzere çekirdeğe gönderilir ya da L, M, S yüzey antijenleri ile endoplazmik retikulumda zarflı (kapsitli) hale getirilerek hücrelerden sekrete edilir. Ayrıca sadece zarf proteinlerinden oluşan içinde viral DNA olmayan küresel ve

tübüler yapıdaki proteinler ile HBeAg antijeni endoplazmik retikulumda işlenerek kana salınır. Bu adımların her biri antiviral tedavilerin hedefleridir (Gish ve ark., 2015; Mason ve ark., 2005).



Şekil 1.2. Hepatit B Virüsünün Yaşam Döngüsü (Gish ve ark., 2015)

Bir mini kromozom olarak gizlenmiş olan cccDNA doğal immün sistem tarafından tespit edilemez. Hücresel kromatine benzer şekilde farklı viral genlerin transkripsiyonu çok sayıda hücresel transkripsiyon faktörleri, ko-aktivatörler, ko-represörler ve kromatin düzenleyici enzimler tarafından düzenlenmektedir (Nassal, 2008). Ördek modeli kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda yeni oluşturulan virüsler kana salınmaktan daha çok cccDNA oluşturmak için hepatosit çekirdeğine tekrardan geçmektedirler. Böylece viral infeksiyonun sürekliliği sağlanmaktadır (Zoulim, 2005). İnsan karaciğer (KC) biyopsi örneklerinde cccDNA kopya sayısı

hücre başına 0.1-1 kopyadır. Farklı viral ve konakça mekanizmalar cccDNA'nın miktarını kontrol altına almaktadır (Wong ve ark., 2004). cccDNA havuzu hücre bölünmesi yokluğunda çok stabil görünmesine rağmen hepatosit proliferasyonu intrahepatik cccDNA yükünün azalmasını indükleyebilir. Çünkü cccDNA, doğru göç etmeyi sağlayan sentrozom yapısını mitoz süresince bozmaktadır. Bundan dolayı immün aracılıklı hücre ölümü ve dengeleyici hepatosit rejenerasyonu cccDNA kaybını kolaylaştırır (Mason ve ark., 2005; Lutgehetmann ve ark., 2010).

1.1. Bağışıklık (İmmün) Sistemi ve İşleyiş Mekanizması

Bütün omurgalılar, moleküler olarak "kendini" kendinden olmayandan" ayırdedebilen ve daha sonra kendinden olmayan olarak tanınan bu varlıkları tahrip eden bir immün sisteme sahiptir. Bu şekilde immün sistem, virüsleri, bakterileri ve diğer patojenleri ve organizmaya tehdit oluşturabilen molekülleri ortadan kaldırır. Fizyolojik bir düzeyde, immün sistemin saldırgana cevabı karışıktır ve birçok protein sınıfının, molekülün ve hücre tipinin arasındaki bir dizi etkileşim tarafından düzenlenir. Bununla birlikte tekil proteinler düzeyindeki immün cevap, ligantların proteinlere geri-dönüşümlü olarak bağlanmasıyla çok duyarlı ve özgül bir biyokimyasal sistemin nasıl oluştuğunu gösterir (Nelson ve Cox, 2005). Canlıların bağışıklık sistemlerini uyaran ve canlı için kendinden-olmayan tüm moleküllere "antijen" veya "immunojen" denir. Bu antijenlere yanıt; yüzey engelleri, doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık sistemi ile verilir. Bağışıklık sistemi, gittikçe artarak özelleşen katmanlı savunmalarla canlıları enfeksiyonlardan korur. Deri, solunum ve sindirim sistemi gibi fiziksel engeller bakteri veya virüs gibi patojenlerin vücuda girmelerini engeller. Eğer bir patojen bu engellerden birini aşarsa, doğuştan (innate) gelen bağışıklık sistemi hemen devreye girer fakat özgül bir yanıt oluşturmaz. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi bütün bitki ve hayvan gruplarında bulunur (Litman ve ark., 2005). Bununla beraber, patojenler doğuştan gelen yanıttan kaçabilirler. Omurgalılarda üçüncü bir koruma engeli olarak doğuştan gelen yanıtla etkinleştirilen edinilmiş (adaptif) bağışıklık sistemi gelişmiştir. Burada bağışıklık sistemi, bir enfeksiyon sırasında patojeni tanımasını geliştirecek cevaplara uyum sağlar. Bu

gelişmiş yanıt, patojen ortadan kaldırıldıktan sonra da bir bağışıklık belleği şeklinde hatırlanır ve bu, aynı patojenle bir daha karşılaşıldığında daha hızlı ve güçlü bir yanıt verilmesini sağlar (Mayer, 2006).

1.1.1. Bağışıklık Sistemi İki Bölümden Oluşur

a) Doğuştan (innate) gelen immün sistem: Kalıtsal öğeleri içerir ve bunlar ilk savunma hattını oluştururlar. Bir canlıya başarıyla girebilen mikroorganizmalar doğuştan gelen bağışıklık sisteminin mekanizmaları ve hücreleriyle karşılaşırlar. Doğuştan olan yanıt genellikle mikroorganizmaların geniş gruplarında saklı olan bileşenleri tanıyan örnek tanıma reseptörlerince mikroplar tanımlandıklarında tetiklenir (Medzhitov, 2007). Doğuştan gelen bağışıklık sistemi özgül değildir; yani bu sistem patojenleri soysal olarak tanır ve yanıtlar. Sistem, bir patojen karşısında uzun süreli bağışıklık kazandırmaz. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, çoğu canlıda konağın korunmasında baskın olan sistemdir (Litman ve ark., 2005).

Humoral Sistem: Humoral immün sistem (Latince humor, "sıvı") bakteri enfeksiyonlarına ve hücre dışındaki virüslere (vücut sıvılarında bulunanlar) yöneliktir, ancak aynı zamanda organizmaya giren tekil proteinlere de cevap verebilir. Humoral immün cevabın kalbindeki proteinler, antikorlar veya immünglobulinler (Ig olarak kısaltılır) olarak adlandırılan çözünebilir proteinlerdir. İmmün globülinler bakterileri, virüsleri veya yok etmek için yabancı ve hedef olarak tanınan büyük molekülleri bağlar. Kan proteinlerinin % 20'sini oluşturan immün globülinler, B lenfositler veya B hücreleri tarafından oluşturulur, bu şekilde adlandırılmalarının nedeni, gelişimlerini kemik iliğinde tamamlamalarıdır (Nelson ve Cox, 2005). Yangı (Enflamasyon), bağışıklık sisteminde enfeksiyona karşı gösterilen ilk tepkilerden birisidir (Kawai ve Akira, 2006). Enflamasyonun belirtileri, dokudaki kan artışı sonucu olan kızarıklık ve şişmedir. Yangı, yaralanmış ya da enfekte olmuş hücrelerce salınan eikosanoidler ve sitokinlerce oluşturulur. Eikosanoidler, ateşi üreten, yangıyla ilişkili olarak kan damarlarının genişlemesine neden olan prostaglandinleri ve beyaz kan hücreleri lökositleri çeken lökotrienleri kapsar (Miller, 2006; Ogawa ve ark., 2006). Yaygın sitokinler; beyaz kan hücreleri arasında

iletişimden sorumlu olan interlökinleri, kemotaksiyi ilerleten kemokinleri ve konak hücrede protein sentezini kapatmak gibi anti-viral etkileri olan interferonları kapsar (Le ve ark., 2004). Büyüme faktörleri ve sitotoksik faktörler de ayrıca salınabilir. Bu sitokinler ve diğer kimyasallar bağışıklık hücrelerini enfeksiyon alanına toplar ve patojenlerden kurtulma sonrasında hasarlı dokunun iyileşmesini ilerletirler (Martin ve Leibovich, 2005).

Kompleman sistemi: Kompleman sistemi, yabancı hücrelerin yüzeylerine saldıran bir biyokimyasal kaskaddır. 20 farklı protein içerir ve patojenleri antikorlarla öldürmesini "tamamlayıcı" (kompleman) yeteneğinden dolayı bu şekilde isimlendirilmiştir. Tamamlayıcı sistem, doğuştan gelen bağışıklık yanıtının ana humoral bileşenidir (Rus ve ark., 2005; Mayer, 2006). Bitkiler, balıklar ve bazı omurgasızlar gibi memeli olmayan bazı türler de kompleman sistemleri bulundururlar (Liszewski ve ark., 1996). Bu yanıt insanlarda, bu patojenlere antikorların tanıyıp bağlamasıyla veya kompleman proteinlerinin mikropların yüzeylerindeki karbonhidratlara bağlanmasıyla etkinleştirilir. Bu tanıma sinyali bir hızlı öldürme yanıtını tetikler. Bu yanıtın hızı, ayrıca proteazlar olan kompleman moleküllerinin bir dizi proteolitik etkinleşmesini izleyen sinyal büyümesinin bir sonucudur. Kompleman proteinlerinin ilk olarak patojene bağlanmalarından sonra, sırayla diğer proteazları tamamlayan ve devam eden proteaz aktivitelerini etkinleştirirler. Bu üretim pozitif geribeslemeyle kontrol edilen ilk sinyali yükselten katalitik bir kaskaddır (Sim ve Tsiftsoglou, 2004). Kaskad bağışıklık hücrelerini çeken peptidlerin üretimiyle sonuçlanır, damarsal geçirgenliği arttırır ve patojenlerin yüzeylerini kaplayarak (opsonizasyon) onları yıkım için işaretler. Kompleman proteinleri pekçok virüsün kılıfını parçalar veya bakteri enfeksiyonlarında bakteri hücre duvarlarında delikler açarak bakterilerin şişmesine ve ozmotik şokla parçalanmasına neden olur (Nelson ve Cox, 2005; Rus ve ark., 2005).

Doğuştan gelen immün sistem hücreleri: Lökositler (beyaz kan hücreleri) tek hücreli canlılar gibi bağımsız davranabilirler ve doğuştan gelen immün sistemin ikinci koludur (Agerberth ve Gudmundsson, 2006). Doğuştan gelen lökositler; makrofajları, fagositleri, nötrofilleri, dendritik hücreleri, mast hücrelerini, bazofilleri, eozinofilleri ve doğal öldürücü hücreleri kapsar. Bu hücreler bütün patojenleri hatta

büyük patojenleri bile tanımlar, yutarak ya da temasa geçerek onları öldürürler. Doğuştan gelen hücreler ayrıca edinilmiş bağışıklık sistemini etkinleştiren aracı moleküller olarak da önemlidirler (Ryter, 1985).

Fagositler doğuştan gelen hücresel bağışıklığın önemli biçimleridir; patojenleri veya parçacıkları yutmalarından (fagosite etmelerinden) ya da yemelerinden dolayı böyle isimlendirilmişlerdir. Fagositler genellikle patojenleri arayarak vücutta dolaşırlar ve özelleşmiş bölgelere sitokinler tarafından çağırılabilinirler (Kawai ve Akira, 2006). Bir patojen bir fagosit tarafından yutulduğunda, hücre içinde bir kümeye konur ve bu küme fagozom olarak isimlendirilir, fagozom sonradan hücre içinde bulunan lizozom denilen bazı kümelerle birleşir ve fagolizozom olarak isimlendirilir. Patojen, fagolizozom içinde sindirim enzimlerinin etkinliğiyle ya da solunumsal (oksidatif) tepkimeyi izleyen serbest radikallerin fagolizozom içine bırakılmasıyla öldürülür (Langermans ve ark., 1994; Ryter, 1985). Fagositler gerekli besinlerini bu şekilde almak için evrilmişlerdir fakat bu rolleri fagositlere patojenleri bir savunma mekanizması şeklinde yutmalarını da sağlamıştır (May ve Machesky, 2001). Fagositler ev sahibi savunmasındaki muhtemelen en eski şekilleri teşkil ederler ve omurgasızların ve omurgalıların her ikisinde de bulunurlar (Salzet ve ark., 2006).

Nötrofiller ve makrofajlar da vücutta saldırgan patojenleri takip eden fagositlerdir. Nötrofiller normalde dolaşım sisteminde bulunurlar ve fagositlerin en çok bulunan tipleridir; toplam kanda dolaşan lökositlerin % 50-60'ını oluştururlar. Kısmen bakteriyal enfeksiyonun sonucu olan yangının akut fazlarında, nötrofiller yangının olduğu bölgeye doğru kemotaksi olarak bilinen süreçle göç ederler ve genellikle enfeksiyon bölgesine ilk ulaşan hücrelerdir (Zen ve Parkos, 2003).

Makrofajlar ise, dokularda bulunan çok yönlü hücrelerdir. Enzimleri, kompleman proteinleri ve interlökin-1 gibi düzenleyici faktörleri kapsayan kimyasalların geniş çeşitliliğini üretirler (Bowers, 2006). Makrofajlar ayrıca çöpçüler gibi de davranıp, etkin edinilmiş bağışıklık sisteminin antijen sunan hücrelerinin atıklarını veya vücudun parçalanmış hücreleri gibi döküntülerini de temizlerler (Mayer, 2006).

Dendritik hücreler, dış çevreyle ilişkide bulunan dokularda bulunan fagositlerdir; bu yüzden çoğunlukla deride, burunda, akciğerlerde, midede ve bağırsaklarda bulunurlar. Dendritik hücreler antijen sunumu sürecinde doğuştan gelen ile edinilmiş bağışıklık sistemi arasında T hücrelerine antijen sunmaları gibi bir rolle bağlantılı olduklarından edinilmiş bağışıklık sisteminin anahtarlarından biridirler (Guermonprez ve ark., 2002).

Mast hücreleri, bağ dokuda ve muköz membranlarda yerleşik olarak bulunurlar ve yangı yanıtını düzenlerler. Mast hücreleri, patojenlere karşı savunmayla ve sıcaklıkla yakından alakalı, fakat daha çok alerji ve anafilaksi ile ilişkilendirilen doğuştan gelen bağışıklık sistemi hücrelerinin bir çeşididir (Krishnaswamy ve ark., 2006).

Bazofiller ve Eozinofiller nötrofillerle bağlantılı hücrelerdir. Bir patojence etkinleştirildiklerinde, parazitlere karşı savunmada ve (astım gibi) alerjik reaksiyonlarda önemli rolü olan histamini salarlar. Bu yüzden herhangi bir doku harabiyetinin önlenmesiyle oldukça ilişkilidirler (Kariyawasam ve Robinson, 2006).

Doğal öldürücü hücreler (NK), tümör hücreleri veya virüslerce enfekte edilmiş hücrelere saldırıp onları yok eden lökositlerdir. İsimleri olan 'doğal öldürücü', etkinleştirilmeye ihtiyaç duymadan hücreleri öldürdüklerinden verilmiştir (Middleton ve ark., 2002).

b) Edinilmiş (Adaptif) immün sistem: Organizma belirli patojenleri hedef alacak özel antikorlar ve T hücreleri üreterek patojenlere karşı özel bir savunma geliştirebilir. Bu tür bir yanıtın gelişmesi günler alabilir ve ilk saldırıyı önlemede pek etkili değildir, fakat daha sonraki enfeksiyonları önler ve uzun süreli enfeksiyonların temizlenmesine yardımcı olur (Nelson ve Cox, 2005).

Hücresel immün sistem: Virüslerle enfekte edilmiş konakçı hücreyi harap eder ve bazı parazitleri ve yabancı dokuları da tahrip eder. Hücresel immün cevabın kalbindeki ajanlar, T lenfositler veya sitotoksik T hücreleridir (CTL; katil T hücreleri). T hücre olarak adlandırılmasının nedeni gelişimlerinin timusta olmasıdır. İnfekte olmuş hücrelerin ve parazitlerin tanımlaması, CTL hücrelerinin yüzeyindeki T-hücre reseptörleri olarak adlandırılan proteinleri kapsar. Genellikle hücrelerin dış yüzeyinde bulunan ve plazma zarı boyunca uzanan reseptörler bir protein olup

hücredışı ligantları tanır ve bağlar, hücre içindeki değişiklikleri başlatır. Sitotoksik T hücrelerinin yanısıra, işlevleri interlökinleri de kapsayan, sitokinler olarak da adlandırılan çözünebilen işaret verici proteinleri oluşturmak olan yardımcı T hücreleri (Th hücreleri) de vardır. Th hücreleri makrofajlarla etkileşir (Nelson ve Cox, 2005).

Edinilmiş immün sistemin hücreleri: Edinilmiş bağışıklık sisteminin hücreleri lökositlerin özel tipleri lenfositler olarak isimlendirilir. Periferik kanda lenfositlerin %20-50'si dolaşır, kalanı lenfatik sistemle hareket eder (Charles ve Janeway, 2005).

B ve T hücreleri lenfositlerin kemik iliğindeki hematopoietik kök hücrelerinden köken alan iki temel tipidir (Charles ve Janeway, 2005). B hücreleri humoral bağışıklık yanıtını oluştururken, T hücreleri hücresel bağışıklığı oluştururlar. B ve T hücrelerinin her ikisi de özgül hedefleri tanıyan reseptör molekülleri taşırlar. Temel doku-uygunluğu bileşeni (Majör histocompatibility complex, MHC) olarak bilinen reseptör kombinasyonlarıyla antijenler işlenip, sunulduktan sonra T hücreleri, patojenler gibi kendinden-olmayan hedefleri tanırlar. İnsandaki MHC proteinlerine İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen, HLA) denmektedir. MHC proteinleri hücrenin içindeki sindirilmiş proteinlerin peptit parçalarını bağlar ve bunları hücrenin dış yüzeyine çıkarır. Bu peptitler normal olarak tipik hücre proteinlerinin sindiriminden kaynaklanır, ancak bir viral enfeksiyon sırasında viral proteinler de HLA proteinleri tarafından sindiriler ve ortaya çıkarılır. HLA proteinleri tarafından ortaya çıkarılan yabancı proteinlerin peptit parçaları immün sistemin kendinden olmayan olarak tanıdığı antijenlerdir. T hücre reseptörleri bu parçaları bağlar ve immün cevabın sonraki basamaklarına iletir. İki sınıf HLA proteini vardır. HLA sınıf I ve sınıf II. Bunların hücre tipleri arasındaki dağılımları ve ortaya çıkardıkları peptitlerin sindirilmiş proteinlerinin kaynağı farklıdır (Nelson ve Cox, 2005; Guermonprez ve ark., 2002).

Her CTL hücresi özel bir HLA Sınıf I protein-peptit kompleksi için özgül olan sadece bir T-hücre reseptörünün birçok kopyasına sahiptir. Normal hücrelere hücum eden ve onları tahrip eden CTL hücrelerinin biraraya gelmesinden kaçınmak için timustaki CTL hücrelerinin olgunlaşması gelişen CTL hücrelerinin HLA Sınıf I

proteinlerinin ortaya çıkardığı organizmanın kendinin hücre proteinlerinden gelen peptitleri tanıyarak bağlayabilen hücreleri kapsayarak % 95'inden daha fazlasını ortadan kaldıran katı bir eleme işlemini kapsar. Olgunlaşan CTL hücreleri organizmanın kendi proteinlerine bağlanmayan T-hücre reseptörleri ile birliktedir. CTL hücreleri konakçı hücrenin HLA Sınıf I proteinlerine bağlı yabancı peptitleri bağlayan bir hücre topluluğudur. Bu bağlanma etkileşimleri parazitlerin ve virüsle infekte olan hücrelerin yok edilmesini sağlar. Bir organ transplante edildiğinde bunun yabancı HLA Sınıf I proteinleri de CTL hücreleri tarafından bağlanarak dokunun reddedilmesine yol açar (Nelson ve Cox, 2005). B hücreleri gibi T hücrelerinin her tipi de farklı antijenleri tanır. Sitotoksik T hücreleri, kendi T reseptörlerini (TCR'ler), özgül antijenlerini başka bir hücrenin HLA sınıf I reseptörüne bağlayarak bir kompleks oluşturduğunda etkinleşirirler (Harty ve ark., 2000). Bu HLA'nın antijen kompleksini tanımasına, T hücresindeki CD8 yardımcı bir ko-reseptör yardım eder. Sonrasında T hücresi bu antijeni taşıyan HLA sınıf I reseptörlerini aramak için vücutta dolaşır. T hücresi böyle hücrelerle iletişime geçip etkinleştiğinde, perforin gibi hedef hücrenin hücre zarı porlarından iyonların, suyun ve toksinlerin geçmesine izin veren sitotoksinleri salar. Bir proteaz olan granülizin de hücreyi apoptozise götüren başka bir toksindir (Radoja ve ark., 2006). Konağın T hücrelerinin öldürme özelliği, virüslerin replikasyonunun önlenmesinde kısmen önemlidir. T hücresi etkinleştirilmesi sıkıca kontrol altında tutulur ve genellikle çok güçlü HLA/antijen aktivasyon sinyalini gerektirir ya da ek sinyaller yardımcı T hücreleri ile sağlanır (Radoja ve ark., 2006). Tam özgüllükleri olan CTL hücreleri eğer çok sayıda virüs ile infekte olmuş ve hücre tahrip edilmişse seçici olarak prolifere olmalıdır. Bunun sonunda enfekte olmuş bir hücre ile kompleks yapan CTL hücreleri interlökinler adı verilen haberci proteinler için hücre yüzey reseptörleri üretir. Çeşitli hücrelerden salgılanan interlökinler istenen interlökin reseptörlerini taşıyan T ve B hücrelerinin bölünerek çoğalmasını uyarır. T ve B hücreleri sadece bir antijenle kompleks yaptığında interlökin reseptörleri ürettikleri için immün sistem hücreleri antijene cevap verebilen sadece birkaç hücreyi çoğaltır. Özel bir ata hücrenin uyarılmış çoğalması ile hücre topluluğu oluşması işlemine klonal seçicilik adı verilir (Nelson ve Cox, 2005).

Yardımcı T hücreleri (Th), doğuştan ve edinilmiş bağışıklık yanıtlarını düzenler ve belirli bir patojene vücudun bağışıklık yanıtı tiplerinden hangisinin verileceğine karar verirler (Abbas ve ark., 1996; McHeyzer-Williams ve ark., 2006). Bu hücrelerin sitotoksik işlevselliği yoktur, enfekte hücreleri öldürmezler veya patojenleri doğrudan temizlemezler. Bunun yerine bu görevdeki diğer hücreleri yönlendirerek bağışıklık yanıtını kontrol ederler. Yardımcı T hücreleri, HLA sınıf II moleküllerine bağlanan antijenleri tanıyan T hücresi reseptörlerini taşırlar. HLA-antijen kompleksi, Th hücrelerinin aynı zamanda T hücre reseptörlerinin bağlanma etkileşimlerini arttıran CD4 adı verilen bir koreseptörü vardır. Bu kapsamlı bağlanma ilişkisi son zamanlarda tanınmış ikincil moleküler habercilerle birlikte Th hücrelerini aktifleştirir. Aktifleşmiş Th hücrelerinin bir alt topluluğu interlökin-2 adı verilen (IL-2) küçük bir haberci protein salgılar. Bu protein yakındaki CTL hücrelerinin ve uygun interlökin reseptörleri olan Th hücrelerinin çoğalmasını uyarır. Bu durum antijeni tanıyabilen ve ona cevap verebilen mevcut immün sistem hücrelerinin sayısını büyük ölçüde arttırır. Makrofajlar veya B lenfositler ile kompleks yapmış Th hücreleri ile kompleks yapmış aktifleşmiş Th hücrelerinin bir başka alt topluluğu antijeni tanıyan B hücrelerinin çoğalmasını uyaran interlökin-4 (IL-4) salgılar. Cevap veren B, CTL ve Th hücrelerinin çoğalması uygun antijen bulunana kadar devam eder (Nelson ve Cox, 2005). Yardımcı T hücrelerinin etkinleştirilmesi ayrıca antijen sunan bir hücreyle ilişkilenmesi nedeniyle daha uzun süreye gereklilik duyar (Kovacs ve ark., 2002). Dinlenen bir T hücresinin etkinleştirilmesi, bazı hücre tiplerinin hareketlerini etkileyen sitokinlerin salınmasına neden olur. Sitokin sinyalleri makrofajların mikrobisidal fonksiyonunu ve öldürücü T hücrelerinin etkinliğini geliştiren yardımcı T hücreleri tarafından üretilir (Radoja ve ark., 2006; Abbas ve ark., 1996). Ek olarak, yardımcı T hücrelerinin etkinleştirilmesi, T hücresinin yüzeyinde ifade edilen, antikor üreten B hücrelerinin etkinleştirilmesinde tipik olarak gerek duyulan, fazladan uyarı sinyalleri sağlayan CD40 (CD154) zinciri gibi moleküllerin düzenlenmesine (upregülasyonuna) neden olur (Grewal ve ark., 1998).

CTL hücreleri gibi Th hücreleri de bireylerin kendi hücre proteinlerini tanıyanları ortadan kaldırılarak timusta sıkı bir eleme işlemi gerçekleştirir. Timustaki

eleme işlemi sırasında CTL ve Th hücrelerinin çoğu ortadan kaldırılmasına rağmen çok sayıda kalan olur ve bunlar immün cevabı yerine getirir. Geriye kalan hücreler özel bir kimyasal yapıyı bağlayabilen tek bir tip T hücre reseptörüne sahiptir. Kan dolaşımında ve dokularda bulunan T hücreleri, T-hücre reseptörlerinde milyonlarca farklı bağlanma özellikleri taşır. İleri derecede değişen T hücre topluluğu içinde daima görünebilen herhangi bir antijene özgül olarak bağlanabilen bir grup hücre vardır. Bu hücrelerin büyük çoğunluğu hiçbir zaman bunlarla bağlanabilen yabancı bir antijene rastlamazlar ve birkaç gün içinde yok olurlar, yerlerini tam immün cevabın başlatılmasını sağlayacak yeni nesil T hücrelerine bırakır (Nelson ve Cox, 2005).

T lenfositler kanda dolaşan bütün lenfositlerin % 80'ini oluştururlar. Antijen sunumunun bu iki mekanizması T hücrelerinin iki tipinin farklı rollerde olmasıyla sonuç verir. Üçüncü bir alt grup olan γδ T hücreleri ise HLA reseptörlerine bağlı olmayan tam antijenleri tanır (Holtmeier ve Kabelitz, 2005). Zıt olarak, B hücresinin antijene özgü reseptörü, B hücresi yüzeyinde bulunan bir antikor molekülüdür ve antijen işlemesine gerek duymadan bütün patojenleri tanır. B hücrelerinin her soyu farklı bir antikoru ifade eder, bu yüzden B hücresi antijen reseptörünün tüm takımları vücudun üretebildiği bütün antikorları sunarlar (Charles ve Janeway, 2005).

B lenfositler ve Antikorlar; B hücresi bir patojeni, yüzeyindeki antikorlara özgü yabancı antijenler bağlandığında tanımlar (Sproul ve ark., 2000). Bu antijen/antikor kompleksi B hücresi tarafından kabul edilir ve proteolizis tarafından peptitlerin içine işlenir. B hücresi bu antijenik peptitleri yüzeyindeki HLA sınıf II moleküllerinde gösterir. HLA'nın bu kompleksi ve antijen, lenfokinleri salan ve B hücrelerini etkinleştiren eşlenik bir yardımcı T hücresini çeker (Kehry ve Hodgkin, 1994). Etkin B hücresi böylece bölünmeye başladığında, ürünleri (plazma hücreleri), antijenleri tanıyan antikorların milyonlarca kopyalarını salgılar. Bu antikorlar kan plazmasında ve lenfde dolaşır, antijen sunan patojenleri bağlar ve onları kompleman sisteminin ya da fagositlerin yıkımı ve kaldırması için işaretler. Antikorlar ayrıca bakteriyal toksinleri bağlayarak veya virüslerin ve bakterilerin enfekte hücrede kullandıkları reseptörlere müdahalede bulunarak istilacıları doğrudan etkisizleştirebilirler (Bowers, 2006). T hücresinden farklı olarak B hücreleri konakçı

proteinlerini tanıyan antikor üretenleri ortadan kaldırmak için timusta seleksiyona uğramaz. Bununla birlikte B hücreleri Th hücreleri tarafından bölünerek çoğalmak için uyarılmadıkça bir immün cevaba önemli derecede katkıda bulunmaz. Th hücreleri timusta seçilir; konakçıya potansiyel olarak zararlı antikorları üreten B hücrelerini uyaran Th hücreleri elenir. İnsanlar ayrı bağlanma özelliklerine sahip 10^8 farklı antikoru üretebilirler. Bu olağanüstü farklılık virüsün veya saldıran hücrenin yüzeyindeki kimyasal yapının bir veya daha fazla antikor tarafından tanınıp bağlanacağı olasılığını ortaya çıkarır. Antikor farklılığı genetik rekombinasyon mekanizmaları aracılığıyla bir grup immünglobulin gen parçalarının rastgele biraraya getirilmesinden kaynaklanır (Nelson ve Cox, 2005).

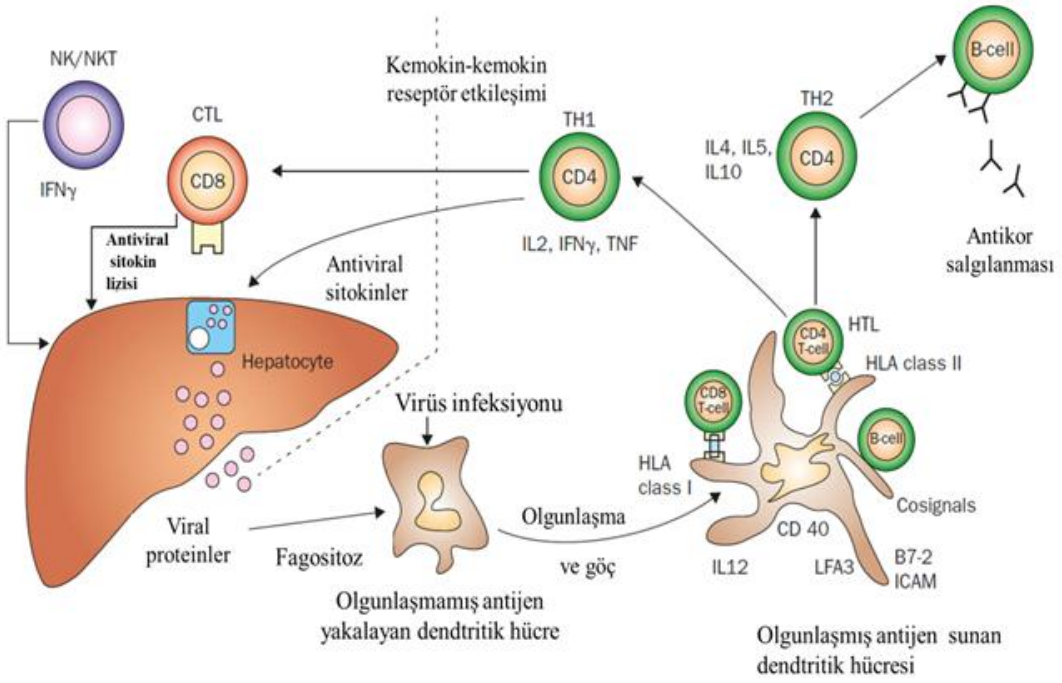
Antijen tükendiğinde aktifleşmiş immün hücreler, genellikle programlanmış hücre ölümü ile günler içinde yok edilir. Bununla birlikte az sayıda uyarılmış B ve T hücreleri bellek hücrelerine olgunlaşır. Bu uzun ömürlü hücreler antijenle ilk defa karşılaşıldığında doğrudan birincil immün cevaba katılmaz. Kanın kalıcı elemanları oldukları için aynı antijenle tekrar karşılaşıldığında cevaba hazırdır. Bellek hücreleri antijenle sonraki karşılaşmada önceki klonal yayılma nedeniyle birincil cevaptan genellikle daha hızlı ve daha şiddetli olan ikincil immün cevabı sağlayabilir. Bu mekanizma ile omurgalılar bir kez virüs veya diğer patojenlerle karşılaştıktan sonra tekrar karşılaştıklarında patojene daha hızlı cevap verebilirler. Bu durum aşılarla ve aynı tür virüsün tekrarlayan enfeksiyonlarına karşı gelişen doğal immünite ile sağlanan uzun süreli immünitenin temelidir (Nelson ve Cox, 2005).

1.1.2. Karaciğerin HBV'ye İmmün Yanıtı

Konakçanın virüslere immün yanıtı birkaç hücresel sistemin kompleks etkileşimine dayanmaktadır. Doğal immün sistem hücreleri; dentrik hücreler (virüs spesifik T hücre yanıtını indükler ve yönlendirir) ve ana antiviral efektör olan T hücreleridir. Hepatosit infeksiyonundan sonra çeşitli hücresel ve humoral yanıt ile virüsün eliminasyonu amaçlanır. İlk yanıt nonspesifik olan interferon sistemi, doğal öldürücü hücreler (NK) ve kupffer (KC makrofajları) hücrelerinin spesifik olmayan aktivasyonudur. Doğal öldürücü T hücre aktivasyonunun HBV replikasyonunu

inhibe ettiği invivo çalışmalarda gösterilene kadar bu spesifik olmayan mekanizmaların rolü anlaşılamamıştır (Kazuhiro ve ark., 2000). Bu nonspesifik yanıttan sonra immün yanıt çok önemli olan viral proteinlere karşı spesifik yanıt için yönlendirilir. İmmün sistemin iki ana kolundan biri olan humoral yanıtta B lenfositler görev alır ve HBV'ye karşı antikorlar üretir, diğer bir kolu ise immün sistemin hücresel koludur. Bu kol da makrofajlar ve T lenfositler görev almaktadır (Şekil 1.3) (Delves ve Roitt, 2000; Jung ve Pape, 2002).

Kuffer hücreleri ve dendritik hücrelerce viral proteinler T-hücrelere sunulur. Yardımcı T hücreleri kutuplanarak ikiye ayrılır. Th1 yardımcı T hücreleri interferon gama (IFN-γ), tümör nekroz faktör alfa (TNF-α) ve interlökin-2'yi (IL-2) salgılaması sitotoksik T hücrelerinin ve makrofajların hücre içi patojenleri inhibe etmesinde yardımcı olur. Th2 yardımcı T hücreleri de IL 4, 5, 6 ve 10'u salgılayarak B lenfositlerini uyarıp antikor üretmelerini ve çoğalmalarını sağlar (Delves ve Roitt, 2000; Jung ve Pape, 2002; Ferrari ve ark., 2003).



Şekil 1.3. HBV'ye immünolojik yanıtta farklı hücre sistemleri (Jung ve Pape, 2002)

CD4+ T'lerden IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α ve INF-γ salınır. Salınan IFN-γ ve IFN-α, insan lökosit antijeni sınıf I ve II'yi uyarır. HLA sınıf I, HBV'nin hepatosit içindeki antijenik yapılarını hepatosit yüzeyindeki CD8+ T hücrelerine

tanıtır. Daha sonra Fas ligand, sitokinler ve perforinler aracılığı ile infekte hepatosit apoptoza uğratılır ve yok edilir. HLA sınıf II ise HBV'nin plazma HBeAg ve HBcAg gibi antijenik yapılarını makrofajlar üzerindeki CD4+ T hücrelerine sunar ve onları hassas hale getirir. İmmün aracılı eliminasyon mekanizmaları enfekte hücreleri ortadan kaldırarak enfeksiyonun sonlanmasını sağlıyabileceği gibi kronik karaciğer hasarına ve hepatosellüler kansere de neden olabilir (Delves ve Roitt, 2000; Jung ve Pape, 2002; Ferrari ve ark., 2003).

Dendritik hücreler eşşiz bir antijen sunucu hücrelerin heterojen grubunu oluştururlar. Bunlar T hücre sistemi ve patojenler arasında köprü oluştururlar. Viral hastalıklarda bu sistemin tam etkisi ve değeri son zamanlarda anlaşılmıştır. Tip I interferon üreten plazmatosit hücreler gibi bu sistemde yer alan hücrelerin tanımlanması, sınıflandırılması ve fonksiyonlarının belirlenmesine başlanılmıştır. T hücreler karakteristik olarak T hücre reseptörlerine sahip olup HLA kompleksinin sunduğu işlenmiş antijenleri tanırlar. Çoğu sitotoksik T hücre CD8 reseptörünce pozitiftir ve HLA Sınıf I moleküllerince sunulan hücre içi antijenleri tanır ve infekte hücreye T hücrenin bağlanmasını sağlayarak infekte hücrelerin yok edilmesini sağlarlar. Hücrelerden replike olup salınan virüsler antikorun etkisi ile hızlıca yok edilmeye başlanır. İnfekte hücrelerin direkt yok edilmesine ilaveten CD8+ T hücreleri ayrıca TNF-α, interferon-γ ve lenfotoksin gibi sitokinleri üreterek antiviral savunmayı güçlendirirler. Böylece infekte hücreye komşu hücrelerin korunmasını sağlarlar. Ayrıca CD4 reseptörünce (+) olan yardımcı T hücreleri dendritik hücrelerin yüzeyinden sentezlenen HLA Sınıf II moleküllerince sunulan plazmadaki antijenleri tanır ve iki ana popülasyona bölünür. Tip1 yardımcı T hücreleri (Th1) interferon gama ve interlökin-2 (IL-2) salgılar. Diğer Tip2 yardımcı T hücreleri (Th2) ise interlükin 4, 5 ve 6'yı salgılarlar (Delves ve Roitt, 2000; Jung ve Pape, 2002).

Sitokinler infeksiyöz ajanlara karşı optimum korumayı sağlamak için immün yanıtta merkezi bir role sahiptir. Örneğin, antijen sunucu hücrelerden salınan interlökin-12 Th1 hücrelerini uyararak IFN gama salgılanmasını sağlar. IFN gama etkili bir şekilde makrofajları aktive ederek hücre içi patolojenlerin yok edilmesine imkan sağlar. Genel olarak Th1 tarafından sitokin üretimi hücre aracılıklı immünitede rol alan makrofaj aktivasyonu ve T hücre sitotoksitesini aktif hale

getirir. Th2 hücreleri ise B lenfositlerin antikor üretimine yardım eder (Delves ve Roitt, 2000; Jung ve Pape, 2002).

Kemokinler ise immünolojik yanıt üzerine büyük etkisi olan proteinlerdir. KC'e lenfositleri çekmek için lenfositler üzerindeki kendi reseptörleri ile etkileşime girmesi önceden olması gereken bir zorunluluktur (Delves ve Roitt, 2000; Jung ve Pape, 2002).

1.1.3. Hepati B Virüsüne Humoral Yanıt

HBV zar antijenlerine (HBsAg) antikor yanıtı T hücre bağımlı bir süreçtir. HBsAg antikorları (antiHBs) nötralize edici antikorlardır. Bu antikorlar viral partiküllerin absorpsiyonu ile virüslerin hepatositlere bağlanmasını ve girmesini önlemektedir. Aşılama süresince antiHBs oluşumunun indüklenmesi viral infeksiyondan korunmak için yeterlidir. Akut HBV infeksiyonunu yenenler ile HBV aşısı yaptıranlarda HBsAg antikoru belirlenebilir, fakat bazılarında infeksiyonu tamamen yendiği halde tespit edilemeyebilir. HBcAg antijeni antikoru olan antiHBcAg HBV'ye maruz kalan hemen hemen herkeste tespit edilir. HBsAg antikoruna benzemeyen bu antikor koruyucu değildir. Onun tek başına varlığı akut HBV ile kronik HBV arasındaki ayrımda kullanılamaz. HBcIgM antikoru akut infeksiyonun sonrası 4-8 ayda genellikle serumda görülmez. Kronik HBV infeksiyonlu bazı hastalarda IgM antikoru hastalığın alevli döneminde pozitif olabilirken onun varlığı akut HBV için kesin güvenilir bir marker değildir (Milich ve McLachlan, 1986; Maruyama ve ark., 1998).

HBeAg antijeni aktif viral replikasyonun olduğunu göstermektedir. HBeAg klirensi ya da antiHBeAg varlığı viral replikasyonun durduğunun bir işaretidir. Sensitif immüno deney sonuçlarına göre antiHBeAg, e antijen klirensinden önce de mevcut olup HBeAg tamamen temizlendiğinde de virüs replikasyonu olmaya devam etmekte olduğunu göstermektedir. Viral polimeraza antikor yanıtı tam olarak çalışılmamıştır fakat polimerazın karboksil ucu özellikle RNaz-H alanı çok immünolojiktir. Bu antikorlar infeksiyonun en erken markerlarıdır ve viral

replikasyonun devam ettiğininin belirtecidir (Maruyama ve ark., 1998; Maruyama ve ark., 1993).

HBx proteini ile ilgili immün yanıt hakkında yapılan birçok araştırmaya rağmen bilinenler çok azdır fakat kronik hepatit ve HCC'ye neden olan etkenler arasında ağırlıklı olarak yer almaktadır (Stemler ve ark., 1990; Vitvitski-Trépo ve ark., 1990).

Deneysel Hayvan Sistemlerinden Çıkarımlar: Dağ sıçanı ve ördeklerde yapılan çalışmalarda virüsün alındığı yaş, alınan virüs konsantrasyonu kronik infeksiyonun gelişmesi için ana etkenlerdir. Yapılan bu iki hayvan modelinde infeksiyonun sonucu için hücre aracılıklı immün yanıtın çok önemli olduğunu, viral klirensin infektif hücrelerin viral antijene spesifik sitotoksik T lenfositleri (CTL) ile yıkımının gerçekleştiği ve kronik hepatitin patogenezinde spesifik CTL'lerin neden olduğu kanıtlanmıştır (Gerin, 1990; Kajino ve ark., 1994).

CTL'ler hem sitopatik hem de küratif potansiyele sahiptir. Transgenetik fare deneylerinde hepatositlerdeki HBV zarf proteinlerinden dolayı CD8+ HLA Sınıf I molekülleri ile etkileşen HBsAg spesifik CTL'lerin hepatosite transferinden sonra akut hepatit gelişmektedir (Wirth ve ark., 1995). CTL'lerin direkt sitopatik etkisi efektör/hedef hücre oranına göre sınırlandırılır. Ayrıca solid dokunun yapısındaki kısıtlamadan dolayı CTL'lerin serbestçe hareket etmesi kısıtlanır. Bundan dolayı hepatositlerin % 5'ine kadarı yok edilebilir. HBsAg + buzlu cam hepatositlerin CTL'lerin salgıladığı IFN gamalara çok hassas olması sonucu IFN gamalar tarafından bu hücreler yok edilir ve sayısına bağlı olarak fulminant hepatit gelişebilir. KC hastalığı bu inflamatuar sitokinlerin ve hücrelerin yönetimi ile önlenebilir. Ayrıca aktive olmuş CTL'ler ve sitokinler hücreyi yok etmeden hücre içi mekanizmalar ile HBV gen ekspresyonunu, replikasyonunu önler, viral RNA'ların ve proteinlerin bozulmasına neden olurlar. Bu mekanizma Fas ve Perforin bağımlı olmaksızın CTL'lerin salgıladığı TNF alfa ve IFN gama ile olmaktadır (Moriyama ve ark., 1990; Ando ve ark., 1993).

Ayrıca kupffer hücrelerin sunduğu antijenlerin tanınmasından sonra HLA Sınıf-II ile sınırlı T hücre klonları HBsAg olan hücreleri viral partiküllerden temizlerler. Nonsitopatik viral klirens mekanizması şempanze deneylerinde

kanıtlanmış olup T hücre infiltrasyonu olmadan önce IFN gama seviyesinin yükseldiği dönemde serum ve KC'de HBV DNA'nın yok olduğu görülmüştür. Sonuçlara göre farklı inflamatuvar hücre popülasyonları erken dönem viral klirensten ve geç viral patogenezden sorumlu olabilmektedir (Franco ve ark., 1997; Guidotti ve ark., 1999).

1.2. Hepatit B Virüs Enfeksiyonu

Dünya popülasyonunun 1/3 ünden fazlası HBV ile infekte olup bunların 350 milyonu kronik olarak virüsü taşımaktadır. Kronik taşıyıcıların ise % 25'i kronik KC hastalığı olan siroz ve hepatosellüler karsinomaya yakalanabilmektedir (Lee, 1997). Yetişkinlikte elde edilen infeksiyon klinik olarak belirti göstermeden HBV infeksiyonunu tamamen yenebilmekte ve virüsü kontrol edebilmektedir. Akut HBV infeksiyonunda yetişkinlerin %5-10'unda kronikleşebilmektedir. Doğumla infekte olan çocukların % 90'ınından fazlasında HBV kronikleşmektedir. Akut ve kronik KC hastalığının belirlenen patogenetik mekanizmaları kısmen tanımlanmıştır. Birçok çalışma HBV'nin nonstopatik olduğunu ve konağın immün sistemi tarafından antijene spesifik hücresel immün yanıtın viral hepatite yani KC hasarına neden olduğunu bildirmiştir (Lee, 1997; Lavanchy, 2003).

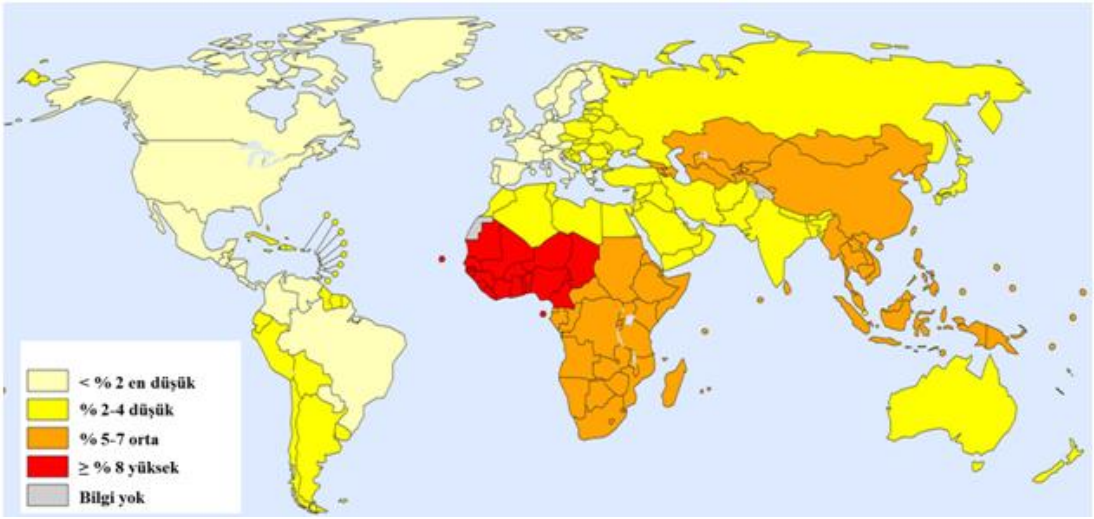
HBV infeksiyonlarında viral antijenlere T hücre yanıtının başlatılması viral klirenste ve hastalığın patogenezinde esas etkendir. Kendini sınırlamış akut HBV enfeksiyonunda T hücre yanıtı büyük, poliklonal, multispesifik stotoksik ve yardımcı T hücre ile birliktedir. Buna zıt olarak kronik taşıyıcılarda immün yanıt zayıf ve belirgin değildir. Bundan dolayı viral sürekliliğin dominant olma sebebi zayıf antiviral immün yanıtın olmasından kaynaklanmaktadır. Hayvan modelleri ile bu mekanizmaların aydınlatılması mümkün olabilmektedir. Birçok virüs infeksiyonu klirensinin virüse spesifik T hücrelerce infekte hepatositlerin yok edilmesi ile sağlandığı düşünülürken yeni verilere göre infekte hücreler yok edilmeden virüse inaktif lenfomononükleer hücrelerden sentezlenen stokinler ile non-sitolitik intrasellüler viral inaktivasyon viral klirenste önemli rol oynamaktadır. Başka faktörler de HBV kronikleşmesine katkıda bulunabilmektedir. Bunlardan bazıları

antijen sunum sürecinin virüsçe inhibisyonu ya da antijen sunumundaki yetersizlik sitotoksik mediatörlere yanıtın düzenlenmesi, viral antijenlere immünolojik tolerans, viral mutasyonlar ve immünolojik olarak ayrıcalıklı alanların infeksiyonudur (Jung ve Pape, 2001).

1.2.1. Hepatit B Virüsünün Epidemiyolojisi

HBV enfeksiyonun dünya genelindeki prevalansı değişiklik göstermektedir. HBV enkesiyonu epidemiyolojik olarak en düşük (<% 2), düşük (% 2-4) ve orta (% 5-7), yüksek (≥ %8) endemisite bölgeleri olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 1.6.) (Ott ve ark., 2012). Hastaların büyük bir kısmı yaklaşık olarak dünya nüfusunun % 45'nin yaşadığı yer olan Asya ve Afrika ülkelerinde bulunmaktadır (The EASL Jury, 2003). İnfekte kişilerin % 75'i Asya'da, % 12'si Afrika'dadır (Gust, 1996). HBV infeksiyonun serolojik olarak pozitiflik oranı (karşılaşan tüm bireyler) Çin popülasyonunun % 35-62'si (Yao, 1996), Sub-Saharan Afrika popülasyonunun % 56-98'i (Kew, 1996; Kiire, 1996), ve ABD'de yaklaşık 2.2 milyon KHB'li yaşamaktadır, özellikle yabancı uyruklu kişiler arasında yüksek prevalansa sahiptir (% 3.45) (Kowdley ve ark., 2012).

Sub-Saharan Afrika (%5-7) ve Asya'nın büyük bir bölümü (%5-7) orta endemik bölgede yer almaktadır. Batı Pasifik'te > %8 ile en yüksek endemik bölgedir. Avrupa'nın güneyi, Ortadoğu ve ülkemiz % 2-4 oranı ile düşük endemik bölgede yer almaktadır (Şekil 1.4) (Ott ve ark., 2012).



Şekil 1.4. HBV'nin Dünyadaki Prevalansı (Ott ve ark., 2012)

Türk Karaciğer Derneğinin (TKAD) ülkemizde yaptığı çalışmalarda hepatit B prevalansının batıdan doğuya doğru gittikçe arttığı, Antalya, Adana, Elazığ, Sivas ve Erzurum'da yüksek oranlarda bulunduğu, Diyarbakır'da HBsAg pozitiflik oranı % 10'lara kadar ulaştığı bildirilmektedir. T.C. Sağlık Bakanlığı 04.06.1998 tarih ve 6856 sayılı genelge ile hepatit B aşısını çocuk aşılama programına dahil etmiştir. Ülkemizdeki aşı uygulaması nedeniyle HBsAg pozitifliğinin yıllar içinde azaldığı görülmektedir (% 5,2'den % 2,97'ye). Ülkemizde yapılan çalışmalarda HBsAg pozitifliği yaklaşık % 4, anti-HBs pozitifliği yaklaşık % 32, anti-HBc Pozitifliği yaklaşık % 30,6 olarak belirlenmiştir. HBsAg pozitif olan bireylerin anti-HBe pozitiflik oranı ise % 92,1 olarak saptanmıştır (Mistik, 2007; Karaaslan ve Yurdaydin, 2009; Yıldız ve ark., 2015) (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Türkiye'nin bazı şehirlerindeki HBV prevalansı (Yıldız ve ark., 2015)

Bölge	Şehir	Zaman	Donör Sayısı	HBsAg (%)	Referanslar
Akdeniz	Hatay Isparta K.Maraş Mersin	2003-2004 2000-2007 2003-2005 2006-2008	12,313 51,361 4107 691	2,02 1,1 1,26 2,2	Ocak, 2005 Kaya, 2009 Gul, 2006 Oner, 2011
Marmara	İstanbul-1 İstanbul-2 İstanbul-3	2007 1998-2008 2003-2012	72,695 75,747 51,120	1,76 2,83 2,03	Acar, 2010 Uluturk, 2010 Sanlı, 2013
Karadeniz	Tokat	2003-2010	15,696	1,29	Bulut, 2012
Ege	Afyon İzmir	2001-2010 2004-2010	37,343 80,454	1,38 1,31	Altindis, 2011 Uzun, 2013
İç Anadolu	Ankara Konya	1996-2010 2005-2012	220,841 165,006	1,07 1,3	Dilsiz, 2012 Feyzioglu, 2012
Doğu Anadolu	Erzurum Van	2000-2011 1995-2003	204,000 39,002	3,14 2,55	Celebi, 2012 Dilek, 2007
G.Doğu Anadolu	Diyarbakır	2000-2010	266,035	3,17	Dayan, 2013
Türkiye		1989-2004	6,240,130	4,19	Emekdas, 2006

Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) Eylül 2010'da hepatit B'ye ilişkin teknik raporunda Türkiye'de genel popülasyonda hepatit B prevalansı bölgelere göre %2 - 8 arasında bildirilmiştir. Siroz hastalarında HBsAg prevalansı %64, hepatoselüler karsinom vakalarında HBsAg prevalansı ise %54 olarak bildirilmiştir. Bu rapora göre Avrupa ülkeleri ile kıyaslandığında genel popülasyonda hepatit B prevalansının en yüksek olduğu ülkelerden biri Türkiye'dir (ECDC, 2010).

Adana ilimizde yapılan farklı çalışmalarda HBV prevalansının geçmiş yıllardan günümüze doğru azaldığı görülmüştür (Çizelge 1.2) (Yıldız ve ark., 2015). Bu azalmanın nedeni Sağlık Bakanlığı'nın 1998 yılından itibaren uyguladığı aşı programıdır.

Çizelge 1.2. Adana İlindeki HBV prevalansı (Yıldız ve ark., 2015)

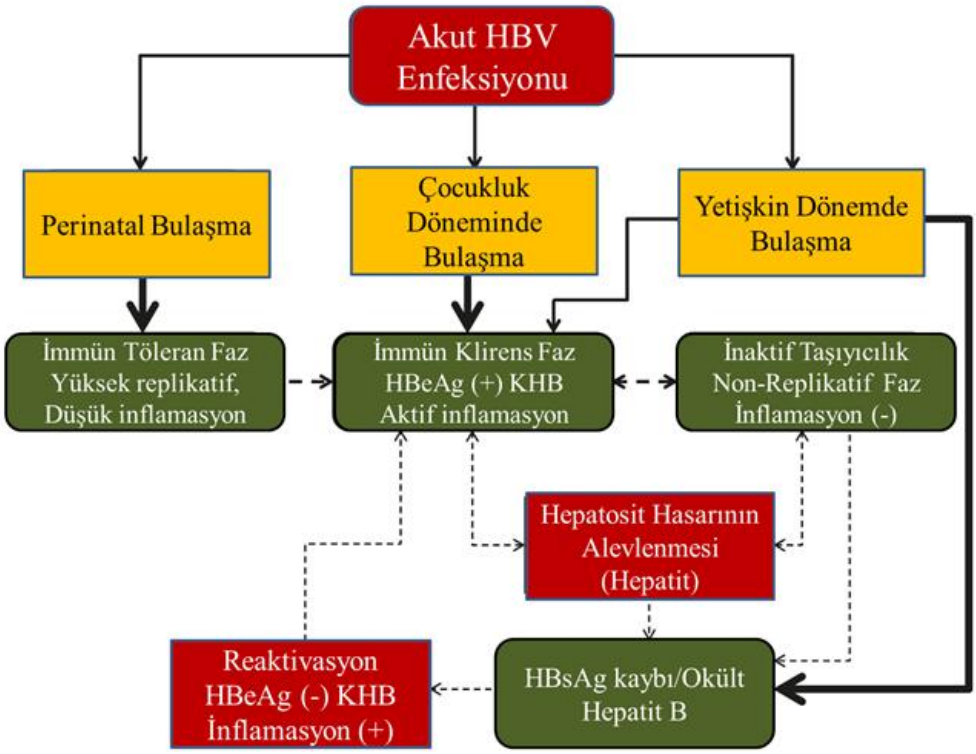
Şehir	Yıl	Donör Sayısı	HBsAg(%)	Referanslar
Adana	1988-1995	65068	7,93	Kılıç ve ark., 1996
Adana	1991-1995	53966	NR	Kılıç ve ark., 1996
Adana	1992-1993	8785	6,58	Dundar ve ark., 1994
Adana	2000	Data yok	4,52	Dilek ve ark., 2007
Adana	1999-2002	19644	0,88	Turunc ve ark., 2003
Adana	2007-2009	62461	1,92	Menziletoglu ve ark.,

1.2.2. Kronik HBV Enfeksiyonunun (KHB) Doğal Seyri

Kronik HBV infeksiyonu genellikle Asya ve Afrika'da perinatal olarak (doğumla kazanılan) ya da çocukluk döneminde edinilen enfeksiyon ile gelişir (Lavanchy, 2004). Enfeksiyon genellikle çocukluk döneminde kişiden kişiye yakın temas yolu ile kazanılır (Özellikle Alaska, Sub-Saharan Afrika ve Akdeniz bölgesinde) (Gish ve ark., 2015). Perinatal bulaşta uzun bir dönem boyunca serum alanin aminotransferaz (ALT) değerinin normal olması, HBeAg antijen pozitifliği ve yüksek HBV DNA düzeyi ile birlikte seyreder (McMahon, 2005). Fakat karaciğerde ya minimal ya da hiçbir inflamasyon (hasar) gelişmemektedir. Bu tür infekte kişiler yüksek replikatif, düşük inflamatuvar süreç "immün toleran dönem" olarak adlandırılır ve karaciğer hastalığı gelişmeksizin uzun yıllar kalabilmektedir (Hong ve ark., 2015). Fakat bu periyod süresince HBV DNA'nın karaciğer hepatosit genomuna entegre olasılığının olmasından dolayı onkojenik etkisi söz konusudur. Entegre olan HBV DNA'dan viral proteinler sentezlenmeye devam eder (HBsAg gibi). HBeAg (+) çocuklar, yüksek ALT ve yüksek HBV DNA seviyelerine sahip olup, HBeAg serokonversiyonu ergenlik döneminin başlarında gerçekleşir (Lok ve McMahon, 2009). Batı ülkelerinde prevalansı düşüktür. Yetişkinlerde karşılaşılan HBV enfeksiyonu genellikle cinsel temas, aile içi bulaş ve damar yolu ilaç kullanımı ile olur ve bu kişiler direkt "immün klirens" faza girerler.(Gish ve ark., 2015).

1.2.3. Kronik HBV (KHB) Enfeksiyonunun Fazları

Kronik HBV enfeksiyonun doğal seyri konağın virüse verdiği immün yanıta bağlı olarak değişmektedir. Enfeksiyonun karşılaşıldığı yaş akut HBV infeksiyonuna immün yanıt seviyesini ve tipini belirlemekte, dolayısı ile KHB'nin doğal seyrini etkilemektedir. KHB 5 ana faza sınıflandırılmıştır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. HBV İnfeksiyonunun Fazları (Gish ve ark., 2015)

1. İmmün Toleran Faz (yüksek replikatif, düşük inflamatuvar): Yüksek HBV DNA, HBeAg (+) durumu, normal veya düşük serum ALT, orta veya hiç olmayan KC nekroinflamasyon, düşük IL-10 ve proinflamatuvar sitokin üretimi ve fibrozise ilerlemenin olmayışı veya yavaş olması dönemidir. Bu fazda immün sistem viral partikülleri tölere eder agresif bir yanıt vermez, daha sonraları immün sistemin olgunlaşması ya da değişiklikler ile immün yanıt gerçekleşebilir (Hong ve ark., 2015).
2. İmmün Klirens Fazı: Başlangıçta genişçe dalgalanan serum HBV DNA ve ALT seviyelerini takiben er geç normalleşen ALT ve düşük veya

belirlenemeyen HBV DNA seviyesine sahip olunan dönemdir. ALT dalgalanmaları inflamasyondaki akut değişimlere bağlıdır, er geç HBeAg negatifleşir. Karaciğer histolojisi yüksek nekroinflamasyondan minimal seviyeye iner. Bazı hastalarda kor ve prekor mutasyonlarının varlığı HBeAg'nin negatif görünmesine neden olur (Gish ve ark., 2015).

3. HBeAg(-) Kronik HBV Fazı: Sürekli bir nekroinflamasyon ile karakterizedir ve immün klirens gerçekleşmez. HBV DNA seviyeleri ılımlı ya da biraz yüksek düzeydedir. Karaciğer hastalığına ilerleyebilir (Gish ve ark., 2015).
4. İnaktif Taşıyıcılık Fazı (Nonreplikatif Faz): Düşük HBV DNA düzeyi, HBeAg (-) ve normal ALT durumu. Minimal ya da olmayan nekroinflamasyon ile birliktedir.
5. HBsAg Klirensi (Okült Faz): HBsAg kaybı gerçekleşmesine rağmen intrahepatik düzeyde HBV genomunun replikasyon bileşenleri ve epizomları cccDNA gibi mevcuttur. Karaciğer dokusunda HBV DNA varlığının belirlenmesi serumda ise ya çok düşük bulunması ya da belirlenememesi durumudur. Bu hastalarda tüm HBV markırları negatiftir (Pollicino ve Raimondo, 2014).

HBV klirensinin er geç viral kontrolün gerçekleşmesi, cccDNA'nın klirensi ve HBV DNA'nın entegre olduğu hepatositlerin temizlenmesinin olduğu klirens fazıdır. Her bir faz ALT ve HBV DNA seviyeleri, HBeAg durumu karaciğer histolojisi ve antiviral tedaviye yanıt ile ilişkilidir. Fazlar stabil değildir, bir fazdan diğerine herhangi bir yönde geçiş olabilir. Örneğin inaktif taşıyıcılık durumundan reaktivasyon (HBeAg (-)'den HBeAg (+) geçiş) durumuna geçebilme oranı % 17-32 dir, ALT seviyelerinde yükselme ve HBV replikasyon markırlarının tekrardan görülmesi mümkün olmaktadır (Davis ve ark., 1984). Bazı hastalar ise direk HBeAg (+) durumundan HBeAg (-) KHB fazına geçmektedir. Birçok yetişkin HBeAg (+) hasta wild tip (yabanil tip) virüs ile birlikte kor ve precor mutasyonlarına sahiptir. ALT'si yüksek KHB'li hastalarda kendiliğinden HBeAg serokonversiyonu oranı yılda % 8 ile % 12 arasındadır. Bu kişilerin çoğu inaktif taşıyıcılık fazına ya da

HBeAg (-) KHB fazına geçerler (Baqai ve ark., 2015; Chu ve ark., 2003; Takahashi ve ark., 1995).

1.2.4. HBV'nin İmmün Sistemden Kaçması ve Kronikleşmesi

HBV infeksiyonunun kronikleşmesinde hepatosit içerisinde yerleşmiş olan cccDNA'nın başarılı bir şekilde virüs-konakça etkileşim ağı kurmasına, konakça hücresel mekanizmaları manipüle etmesine ve bu sayede kendi replikasyonunu ve yayılmasını gerçekleştirmesi ile konakça antiviral yanıt mekanizmasından kaçmasına bağlıdır (Dandri ve Locarnini, 2012). Enfekte yenidoğanların büyük bir kısmında KHB gelişmekte fakat akut olarak infekte yetişkinlerin çok büyük çoğunluğu (%95) kendiliğinden viral klirensi sağlayarak doğal bağışıklık kazanırlar. Fakat çoğu spontan klirensli kişiler yaşamları boyunca infeksiyonun düşük seviyelerine sahiptirler. HBV kronikleşmesi için virüsün konağın immün sistemden kaçması veya immün sistemi modifiye etmesi için kullandığı stratejilere ihtiyacı vardır. Kronik HBV infeksiyonunda doğal ve adaptif immün yanıtın karaciğer hasarına, fibrozis gelişimine, hepatik dekompansizyona ve hepatosellüler karsinomaya sebep olduğu düşünülmektedir (Iannacone ve ark., 2006).

Viral infeksiyona immün yanıt ikiye ayrılır: a) Doğal yanıt; fagositler ve doğal ölüm hücreleri ile gerçekleştirilir. b) Adaptif immün yanıt ise lenfositler, $CD4^+$ T lenfositleri, $CD8^+$ T lenfositleri ve antijen sunucu hücreler olan dendritik hücreler ve makrofajlar aracılığı ile gerçekleştirilir. Son zamanlarda Hang ve arkadaşları hipotezinde "eğitimli immünite" kavramını (trained immunity) ortaya atmışlardır. Bu eğitimli immünite; gelişmiş doğal immün hücre olgunlaşması, yardımcı T hücrelerinin çoğalması ve gelişmesi, IL-12p40 üretiminin artması ile birlikte IL-10 ve proinflamatuvar sitokinlerin (IL-6,IL-8, TNF-α) üretiminin azalmasını kapsamaktadır (Hong ve ark., 2015).

Doğal immün yanıt KC hasarının patogenezine ve viral klirense anlamlı bir şekilde katkıda bulunmaz. Adaptif immün yanıt verilene kadar HBV yayılabilir ve tespit edilemez şekilde kalabilir. Enfeksiyonun başlangıç fazında virüs toll-like reseptör (TLR) aracılı doğal immün yanıtı baskıladığı görülür (Riordan ve ark., 2006;

Wu ve ark., 2009). HBeAg (prekor proteini) proteini bir effektör protein olup TLR ile etkileşime girerek sinyal kaskadlarını baskılar, down stream inflamatuvar faktörlerin, nükleer faktör kappa B (NF-kB) gibi, daha az sentezlenmesini sağlar ve doğal immün yanıtı olumsuz yönde etkiler. Akut infeksiyon süresince NK hücre aktivasyonu ve interferon gamma (IFN-γ) üretimi azaltılır. Kronik HBV infeksiyonunda ise bozulmuş NK hücre sitolitik fonksiyonu ve bozulmuş sitokin üretimi belirlenmiştir (Dunn ve ark., 2009; Wu ve ark., 2009). Ayrıca HBeAg proteininin N-terminal 10 aminoasitlik dizisi içinde bulunan Box-2-like TIR motifi TLR sinyal yolaklarını bozarak adaptör proteinler olan MaI, TRAM ve TRIF proteinlerinin sentezini engeller ve TIR-nedenli nükleer faktör kB ve IFN beta aktivasyonunu baskılar. Bu mekanizma doğuştan gelen immün yanıtın HBeAg tarafından immünolojik olarak düzenlenmesini, dolayısıyla kronik HBV'nin immün töleran fazını (perinatal HBV infeksiyonuna immün sistemin töleransını) açıklamaktadır. HBeAg (+) KHB'li hastaların hepatositleri kupffer hücreleri ve perifer kan monositleri üzerinde sentezlenen TLR-2 ve TNF alfa ekspresyonu düşük seviyede belirlenirken HBeAg(–) KHB'li hastalarda yüksek bulunmuştur. HBeAg antijeninin kaybı hepatositlerin sitoksik T lenfositleri ile yok edilmesini önlemektedir. Fakat HBeAg varyantlarının seçilimi artan viral aktivite ile ilişkili olup daha şiddetli karaciğer hasarına ve kötü prognoza neden olabilir. HBV, normal IFN alfa düzenlenmesini bozarak çekirdek translokasyon sinyal iletimine ve transkripsiyon I aktivatörünün (STAT-1) indüklenmesini engellemektedir. Ayrıca HBV STAT metilasyonunu ve hücresel DNA metil transferazlarının (DNMT) aktivitesini etkileyebilmektedir (Lang ve ark., 2011; Park ve ark., 2007).

Yapısal olmayan HBx proteini in vitro ortamda retinoik asit indüklenebilir gen I (RIG-I)- melanoma farklılaşma ilişkili gen 5 (MDA5) yolağını baskılayarak mitokondrial antiviral sinyal proteininin downregülasyonu ile doğal immüniteye müdahale etmektedir. Ayrıca, plazma-türevli HBsAg subviral partiküller TLR9'u inhibe ederek IFN alfa üretimini sitokin sinyal 1 ekspresyon süpresörünün uyarımı ile engellemektedir (Wei ve ark., 2010; Xu ve ark., 2009). Ayrıca, HBV adaptif immün yanıta çoklu mekanizmalar ile müdahale eder. İlk fonksiyonel virüs-spesifik $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücre yanıtları immün baskılayıcı sitokin IL-10'nun aşırı üretimi

ile baskılanır. Tip I IFN, IL-15 ve IFN- λ1 ise indüklenmez (Dunn ve ark., 2009). Kronik HBV'li hastalar ile spontan klirensli kişiler karşılaştırıldığında, spontan klirenslilerde HBV spesifik $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin yüksek düzeyde ve fonksiyonel olduğu belirlenmiştir (Bertoletti ve ark., 2009). KHB, $CD8^+$ T hücrelerinin liziz, çoğalma ve sitokin üretme (TNF-α ve IL-2, IFN-ɣ) yeteneğinin bozulduğu gösterilmiştir. Varsayılan hipotez ise HBV antijenlerinin (HBeAg ve HBsAg) yüksek seviyelerine maruz kalan yorgun T hücrelerinin varlığıdır. HBsAg'nin yüksek miktarlarının yorgun $CD8^+$ ve $CD4^+$ T hücreleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu mekanizmalar HBV'nin kronikleşmesini sağlamaktadır (Kondo ve ark., 2013).

1.2.5. HBV'yi ve Hücresel Yolakları Etkileyen Karşılıklı Etkileşimler

Çok sayıda transkripsiyon faktörleri hepatik metabolik sürece karışmaktadır. Bu aktivasyon süreçlerinden hepatosit nükleer faktör, cAMP yanıt elementi bağlama proteini, retinoid x reseptör ve peroksizon proliferatör aktive edice reseptörler HBV genomuna bağlanır ve cccDNA minikromozom üzerinde KC-zenginleştirilmiş transkripsiyon faktörlerinin toplanması viral gen ekspresyonunun kontrolü için başlıcadır. Ayrıca viral moleküller ve hücresel faktörler arasındaki etkileşimler KC metabolizmasını etkileyebilmektedir (Bar-Yishay ve ark., 2011). Glikokortikoidler bir steroid hormon olup glikoz dengesinde önemli role sahiptir. HBV genomu üzerinde glikokortikoid yanıt elementinin varlığı steroid temelli immünosüpresif ilaç alan hastalarda HBV reaktivasyonunun gözlenmesini açıklamaktadır. HBV glikoz dengesi arasındaki klinik ilişkinin eksikliğine rağmen HBV'nin lipogenezi ilerlettiği, yağ asit birikimine neden olduğu HBV infekte hepatositlerde gösterilmiştir (Bar-Yishay ve ark., 2011; Hajjou ve ark., 2005). Ayrıca HBx proteini çok sayıda transkripsiyon faktörleri, SRC ailesi kinazlarının, Ras-Raf-Mitojen aktive edici protein kinaz kaskatlarının aktivitesini değiştirerek ve mitokondrial fonksiyonunu ve protein degredasyonunu etkileyerek hücresel yolakları modifiye etmektedir (Kim ve ark., 2007; Yang ve Bouchard, 2012).

cccDNA temelli kromatin immüno çöktürme deneylerinde cccDNA asetilasyon durumu ile viral yük arasında ilişki olduğu ve epigenetik modifikasyonların cccDNA transkripsiyonunu etkilediği bildirilmiştir. HBx proteini cccDNA minikromozom üzerinde biraraya gelerek cccDNA bağlı histon asetilasyonuna yardım eder (Belloni ve ark., 2009). Ayrıca, HBx cccDNA'dan HBV RNA'ların transkripsiyonu için çok önemli rol oynamaktadır. DNA hipermetilasyonu cccDNA transkripsiyonunun baskılanmasını indükleyebilmektedir. Ayrıca HBx tümör süpresör genlerin hipometilasyonunun korunması için gerekli olan DNA metil transferaz (DNMT) transkripsiyonunu düzenleyerek epigenetik modifiye edici faktör olarak görev alır. HBx'in tümör süpresör genlerinin hipermetilasyonuna neden olması hepatokarsinogenezin hızlanmasına neden olmaktadır (Kim ve ark., 2011).

Birçok çalışma konağın genetik varyasyonlarının HBV infeksiyonunun sonucuna katkıda bulunduğunu göstermiştir. Tüm genom bağlantı çalışmaları (GWAS) insan lökosit antijeni (HLA) allelleri DRB1, HLA-DPA1, HLA-DPB1 ve östrojen reseptöründeki polimorfizmlerin HBV'nin klirensi ya da kronikleşmesinde rol aldığını tespit etmiştir. Benzer şekilde doğal olarak oluşan CXCL10 geninin promotör bölgesindeki dizi varyasyonlarının bu proteinin ekspresyonunu değiştirdiği ve böylece inflamatuvarr hücrelerin intrahepatik toplanmasında önemli rol oynayarak KHB'nin progresyonunu etkilediği bildirilmiştir (Dandri ve Locarnini, 2012).

1.2.6. HBV Enfeksiyonunun Tedavisi

Tarihsel olarak tedavinin amacı vireminin azaltılması ve hepatik fonksiyon bozukluğunun düzeltilmesi dolayısıyla siroza ilerlemeyi, KC dekompansazyonunu ve HCC gelişmesini önlenmesi idi. Bu amaçla tedavi sonlandırma noktası virolojik (HBV DNA azalması), serolojik (HBeAg/HBsAg kaybı/serokonversiyonu), biyokimyasal (ALT'nin normalleşmesi) ve histolojik (nekroinflamasyonda azalma veya fibrozisin gerilemesi) yanıtlardır (Kuo ve Gish, 2012). Hepatit C'de yeni ve küratif tedavilerin bulunması HBV tedavisinde kür kavramının tartışılmasına neden olmuştur. HBV infeksiyonunda kürün (tam iyileşme) tanımı Block ve arkadaşları tarafından şu şekilde tekrardan yapılmıştır:

a) Tam kür: Hastaların tamamen virüsü temizlemesi ve sağlıklı duruma geçmesidir.
b) Fonksiyonel kür: Hastalar spontan klirensli kişiler gibi sağlıklı durumdadır, fakat siroz ve HCC gelişme olasılığı benzerdir.
c) Belirgin virolojik kür: Virolojik markırların kalıcı olarak ilaçsız baskılanması ve KC fonksiyonlarının normalleşmesi halidir.
d) Sonraki tanımı kalıcı virolojik yanıttır (KVY). Bu kürde serumda sirküle olan tüm viral antijenlerin kaybı söz konusudur. Bunun da sebebi cccDNA'nın baskılanmasıdır. Bu kür sağlansa bile anti-inflamatuvar tedavilerle (immünsüpresif ilaç kullanımı) HBV infeksiyonu tekrardan aktive olabilmektedir. Okült HBV infeksiyonunda bile (HBsAg'nin tam olarak serumda gözlenmemesi, HBV DNA'nın çok düşük ya da negatif) olduğu bu fazda siroz ve HCC gelişme riski vardır.
e) Sterilize kür: Tamamen cccDNA ve integre olmuş virüsün hepatositlerden temizlenmesi ile tüm viral DNA'nın tamamen vücuttan uzaklaştırılması durumudur fakat mümkün görünmemektedir. Bu gelecek tedavilerin ana amacıdır (Block ve ark., 2013).

Tedaviyi sonlandırmak için kişinin belirgin virolojik veya fonksiyonel kürü başarması yeterlidir. HCC riski yönünden HBeAg, HBV DNA ve HBsAg kaybının önemli olduğu, özellikle HBV DNA ile HBsAg'nin serumdan temizlenmesi HCC riskinin azalması için bir prediktördür. HCC'nin kümülatif insidansı, HBeAg (-), tespit edilebilir HBV DNA ve HBsAg olanlarda % 14.2, HBV DNA ve HBsAg seroklirensli kişilerde %4, sadece HBV DNA seroklirensine sahip olanlarda % 6.6'dır (Liu ve ark., 2014).

1.2.6.1. Uygulanan Tedaviler

Tedavide kullanılan 7 ilaç FDA'dan (Food and Drug Administration) onay almıştır. Standart veya pegile-interferon ve 5 oral nükleoz(s)it analoglarıdır. Şu andaki geçerli tedavi rehberine göre yüksek HBV DNA, ALT, AST'ye sahip olanlar

tedaviye aday olarak görülmektedir (EASL, 2009; Liaw ve ark., 2008; Lok ve McMahon, 2009).

Reverse transkriptaz inhibitörleri: Nükleoz(t)it analogları (NUC) HBV polimerazın revers transkriptaz fonksiyonunu hedef alır ve böylece HBV polimeraz pregenomik RNA'dan viral DNA sentezini gerçekleştiremez. Nükleoz(t)it analogları 3 grupta toplanmıştır.

a. L-nükleozit analogları: Lamivudin ve Telbivudin
b. Asiklik fosfonatlar: Tenofovir ve Adefovir
c. Deoksiguanozin analogları: Entekavir

Bunlardan entekavir ve tenofovir çok güçlü antiviral aktiviteye sahiplerdir. Hastaların serumlarında HBV DNA kaybını, ALT normalleşmesini ve histolojik iyileşmeyi sağlamaktadır. HBeAg (+) hastalarda NUC kullanımı % 78 oranında HCC riskini azaltmaktadır (Sung ve ark., 2008). HBeAg'nin serumdaki kaybı ile birlikte Anti-HBeAg oluşumu hepatik dekompansasyon riskini azaltıp sağkalımı artırmaktadır (Lok ve McMahon, 2009).

NUC analogları ile 48-52 haftalık tedavi sonucu hastaların %20'sinde HBeAg serokonversiyonu gerçekleşir fakat tedavi bırakıldığında yaklaşık %50'sinde tekrar HBeAg (+) görülür. Uzun dönem NUC kullanımı sonrası gelişen HBeAg(-) durumu siroz ve HCC riskini tamamen ortadan kaldıramamaktadır. HBeAg durumu artık çok yararlı bir biyomarkır olarak görülmemektedir (Chien ve Liaw, 2008).

Uzun dönem NUC kullanımı ile ilgili temel sorun antiviral ilaç direncidir. Antiviral direnç oranı tedavi öncesi HBV DNA seviyesi, viral baskılanmanın hızı ve tedavi süresi ve daha önceki NUC kullanımı ile ilişkilendirilmiştir (Frenette ve Gish, 2009; Liu ve ark., 2014). NUC'lar arasında en yüksek direnç gelişimi lamivudin'e en düşük direnç gelişimi ise entekavir ve tenofovir'de görülmektedir. NUC tedavisine genellikle HBsAg kaybı olana kadar devam edilir. Fakat HBsAg kaybı 3-5 yılda yaklaşık %3-5 gibi düşük orandadır. HBsAg kaybı için HBeAg(+)'ler için ortalama 36 yıl, HBeAg(-)'ler için 39 yıl NUC kullanımı gerekmektedir. Bunun sebebi

NUC'ların (revers transkriptaz inhibitörleri, RT) direkt olarak viral transkripsiyonu, translasyonu ve cccDNA'yı baskılayamamasıdır (Jafri and Lok, 2010).

Teoride tam bir viral baskılanma 10-20 hepatosit yarı ömründen sonra tüm infekte hücrelerin ölmesidir. Pratikte ise uzun dönem tedavilerde bile, serum HBV DNA'nın negatifleşmesine rağmen replikasyonun tam baskılanamaması, cccDNA ve ilaca dirençli viral rezervuarların olması kalıcı virolojik yanıta engel olmaktadır (Block ve ark., 2013). Lai ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ortalama 10.5 yıllık NUC tedavisi sonucu serum viral DNA'sı 6 log'dan fazla azalırken, serum HBsAg % 71.5, intrahepatik HBV DNA %99.9 (3 log) ve cccDNA %99.9 azaldığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada hastaların %45'inde cccDNA belirlenemezken, tüm hastaların çok azında HBV DNA'ya rastlanmıştır. Bunun anlamı nadiren fonksiyonel ya da belirgin kür sağlamakta dolayısı ile yaşam boyu NUC kullanılmalıdır (Lai ve ark., 2014).

İnterferon Alfa (IFN- α) ve Pegile-İnterferon Alfa (PegIFN- α): Alfa interferonlar antiviral, antiproliferatif ve immün düzenleyici etkilere sahip sitokinlerdir. IFN-α'nın kendi reseptörüne bağlanması sonucu Janus kinaz (JAK) ile sinyal ileticiler ve transkripsiyon aktivatörleri (STAT) arasında çoklu etkileşimler meydana gelmesi ile çeşitli IFN α'nın uyardığı gen dizilerini ve birçok antiviral proteini aktive eder (Der ve ark., 1998; Rawlings ve ark., 2004). IFN-α'nın antiviral durumu başlatma yeteneği konağın immün savunması için hayati derecede önemlidir. IFN-α'nın HBV transkripsiyonunu, nükleokapsit oluşumunu ve stabilitesini, HBV'nin protein prosesini, HBV RNA'ların ve pregenomik RNA'nın çekirdekten salınımını ve stabilitesini inhibe etmektedir. Ayrıca IFN-α doğal ve adaptif immün yanıtını pozitif yönde etkilemektedir (Pei ve ark., 2014; Goodbourn ve ark., 2000). MHC sınıf I protein ekspresyonunu artırarak $CD8^+$ T hücre yanıtının artmasına neden olur. Bunlara ek olarak makrofaj aktivitesini NK hücre sitotoksitesini, CTL aktivitesini ve nötrofil aktivasyonundaki azalmayı tetiklemektedir. IFN-α diğer sitokin ve kemokinlerin aktivitesini düzenleyerek konağın doğal immün yanıtından etkili adaptif immün yanıta geçmesini sağlamaktadır (Brassard ve ark., 2002).

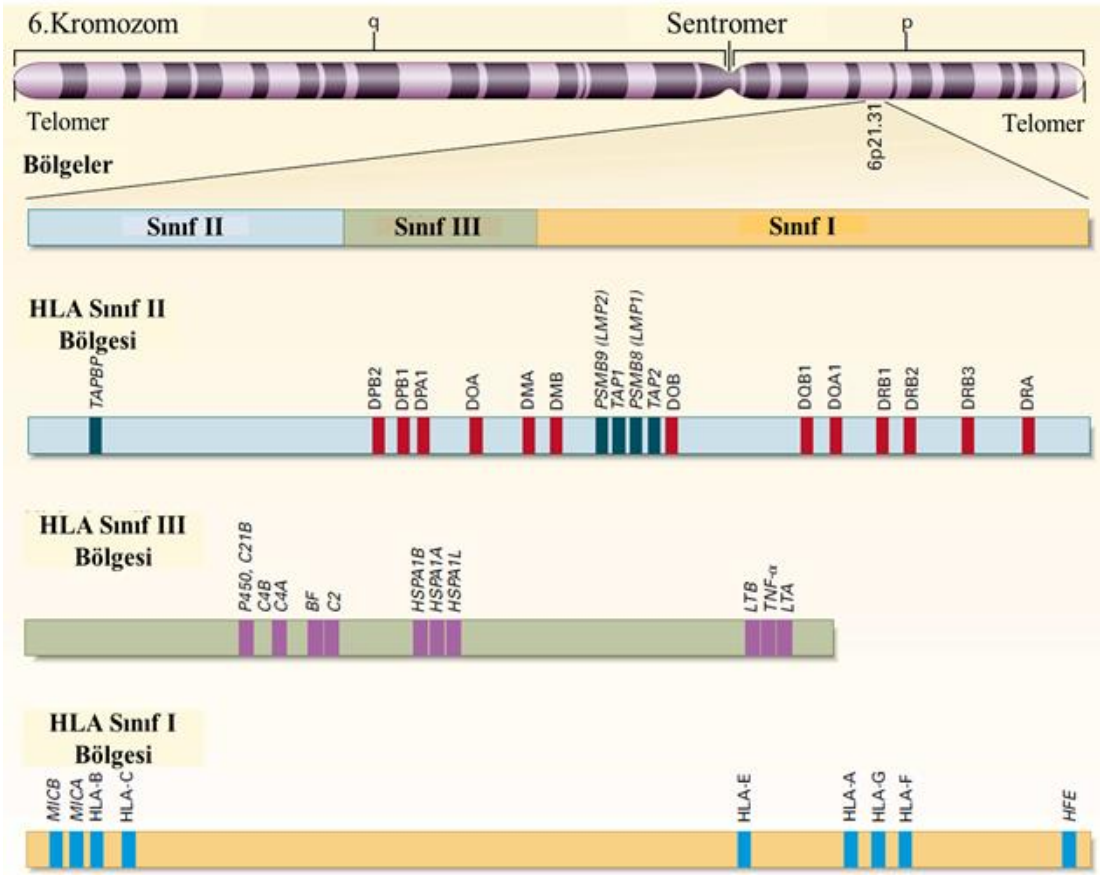
IFN-α 1990 yılında ticari olarak lisans almıştır. Tedavi süresinin sınırlı olması (6 ay veya 1 yıl) ve direnç mutasyonuna sahip olmaması avantajlı yönüdür. PegIFN

48 hafta için her hafta 1 sefer deri altından enjekte edilir. HBeAg (+) olan hastaların % 25'inde serum HBV DNA kaybı görülür. Tedavi sonu viral baskılanma lamivudin ile uygulandığında belirgin olarak görülmektedir. HBeAg serokonversiyonu %27'dir. HBeAg (-) hastalarda IFN ile lamivudine tedavisi viral baskılamayı belirgin olarak göstermektedir. PegIFN ile tedavi edilenlerde HBsAg kaybı 48-52 haftada e antijenine bakmaksızın % 3-8'dir (Buster ve Janssen, 2006; Lampertico, 2015; Lok ve McMahon, 2009). HBsAg klirensi tedavi bırakıldıktan yıllar sonra devam ettiği gösterilmiştir. Ortalama tedavi sonraki 8.8 yılda HBeAg (+) hastalarda, HBsAg kaybı hastaların % 23'ünde gerçekleşmiştir. Diğer bir çalışmada ise HBeAg (-) hastalarda PegIFN-α ile tedavi bitiminden 4 yıl sonra hastaların %11'inde HBsAg kaybı görülmüştür (Yalnızca lamivudin alanlara kıyasla % 2'dir) (Marcellin ve ark., 2008).

IFN-α'nın dezavantajı parenteral (derialtı, adele içi) uygulanması ve yan etkisidir. Dekompanse sirozlu hastalarda şiddetli sepsis ve kötüleşen karaciğer bozukluğu nedeniyle uygun değildir (kontrendikedir). Ayrıca şiddetli alevlenmesi olan HBV'lilerde, akut karaciğer bozukluğunda, immünsüpresif ve kemoterapi alanlarda uygun değildir. Çok yaygın yan etkileri baş ağrısı, ateş, üşüme, kas ağrısı ve halsizliktir. Ayrıca huzursuzluk ve depresyon hali tedavi süresince artmaktadır. Yüksek ALT'ye sahip olma durumu IFN-α ya yanıt için bir prediktördür (Flink ve ark., 2005; Lok ve McMahon, 2009).

1.3. Majör Histokompatibilite Kompleksi (MHC)

MHC tüm omurgalılarda geniş bir gen ailesi tarafından kodlanan bir hücre yüzey molekülüdür. İnsanlarda MHC moleküllerine ilk kez lökositlerde rastlandığı için insan lökosit antijeni (human leukocyte antigen) (HLA) ismi verilir. Yüksek polimorfizme sahip olup evrim süresince çok iyi korunmuş bölgelerden birisidir. MHC ilk olarak farelerde kromozom 17'de gösterilmiş ve H-2 lokusu olarak adlandırılmıştır. İnsanlarda MHC gen bölgesi, 6.kromozomun kısa kolunda, 6p21.3 bölgesinde telomere yakın bir yerdedir ve yaklaşık olarak 3600 kb uzunluktadır (Şekil 1.5.) (Klein ve Sato, 2000).



Şekil 1.6. HLA molekülünün genomdaki yeri ve organizasyonu (Klein ve Sato, 2000)

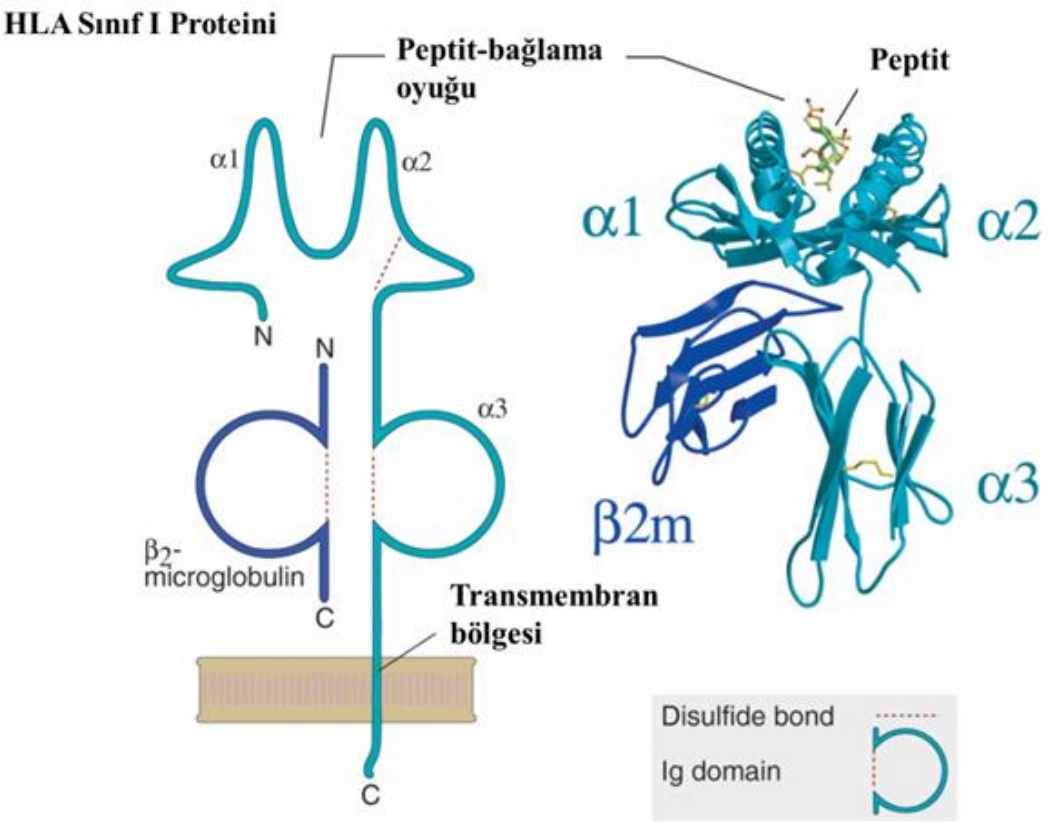
Telomerden sentromere doğru HLA Sınıf I, Sınıf III ve Sınıf II bölgeleri yer almaktadır. Sınıf-I bölgesinden HLA-A, HLA-B, HLA-C klasik molekülleri kodlayan genleri ve ağır zincirleri kodlayan klasik olmayan HLA-E, -F, -G genleri ile bunlara ek olarak MHC Class-II Endosomal Compartment (MICA, MICB) moleküllerinin kodlandığı genleri bulundurmaktadır. Ayrıca birçok psödogenleri bulundurur. HLA Sınıf II bölgesinde bulunan HLA-DRA, -DRB, -DQA, -DQB, -DPA, -DPB, -DMA, -DMB ve -DOA genlerinden α ve β zincirleri kodlanmaktadır. Ayrıca Sınıf-I HLA-protein komplekslerinin oluşumu sırasında peptidlerin endoplazmik retikuluma taşınmasını sağlayan Antijen prosesi ilişkili taşıyıcı (Transporter Associated with Antigen Processing, TAP1 ve TAP2) genleri de Sınıf-II bölgesinde yer almaktadırlar. Bunlara ek olarak çeşitli psödogenler de bulunmaktadır. HLA Sınıf III bölgesinden ise kompleman C4 ve C2, Faktör B, 21

hidroksilaz, TNF, ve Heat Shock Protein (HSP) genleri kodlanmaktadır (Forbes ve Trowsdale, 1999; Klein ve Sato, 2000).

1.3.1. İnsan Lökosit Antijeni Moleküllerinin Yapısı

HLA kompleksi 6. kromozom üzerinde bulunan yaklaşık 200 genin yaklaşık 40'ından sentezlenir. Geri kalan genlerin bir çoğu fonksiyonel olarak ilişkili olmasına ragmen evrimsel olarak HLA genleri ile ilişkili değildir. Bu kompleks içindeki çoğu genin immünite ile ilişkisi yoktur. HLA genlerinden sınıf I ve sınıf II molekülleri sentezlenir, bu moleküller yapısal ve fonksiyonel olarak farklıdır (Klein, 1986).

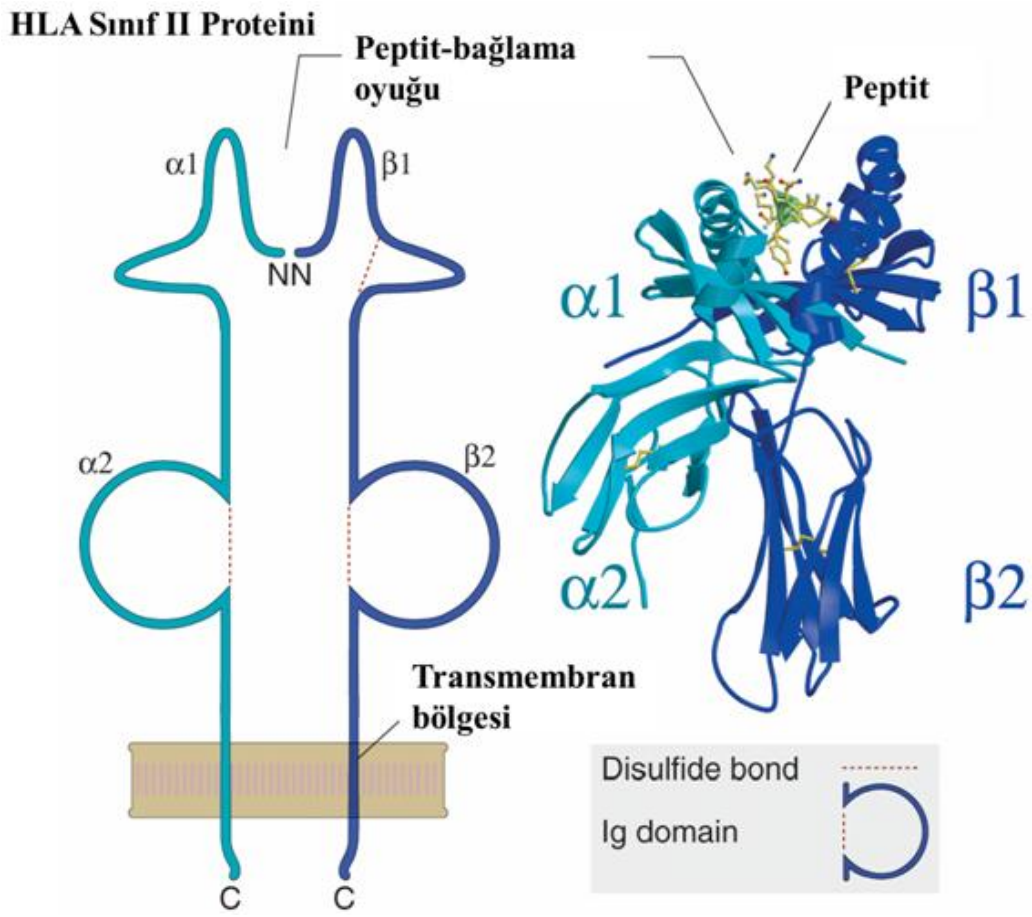
HLA sınıf I proteinleri; alfa ve beta zincirinden oluşmuştur (Şekil 1.6). HLA sınıf I proteinin α zinciri 44-47 kD ağırlığındadır, β_2 mikroglobulin zinciri ise 12 kD' dur. α zinciri 5 alana sahiptir. Bu alanlar α1, α2, α3, transmembran ve sitoplazmik kuyruktur. Polimorfizm gösteren bölgeler peptit bağlama oluğunu oluşturan α1 ve α2 bölgeleridir. α3 bölgesi ise sitotoksik T-hücre üzerindeki CD8 reseptörü ile etkileşimden sorumludur. Molekül katlandığında α1 ve α2 bölgeleri peptid bağlama oluğunu meydana getirir. β2 mikroglobulin zinciri HLA lokusu dışında 15.kromozomda bulunan β2 mikroglobulin geni üzerinden kodlanır ve polimorfizm göstermez (Abbas ve Lichtman, 2003). HLA Sınıf I proteininde küçük beta zinciri sabittir ama hücrenin dış tarafında yerleşmiş olan proteinin alfa zincirinin özel bölgelerindeki aminoasit sırası ileri derecede değişkenlik gösterir. Her insan HLA Sınıf I'deki proteinlerinde 6 farklı alfa zinciri üretir. İnsan toplumunda sayısız varyantları vardır, en polimorfik proteinler arasında yer alır. Bireyler 6 farklı HLA Sınıf I proteini oluşturdukları için herhangi iki bireyin aynı grubunun olması olası değildir. HLA Sınıf I proteinleri proteolitik parçalanmadan ve hücre içinde rastgele meydana gelen protein dönüşümünden kaynaklanan peptitleri bağlar ve ortaya çıkartır. HLA sınıf I molekülleri 8-11 aminoasit uzunluğundaki polipeptidleri CD8+ T-hücrelere sunar (Nelson ve Cox, 2005).



Şekil 1.7. HLA Sınıf I Molekülünün Yapısı (Abbas ve ark., 2003)

HLA Sınıf II proteinleri; α zinciri (32-34 kD) ve β zincirinden (29-32 kD) oluşur. HLA Sınıf II proteinleri hem alfa hem de beta zincirleri aminoterminal uçlarına yakın göreceli olarak ileri derecede değişkenlik gösteren bölgelere sahiptir (Şekil 1.8). Polimorfizm gösteren bölgeler, α1 ve β1 bölgeleridir. β2 bölgesi yardımcı T hücre yüzeyindeki CD4 reseptörüne bağlanmadan sorumludur. HLA Sınıf II molekülleri 10-30 aminoasit uzunluğundaki polipeptidleri CD4+ T-hücrelere sunarlar. HLA Sınıf II proteinleri yabancı antijenleri içine alan birkaç tip özelleşmiş hücrenin yüzeyinde oluşur (makrofajlar ve B lenfositleri gibi). Sınıf II proteinleri de insan toplumunda birçok varyantı ile ileri derecede polimorfiktir. Bütün insanlar 12 kadar varyant oluşturabilir ve böylece herhangi iki insanın aynı gruptan varyanta sahip olması muhtemel değildir. HLA Sınıf II proteinleri hücreler tarafından sindirilen hücre dışı proteinlerden kaynaklanan peptitleri bağlar ve hücre yüzeyine çıkarır. HLA Sınıf II protein-peptit kompleksleri çeşitli yardımcı T hücrelerinin (Th)

T-hücre reseptörlerinin hedeflerine bağlanır (Abbas ve ark., 2003; Nelson ve Cox, 2005).



Şekil 1.8. HLA Sınıf II Molekülünün Yapısı (Abbas ve ark., 2003)

Sınıf I genlerinin dokuya bağlı olarak ekspresyonu değişmesine rağmen çoğu somatik hücrelerce sentezlenir. Buna zıt olarak sınıf II genleri normalde immün hücrelerin alt grublarınca eksprese olur. Bu hücreler B ve aktive olmuş T hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücrelerdir. İnterferon- ɣ varlığında diğer hücreler de sınıf II moleküllerini eksprese edebilir. Her iki sınıf I ve sınıf II moleküllerinin fonksiyonu patojen türevli kısa peptitleri T hücrelerine sunmaktır, böylece adaptif immün yanıtı başlatırlar (Klein ve Sato, 2000).

1.3.2. HLA Moleküllerinin Antijen Sunumu

Hücreler mükemmel bir çöp öğütme ve işleme sistemi ile donatılmıştır. Özel bir molekül ubiqutin yıpranmış ya da zararlı proteinleri çöp yığını için işaretlerler. Bu proteinlerin üç boyutlu yapıları özelleşmiş molekül olan şaperonlar ile açılır ve polipeptit zincirleri daha sonra fıçı şeklindeki proteozomlara küçük peptit parçalarına ayrılması için yönlendirilir. Proteozomlarda meydana gelen küçük peptitler sitozolde amino asitlere doğrudan degrade olur ya da endoplazmik retikuluma gönderilir (Şekil 1.9) (Glas, 1998; Klein ve Sato, 2000; Parham, 1999).

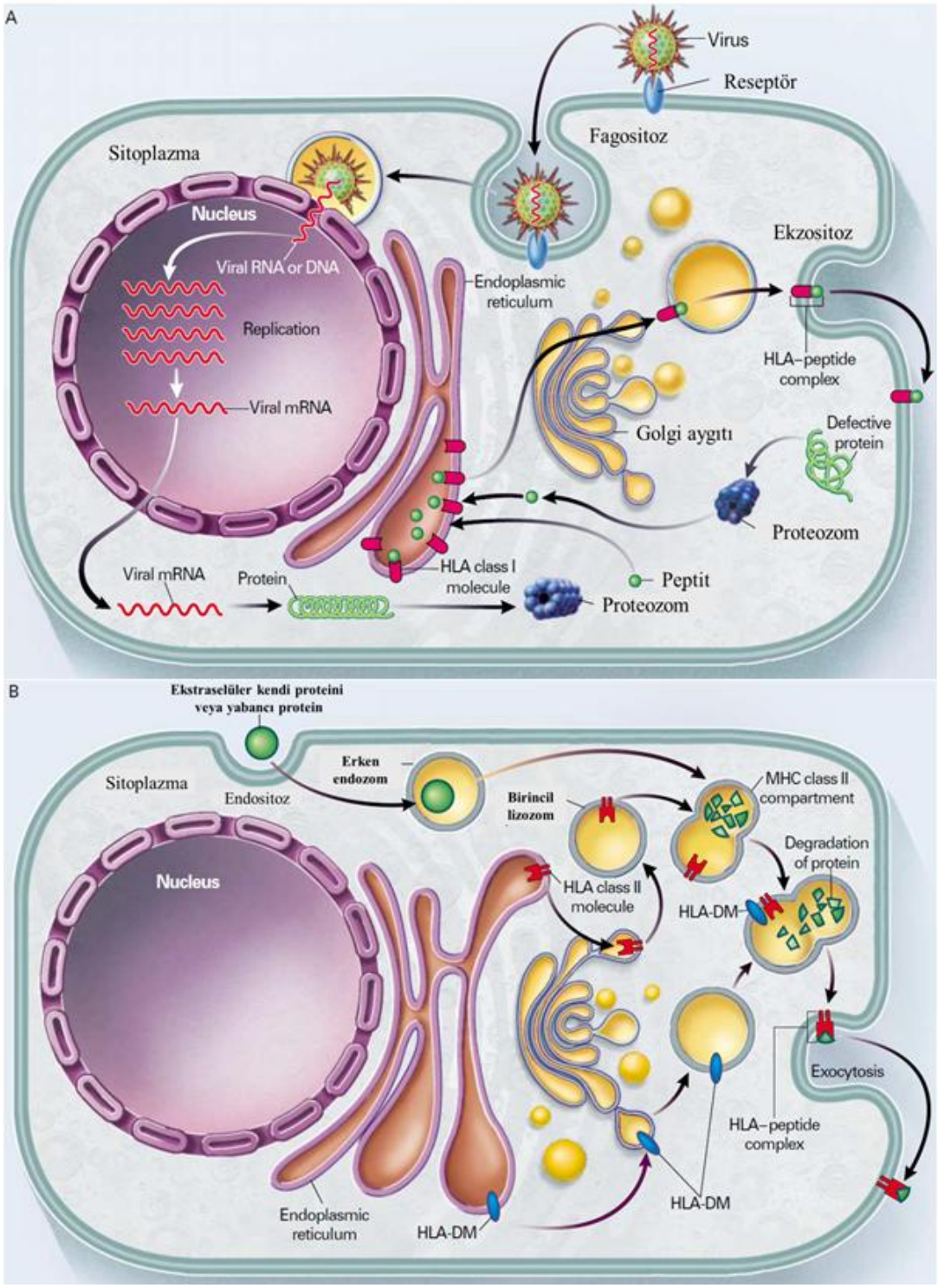
Hücre dışı proteinler parçalanma için farklı bir yol izler. Onlar küçük keselerde toplanır ve plazma membranından sitoplazmaya taşınır. Keseler sonra endositoz vezikülleri gibi kıvrımlı hale getirilip proteolitik enzimlerle yüklü lizozomlar ile kaynaşarak endozom formu oluşturur. Endozom içinde yutulmuş proteinler parçalanır ve bazı veziküllerde yeniden aminoasitlere ayrılır (Parham, 1999).

Bu proses yaşamın ilk zamanlarında geliştirilmiştir. Sonraki zamanlarda çeneli omurgalılarda vücudun patojenlere karşı savunulmasında kullanılmıştır. Normalde proteinler organizmanın kendisi için tekrardan döngü prosesine dahil edilirken enfekte hücrelerdeki patojen kaynaklı proteinler hücrenin yok edilmesi için kullanılır. Çeneli omurgalılar dışında kendinden olmayan proteinleri tanıyan başka organizma yoktur (Klein ve Sato, 2000).

Enfekte olan hücrelerde proteozomlar sürekli olarak kendi peptitlerini yapar. Peptitlerin bazıları özel moleküller olan “antijen prosesi ile ilişkili taşıyıcılar” (transporter associated with antigen processing, TAP) ile seçilip alınır. TAP 1 ve TAP 2 proteinleri endoplazmik retikulum membranı arasından peptitlerin taşınması için bir kanal şekli oluştururlar (Klein ve Sato, 2000; Parham, 1999). Proteozomlar tarafından salınan peptitler TAP molekülünün sitolozik yüzeyine bağlanır ve bu kanal aracılığı ile taşınır. Endoplazmik retikulumun luminal yüzeyi üzerinde HLA sınıf I molekülleri sıralanmıştır. Sınıf I molekülleri α ve β2 mikroglobulin zincirinden oluşur. Bu polipeptit zincirleri ribozomlar üzerinden ayrı ayrı sentezlenir ve endoplazmik retikulumun sitoplazmik yüzeyine bağlanır, fakat bir araya

gelmezler. Bu zincirler endoplazmik retikulumun lüminal yüzeyine özel kanallar ile gelir. Burada şaperon molekül takımı (calnexin, calreticulin, endoplazmik reticulum p57, TAP-bağlama protein) ile erkence katlanmaları engellenir. Zincirler glikozile edildikten sonra uygun zamanda α ve β2 mikroglobulin zinciri non-kovalent olarak bir araya gelir. Sınıf I molekülü sonra TAP-bağlama proteini ile hareketsiz hale getirilerek TAP molekülünden peptit yüklemesi yapılır. Bekleyen sınıf I molekülüne TAP kanalından gelen uygun peptit sınıf I molekülünün peptit bağlama oluğuna takılır. Yüklenen peptitten TAP-bağlama proteini ve TAP molekülünün oluşturduğu kompleks çıkartılarak peptit yüklü HLA sınıf I molekülü hücre yüzeyine doğru yola çıkar. Sınıf I molekülü α zincirinin transmembran bölgesi ile plazma membranında sabit bir konumda bekler (Klein ve Sato, 2000; Parham, 1999).

HLA sınıf II molekülleri ise endositik protein proses yolağı ile peptitleri alır. Sınıf I molekülünün zincirleri gibi sınıf II zincirleride endoplazmik retikulumun sitolozik yüzünde ayrı ayrı üretilir ve sonra şaperonlar aracılığı ile bir araya getirilip katlanır ve luminal yüzeyde toplanır. Sınıf II moleküllerine peptitler endoplazmik retikulumda yüklenmez. Onun yerine endoplazmik retikulumda üretilen bir sabit zincir ile birleşir. Sabit zincirin bir kısmı sabitleyici olarak rol alır. Böylece hazır olmayan peptitler yüklenmez. Kapalı membran vezikülü ile sınıf II molekülü ve sabit zincir kompleksi sitoplazma bölgesine taşınır. Protein yüklü endozom ile bu vezikül birleşerek MHC sınıf II kompartımanını oluşturur. Ekzojen protein ve sabit zincir bu kompartımanda parçalanır (Klein ve Sato, 2000; Parham, 1999).



Şekil 1.9. HLA sınıf I ve sınıf II antijen sunumu (Klein ve Sato, 2000)

Endoplazmik retikulumda üretilen sınıf II HLA-DM molekülü bu kompartımana gelerek peptitlerin sınıf II molekülüne yüklenmesine yardım eder. Sonra peptit yüklü sınıf II kompleksi hücre yüzeyine taşınır ve CD4 (+) T hücrelerine sunulur. Sınıf I moleküllerine peptit yükleme prosesi hücrelerin çoğunda olur çünkü her zaman yıpranmış, hasarlı ve yanlış katlanmış proteinler olur. Bu proteinler degrade edilerek yenisi ile değiştirilir. Bazı proteinler ise sitozolde enzimlerce peptitlere parçalanır. Buna zıt olarak eksojen proteinlerin prosesi ve sınıf II moleküllerine peptit yüklemesi B hücreleri, makrofajlar ve dendritic hücrelerce sınırlıdır. Eksojen kaynaklı peptitle yüklü (bakteriyal ve virus proteinleri) sınıf I molekülü ve endojen peptit yüklü (viral protein) sınıf II moleküllerinin var olmasına rağmen mekanizması açıklanamamıştır (Klein ve Sato, 2000; Parham, 1999).

Protein prosesinin sonucu hücre yüzeylerinde peptit yüklü HLA molekülleridir. Her hücre HLA genlerinden her birinden 100 ile 300 bin sınıf I ve sınıf II molekülü sentezler. Çünkü her bir HLA molekülü bir peptit bağlar. Her bir enfekte olmayan hücre kendi peptitlerinin binlercesini sunduğu HLA molekülüne sahiptir. Bu peptitlerden bazıları bir kaç kopya ile çoğu peptit ise 100 veya daha fazla kopya ile hücre yüzeyinde sunulur (Glas, 1998; Rammensee, 1997).

1.3.3. HLA Polimorfizmleri

Polimorfizm, bir tür veya popülasyon içinde farklı şekiller ve özellikler gösterme halidir. Alel, bir genin birden fazla çeşidi olması halidir. Gen polimorfizmleri ise tek nükleotit polimorfizm olarak (single nucleotide polymorphisms, SNP) adlandırılır ve genomik DNA'nın bir popülasyonun normal bireyleri arasında farklılık gösterdiği tek baz-çifti değişlikleridir (Mannsmann ve Herzig, 2010). Gen polimorfizmleri popülasyonda yaygın görülür, etnik ve coğrafi bölgelere göre farklılıklar gösterirler. Polimorfizm, bulunduğu yere göre hücre metabolizması için önemli sonuçlara neden olabilir. DNA tamir mekanizması, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi, patojen tanıma ve sunma mekanizması gibi önemli yolaklarda rol alan genlerin kritik pozisyonlarında bulunması organizma için çok büyük etkiye sahip olabilmektedir.

Polimorfizme bağlı olarak genin transkripsiyonu, kodladığı proteinin, fonksiyonu, üç boyutlu yapısı ya da aktivitesi önemli ölçüde etkilenebilir. Hücre metabolizması için kritik önem taşıyan proteinlerin fonksiyonunun bozulması çeşitli hastalıklara yol açmakta veya bazı hastalıklar için yatkınlık riskini artırmaktadır. Tek-baz değişimleri ile ilişkili olarak ortaya çıkan hastalıklara örnek olarak trombofili, kistik fibrozis verilebilir (Jacques ve ark., 1996; Kauwell ve ark., 200). Polimorfizmin sebepleri; nokta mutasyonları, rekombinasyon ve gen dönüşümü mekanizmalarıdır. Nokta mutasyonları DNA replikasyonu sırasında HLA alellerinde sıklıkla ortaya çıkan tek nükleotit değişimleridir. Rekombinasyon, HLA alelleri arasında segmentlerin yer değişmesidir. Gen dönüşümü mekanizmasında ise, bir dizinin başka bir alel veya genden değişimi söz konusudur. HLA alellerinin özellikle otoimmün hastalıklarda etkili olduğu bildirilmiştir. Ankilozan spondilit ile HLA B27 alelinin ilişkili olduğu birçok hastada belirlenmiştir. Ayrıca romatoid artrit, insulin bağımlı diyabet ve doku naklinde HLA alellerinin çok etkili olduğu bildirilmiştir (Kaufman, 2000; Rodney, 2000).

HBV enfeksiyonunun klinik sonucu spontan klirensten kronik HBV enfeksiyonuna, siroz ya da karaciğer kanserine kadar değişebilir. Hastalığın seyri viral, çevresel ve konak faktörlerine göre değişebilmektedir (Xianzhong ve ark., 2014; Ganem ve ark., 2004). Kronik HBV enfeksiyonuna karşı koruyucu etkisi ile ilişkili ilk rapor edilen HLA DRB1*1302 alelidir (Xianzhong ve ark., 2014; Thursz ve ark., 1995). Buna müteakip çalışmalar diğer HLA genlerinin HBV klirensinde etkili olduğu bildirilmiştir (Ahn ve ark., 2000; Thio ve ark., 2000). Geçmiş yıllarda başlayan GWAS çalışmaları ile hastalıklarla ilişkili yaygın genetik varyantların belirlenmesi devam etmektedir. Kronik HBV'ye (KHB) yatkınlığı sağlayan genetik varyantları belirlemek için iki-kademeli GWAS çalışması yapılmıştır (Kamatani ve ark., 2009). Bu çalışmada HLA-DP genindeki bir kaç polimorfizmin HBV riski ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Kamatani ve ark., (2009) Japon popülasyonunda yaptıkları bu GWAS çalışmasında HLA-DP gen bölgesinde 11 SNP'nin KHB ile güçlüce ilişkili olduğunu belirlemiştir. Bu SNP'ler; rs2395309, rs3077, rs2301220, rs9277535, rs3117222, rs3128917, rs3135021, rs9380343, rs9277341, rs10484569 ve rs2281388'dir. Özellikle HLA sınıf II molekülünün antijen sunum oluğunu oluşturan

HLA-DPA1 genindeki rs3077 (HLA-DPA1'den α1 zinciri sentezlenir) ve HLA-DPB1 genindeki rs9277535 (HLA-DPB1'den β2 zinciri sentezlenir) polimorfizmlerin istatistiksel olarak çok anlamlı olduğunu bulmuştur. O'Brien ve ark., (2011) Avrupa kökenli 651 sağlıklı bireylerin karaciğer dokusunda yaptıkları çalışmada HLA-DPA1 ve HLA-DPB1 genleri 3' kodlanmayan bölgedeki (3'untranslated region) rs3077 ve rs9277535 nolu polimorfizimlerin HLA sınıf II moleküllerinin mRNA sentezini etkilediğini bulmuşlardır. HLA-DPA1 rs3077 GG genotipinin HLA-DPB1 geninin mRNA ekspresyonunu azalttığını ve bunun risk genotipi olduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde HLA-DPB1 rs9277535 GG genotipinin HLA-DPB1 geninin mRNA ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Bunun sonucu olarak HLA sınıf II moleküllerinin zincir sentezinin yeterince yapılamayacağı HLA moleküllerinin sayısının düşüceği ve yeterli antijen sunumunun olamayacağı bildirilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. HLA Polimorfizmi İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Kamatani ve ark., 2009, Kronik HBV'de (KHB) HLA gen polimorfizmlerini belirlemek için iki-kademeli GWAS çalışması yapmıştır. Yapılan bu ilk çalışmada 786 Japon KHB hastası ile 2201 sağlıklı bireyin HLA-DPA1 ve HLA-DPB1 gen bölgesinde KHB ile ilişkili olan 11 SNP belirlenmiştir. Özellikle iki polimorfizmin (rs3077 ve rs9277535) KHB ile ilişkisi ikinci bir GWAS çalışması ile doğrulanmıştır. İkinci çalışmada Japon ve Taylandlı 1300 KHB hastası ile 2100 sağlıklı bireyde bu polimorfizmlerin KHB riskini istatistiksel olarak çok anlamlı bir şekilde artırdığı belirlenmiştir (sırasıyla P değerleri; P:$6.34x10^{-39}$ ve P: $2.31x10^{-38}$).

Png ve ark., 2011, Endonezyadan yapılan bu GWAS çalışmasında 3614 Hepatit B aşısı yapılan bireyde antikor titresi ile HLA-DPB1 rs9277535, HLA-DR rs3135363 ve HLA sınıf III geni rs9267665 polimorfizmleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. HLA-DPB1 geni rs9277535 koruyucu genotipine sahip olan bireylerde antikor titresinin çok yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Risk genotipine sahip bireylerin aşıya yanıt vermelerinin düşük olasılık olduğunu, aşıya yanıt verenlerin ise antikor titrelerinin düşük olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu bilgiler ışığında teorik olarak mümkün olan aşıya yanıt vermeyen kişiler ile infekte olmuş kişilerde yeni nesil ikinci kuşak HLA moleküllerinin geniş bir çeşidini içeren aşıların çok daha etkili antijen sunacağını ileri sürmüşlerdir.

Guo ve ark., 2011, Çin Han popülasyonunda yaptıkları çalışmada 521 KHB hastası ile 571 doğal bağışıklı ve 248 sağlıklı bireyde HLA-DP gen bölgesindeki 11 SNP'yi (HLA-DPA1'de 4 SNP, HLA-DPB1'de 7 SNP) çalışmışlardır. 11 SNP'ninde KHB ve spontan klirensle önemli derecede anlamlı bir ilişkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Rs3077 ve rs9277535 polimorfizmleri için bulunan P değerleri; KHB grubu ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında P: $6.7x10^{-7}$, P: $1.9x10^{-9}$ ve KHB ile spontan klirens grubu karşılaştırıldığında P: $7.89x10^{-7}$, P: $2.06x10^{-10}$'dur.

O'Brien ve ark., 2011, Avrupa kökenli 651 sağlıklı bireylerin karaciğer dokusunda yaptıkları çalışmada HLA-DPA1 ve HLA-DPB1 genleri 3' kodlanmayan

bölgedeki (3'untranslated region) rs3077 ve rs9277535 nolu polimorfizimlerin HLA sınıf II moleküllerinin mRNA sentezini etkilediğini bulmuşlardır. HLA-DP1 rs3077GG genotipinin HLA-DP1 mRNA ekspresyonunu azalttığını ve bunun risk genotipi olduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde HLA-DPB1 rs9277535GG genotipininde HLA-DPB1 mRNA ekspresyonu için bir risk genotipi olduğunu belirtmişlerdir. İki polimorfik risk genotipinden birine sahip olmanın mRNA sentezini azaltacağına dolayısıyla yeterli sayıda HLA molekülünün oluşmasının önlenerek HBV antijenlerinin CD4 T-hücrelerine sunumunun yetersiz kalmasına ve virüse karşı yeterince antikor üretilemeyip bunun da HBV'nin kronikleşmesi sağlaması ile doğrudan ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Wang ve ark., 2011, Çinden yapılan bu iki bağımsız vaka-kontrol çalışması yapmışlardır. Birinci çalışmaya Çin Han popülasyonundan 736 KHB hastası ile 782 doğal bağışıklı birey alınmıştır. İkinci çalışmaya ise Çin Zhuang popülasyonundan 177 hasta ve 208 sağlıklı birey alınmıştır. Her iki çalışmada da Çin Han popülasyonunda rs3077 A ve rs9277535 A alelinin KHB'nin kronikleşmesine karşı koruyucu olduğu bulunmuştur (sırasıyla, P:$4.068x10^{-7}$ ve P: $1.062x10^{-6}$). A alel sıklıkları sırasıyla 0.281 ve 0.428 olarak bulmuşlardır. Çin Zhuang popülasyonunda ise rs9277535 A alelinin hastalık riskini azalttığını bildirmişlerdir (P:0.002).

Lau ve ark., 2011, Çin toplumundaki 216 HBV'li hasta ve 231 kontrol grubu ile yaptığı çalışmada rs3077 G allel sıklığı HBV'li grupta 0.806 ve rs9277535 G allel sıklığı 0.775 iken kontrol grubunda bu sıklıkların daha düşük olduğunu ve istatistiksel olarak HBV kronikleşme riskini 1.75 ve 2.1 kat arttırdığını bildirmişlerdir.

Mbarek ve ark., 2011, Japon popülasyonundaki 458 kronik HBV'li hasta ve 2056 kontrol grubu ile yaptıkları GWAS çalışmasında HLA-DP antijen bağlama bölgesindeki rs3077 G ve rs9277535 G allellerinin hepatit B'nin kronikleşmesinde önemli etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Rs3077 G ve rs9277535 G alel sıklıklarının sırasıyla 0.73 ve 0.70 olarak bildirmişlerdir.

Li ve ark., 2011, Han Çin popülasyonundaki 2805 hasta grubu ile 1796 kontrol grubunda HLA-DPB1 genindeki rs9277535 polimorfizminin HBV enfeksiyonu ile ilişkisini araştırmışlardır. Çalışmaya aldığı bireyler 6 gruptan

oluşmaktadır. Sağlıklı 962, doğal bağışık 834, asemptomatik HBV taşıyıcıları 910, kronik HBV 964, siroz 544 ve karaciğer kanseri 387 birey. Rs9277535 polimorfizminin HBV enfeksiyonu ile ilişkili olduğunu fakat HBV'nin siroza ve karaciğer kanserine ilerlemesinde etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Vermehren ve ark., 2012, Almanya'dan beyaz (Caucasian) popülasyonunda yaptığı çalışmada ise 201 HBV'li hasta ve 235 sağlıklı kontrol grubunu karşılaştırdığında rs3077 G alelinin HBV enfeksiyonunun kronikleşmesi riskini 5.1 kat artırarak ilişkili olduğunu (P: 0.0009) fakat rs9277535 polimorfizminin HBV ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir. Rs3077 ve rs9277535 polimorfizmlerin minör alelleri olarak G alelleri olduğunu bildirmişlerdir (HBV grubu için sırasıyla 0.24 ve 0.259; kontrol grubu için sırasıyla 0.178 ve 0.243). Bu çalışma beyaz popülasyonda yapılan ilk çalışmadır.

Hu ve ark., 2012, Çin popülasyonundaki 1300 HBV'ye bağlı HCC (hepatoselüler karsinoma), 1344 kronik HBV'li hasta ve 1344 doğal bağışık kontrol grubu ile yaptığı çalışmada rs3077 GG genotip sıklığı sırasıyla %56.1, %51.5 ve %46.3 iken rs9277535 GG genotipi için sırasıyla %44.2, %43.5 ve %31.5 olarak bulmuştur. Rs3077 polimorfizminin HBV kronikleşmesinde ve HCC gelişmesinde risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir. Rs9277535 polimorfizmi ise HBV klirensini arttırdığını rapor etmişlerdir.

Yan ve ark., 2012, Çin popülasyonundan 282 HBV'li hasta ve 64 doğal bağışıklı birey ile yaptığı çalışmada ve ayrıca Asya popülasyonunda yaptığı meta analizde (rs3077 için 3642 HBV'li hasta, 3232 doğal bağışık; rs9277535 için 4527 HBV'li hasta ve 4059 doğal bağışık bireyin meta analizi) rs3077 A ve rs9277535 A alellerinin HBV'ye karşı doğal bağışıklığı önemli derecede artırdığını bildirmişlerdir. Alel sıklıklarını ise rs3077 A için 0.264 ve rs9277535 A için 0.277 olarak bildirmiştir.

Nishida ve ark., 2012, yaptığı GWAS çalışmasında Japon, Kore, Çin ve Taylandlı HBV'li hasta ve doğal bağışık bireylerde HLA-DP genindeki rs3077 G allelinin HBV'nin klirensi ile ilişkili olduğunu ancak karaciğer kanseri ile bu varyantlar arasında ilişki olmadığını bulmuştur.

Wong ve ark., 2013, Çin popülasyonundan 500 HBV'li hasta, 245 sağlıklı birey ve 259 HBV doğal bağışık birey ile yaptığı çalışmada rs3077 A alelinin HBV'nin klirens şansını 1.41 kat arttırdığını bildirmiştir (P:0.0083). rs3077 A alel sıklığı HBV'li hastalarda 0.207, sağlıklı bireylerde 0.288 ve doğal bağışıklı bireylerde 0.276 olarak bulunmuştur.

Seto ve ark., 2013, Hong Kong'dan yaptığı çalışmada 203 HBV'li hasta ile 203 HBV doğal bağışık bireyde HLA rs3077 A alelinin HBsAg seroklirensini arttırdığını bildirmiştir. Rs3077 A alel sıklığını ise hastalarda 0.192, doğal bağışıklı bireylerde 0.254 olduğunu bildirmişlerdir.

He ve ark., 2014, Güney Çin popülasyonundan 1191 HBV hastası ve 273 HBV doğal bağışık birey ile yaptığı çalışmada rs3077 ve rs9277535 polimorfizmlerinin G alellerinin HBV kronikleşme riskini arttırdığını rapor etmişlerdir.

Brouwer ve ark., 2014, Avrupa'dan yaptığı çalışmada 262 HBV'li beyaz hastalara 1 yıl süre ile IFN tedavisi vermiş ve HLA polimorfizmlerinin yanıt üzerine etkisini araştırmıştır. Her iki polimorfizmin G alellerinin IFN yanıtını arttırdığı belirlenmiştir.

Al-Qahtani ve ark., 2014, Suudi Arabistan'dan yaptığı çalışmada HBV hasta grubu ile doğal bağışıklı grup arasında rs3077 G ve rs9277535 G allellerinin HBV kronikleşme riskini artırmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmadığını fakat sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. G alel sıklıkları sırasıyla 0.262 ve 0.27 olarak bulunmuştur.

Chang ve ark., 2014, Tayvan'dan yaptığı çalışmada 1065 sağlıklı erkek ile 1623 HBV'li erkek hasta arasındaki karşılaştırılmasında rs9277535 G alelinin HBV kronikleşme riskini arttırdığını bildirmişlerdir.

Posuwan ve ark., 2014, Tayland'dan yaptığı çalışmada 230 HCC'li hasta, 219 KHB'li hasta, 113 HBV doğal bağışık birey ve 123 sağlıklı kontrolde rs3077 polimorfizmini çalışmışlardır. Rs3077 A alelinin HBV klirens şansını anlamlı derecede arttırdığını rapor etmişlerdir.

Xu ve ark., 2014, yaptığı çalışmada 702 hepatit C'li (HCV) hasta ve 342 sağlıklı bireyde HCV'nin kronikleşmesi üzerine etkisine bakmışlardır. Rs3077 T alelinin HCV riskini arttırdığını rapor etmişlerdir.

Jiang ve ark., 2015, Çin'den yaptığı 9114 HBV'li hasta grubu ile 9257 sağlıklı kontrol grubunda bu iki polimorfizmin etkisine bakmış ve HBV ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca rs3077 G ve rs9277535 G alel sıklığının sırasıyla 0.71 ve 0.66 olarak belirlemişlerdir.

Tangkijvanich ve ark., 2015, Tayland'dan yaptıkları çalışmada 126 tedavi naif HBV hastasına PegIFN ve/veya entekavir tedavi yanıtı üzerine etkisini araştırmışlardır. Rs3077 GG genotipinin virolojik yanıta katkı sağladığı ve koruyucu özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir. G aleline sahip olanların tedaviye daha iyi yanıt vereceğini bildirmişlerdir.

Yue ve ark., 2015, Çin'den yaptıkları çalışmada 350 kronik HCV'li hasta, 194 HCV spontan klirensli ve 973 sağlıklı bireyde rs3077 polimorfizminin HCV enfeksiyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Herhangi bir ilişki bulamamışlardır.

Bu doktora tez çalışmasının amacı;

1. Son yıllarda yapılan GWAS çalışmalarında belirtilen HLA geni rs3077 ve rs9277535 nolu polimorfizmlerin HBV'nin kronikleşme riski üzerine etkisini belirlemek,
2. Türk popülasyonundaki HLA geni rs3077 ve rs9277535 alel ve genotip sıklıklarını belirlemek ve Asya popülasyonunda bulunan alel ve genotip sıklıkları ile karşılaştırmak
3. Hepatit B'nin tedavisinde bir biyomarkır olup olamayacağını araştırmaktır
4. Akut hepatitli hastalarda tedavi öngörüsüne katkısına bakmak

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

- Etil Alkol (Merck Cat: M1.00986)
- İzopropanol (Sigma Cat: 190764)
- Trizma-Baz (Sigma Cat:93440)
- Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma Cat: E6758)
- DNA İzolasyon Kiti (Roche Cat: 11814770001)
- Realtime PCR Probe Master Miks (Roche Cat: 04707494001, LightCycler® 480 Probes Master)
- LightSNiP rs3077 primer prob (TIBMOLBIOL)
- LightSNiP rs9277535 primer prob (TIBMOLBIOL)

3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

- MIKRO 22R model HETTICH marka soğutmalı santrifüj cihazı
- -20 ^{o}C sıcaklığa inebilen ETUP 514 SL model ARISTON marka derin dondurucu,
- DNA'ların saklanmasında -80 ^{o}C MDF-192 model SANYO derin dondurucu,
- Sarf kimyasalların saklanmasında BK 9512 NF model BEKO marka buzdolabı,
- MS2 model IKA (IKA-WORKS, INC. USA) marka vorteks cihazı,
- FALC (FALC INSTRUMENTS s.r.l. ITALY) marka kuru ısıtıcı,
- LightCycler 480 Realtime PCR cihazı (Roche),
- LightCycler Plate ve Foil (Cat. No: 11796828001).
- Hasas Terazi,
- Gilson Mikropipetler,
- İnkübatör (ES 500),

3.1.3. Hasta ve Kontrol Grubu

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji BD'na başvurmuş 528 bireyden (kronik HBV tanısı alan 294 hasta ve 234 HBV doğal bağışıklı sağlıklı bireylerden) toplanan periferik kan materyal olarak kullanıldı.

Çalışmada, kronik hepatit B'li hasta grubu ve HBV'ye doğal bağışık sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu olmak üzere iki farklı deney grubu oluşturuldu. 2013-2015 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji polikliniğine başvuran bireylerden klinik, laboratuar, radyoloji ve patolojik olarak kronik hepatit B tanısı konulan kronik HBV'li hastalardan ve hepatit B'ye karşı doğal bağışıklığı olan sağlıklı bireylerden oluşan çalışma gruplarında HLA gen polimorfizmleri araştırılmıştır. Çalışma için Çukurova Üniversitesi Etik Kurulundan Etik Kurul Onayı 4 Nisan 2013 tarihinde alınmıştır. Tüm hastalardan hepatit markırları (HBsAg, antiHBs, anti-HBcIgG, anti-HCV), tam kan sayımı (CBC), protrombin zamanı (PTZ), uluslararası normalleştirme oranı (INR), ferritin, glukoz, üre, kreatinin (Cr), aspartat amino transferaz (AST), alanin amino transferaz (ALT), albümin, total bilirubin, direk bilirubin, total kolesterol, trigliserid, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) kolesterol düzeyleri çalışılmıştır. HBsAg (+) vakaların serumundan HBeAg, antiHBe, antidelta, serum alfa fetoprotein (AFP) ve PCR ile HBVDNA düzeylerine bakılmıştır. Knodell skoruna göre patolojik değerlendirme (histolojik aktivite indeksi (HAİ), fibrosis skoru) yapılmıştır.

Çalışmaya alınan grublardan 0,5 molar (M) etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (5.4 mg) içeren vakumlu tüplere (BD Vacutainer®, İngiltere) 2 ml periferik kan alınmıştır. Hasta ve kontrol grubu bireylerinden alınan periferik kanlar DNA izolasyonu yapılana kadar +4 ^{o}C'de saklanmıştır. Periferik kandan genomik DNA izolasyonu kan alındıktan sonra yapılarak, izole edilen DNA'lar -80 ºC'de çalışma gününe kadar korunmuştur.

Araştırmaya katılan çalışma ve kontrol grubu bireylerinin kanları gönüllülük esasına dayanarak etik kurallar çerçevesinde toplanmıştır. Hasta ve kontrol

grubundaki katılımcılar çalışmaya katılmadan önce çalışmanın amacı ve içeriği hakkında açık bir dille bilgilendirilerek hasta rıza onam formu alınmıştır.

Bu çalışmada, Türk popülasyonunda kronik hepatit B'li hastalar ile HBV'ye karşı doğal bağışıklık geliştiren bireylerde HLA geni rs3077 ve rs9277535 polimorfizmlerinin HBV'nin kronikleşmesi üzerine etkisini araştırılmıştır.

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Gastroenteroloji Bilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2. Metot

Çalışmaya katılan bireylerden alınan tam kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen yüksek saflıkta DNA'lardan Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon (Real Time PCR, RT-PCR) yöntemi ile HLA geni rs3077 ve rs9277535 nolu polimorfizmler genotiplendirilmiştir.

3.2.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu

Roche firmasının ürettiği yüksek saflıkta PCR için kalıp DNA hazırlama kiti (High Pure PCR Template Preparation Kit) (Cat. No. 11 796 828 001) periferik kandan genomik DNA izolasyonu için kullanılmıştır. İzolasyon aşamaları aşağdaki gibi uygulanmıştır;

1. Eppendorf tüplerine elüsyon tamponundan her örnek için 200 µL olacak şekilde bir ependorf tüpüne alınmış ve 70 ^{o}C 'de kullanılana kadar bekletilmiştir.
2. Steril 1,5 mL'lik ependorf tüpüne 200 µL kan, 500 µL binding tamponu (6M guanidin HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris HCl, % 20 Triton X-100 (V/V) 40 µL proteinaz K., eklenip, karıştırılmış ve 70 ^{o}C de 10 dakika inkübe edilmiştir.
3. Her bir örneğin üzerine 100 µL isopropanol ilave edilip vortekslenmiştir.

4. Örnekler hazırlanmış olan filtreli tüplere aktarılıp 8000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilmiştir.
5. Filtreli tüpün altındaki tüp atılmış yeni bir tüp yerleştirmiştir. Üzerine 500 µL inhibitör removal tamponu (5M guanidin-HCI, 20mM Tris-HCI, pH:6.6, 25 ^{o}C, 20 ml etanol ilave edildikten sonra kullanılmış) ilave edilmiş, karıştırılmış ve 8000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilmiştir.
6. Alttaki tüp atılmış, yeni tüp konup üzerine 500 µL yıkama tamponu (20mM NaCI, 2mM Tris-HCI, pH:7,5 ve 80 ml etanol ilave edildikten sonra kullanıldı) eklenip 8000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilmiştir.
7. Alttaki tüp atılarak yeni bir tüp yerleştirilip üzerine 500 µL yıkama tamponu eklenmiştir. 8000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilmiştir.
8. Tüpün altındaki sıvı dökülmüş ve yeniden tekrar filtreli tüpe yerleştirilmiş ve 14000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilmiştir.
9. Filtreli tüpün altına steril 1,5 mL'lik ependorf tüp yerleştirilmiş ve filtreli tüpün üzerine 200 µL elüsyon tamponu (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) eklenerek 14000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilmiştir.
10. Steril 1,5 mL'lik ependorf içinde kullanıma hazır DNA solüsyonu elde edilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri -20 ^{o}C'de saklanmıştır.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Klasik polimeraz zincir reaksiyonu; DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen özgün bir DNA parçasını enzimatik olarak çoğaltmak (bir DNA parçasının kopya sayısının milyarlarca kat fazla) için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Metot basitçe tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun kosullarda çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Çoğaltılacak DNA bölgesine spesifik primer çifti, deoksiribonükleik asitler (dNTP), tag DNA polimeraz enzimi, magnezyum ve uygun ortamı sağlayan tampon çözeltisi kullanılmaktadır. PCR, çift iplikli DNA molekülünde hedef dizilere uygun oligonükleotid primerlerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. PCR'da çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale dönüştürülür ve her bir zincir daha sonra küçük tamamlayıcı primerler ile birleşir. Primer, çoğaltılacak DNA

parçasının uç bölgelerine komplementer (tamamlayıcı) olan sentetik oligonükleotitlerdir. Tek zincirli DNA'yı kalıp olarak kullanan DNA polimeraz enzimi, primerin 3' ucundan nükleotidleri ilave ederek primeri uzatır. Sonuçta primerin içinde bulunduğu yeni zincirin sentezlenmesi ile çift zincirli DNA molekülü oluşur. İkinci PCR döngüsünde ilk döngüde oluşan ürünler tekrar denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir ve primerler ilave edilir. Sonra DNA polimeraz primerleri uzatır (Klug ve Cummings, 2003). DNA polimeraz enzimi, $MgCl_2$ ve dört farklı deoksiribonükleotid trifosfat (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) ile primerin 3'hidroksil ucundan uzamasını sağlamaktadır. Mg^{+2} iyonları dNTP'ler ile çözülebilir kompleksler oluşturmakta, polimeraz aktivitesini artırmakta ve çift iplikli DNA'nın Tm (erime ısısı) derecesini arttırmaktadır. Bu nedenledir ki $MgCl_2$, PCR'ın özgüllüğüyle, ürün verimi üzerinde önemli bir rol üstlenmektedir. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonu, azalan ürün oluşumuna, yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu spesifik olmayan ürün artışına neden olmaktadır. 30-45 döngü sonunda orjinal DNA dizisi bir milyar katdan daha fazla çoğalmış olur (Temizkan ve Arda, 2004). Bir çeşit "in vitro klonlama" olarak da tanımlanan PCR; 94°C-98°C aralığında gerçekleştirilen denatürasyon, 37°C-65°C aralığında gerçekleştirilen primer denilen oligonükleotitlerin bağlanma (annealing) ve 72 °C'de gerçekleştirilen uzama aşamalarından oluşur ve bu döngülerin (yaklaşık 35 döngü) belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır (Dorak, 2006). Özetle;

PCR üç ana basamaktan oluşur (Şekil 3.1);

1. Amplifiye edilecek çift iplikli DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu (denaturation).
2. Primerlerin özgül hibridizasyonuna olanak sağlayacak sıcaklıkta [Tm (erime sıcaklığı) değerinin 3-5 ^{o}C altındaki sıcaklık] hedef bölgelere bağlanmaları (annealing).
3. Taq DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği 72 ^{o}C sıcaklıkta, primerlerden itibaren DNA zincirlerinin (ipliklerinin) sentezlenmesi (extension=uzama).

PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için gerekli temel bileşenler;

Kalıp DNA: Saflaştırılan DNA, amplifiye edilecek DNA parçalarına kalıp görevi yapar.

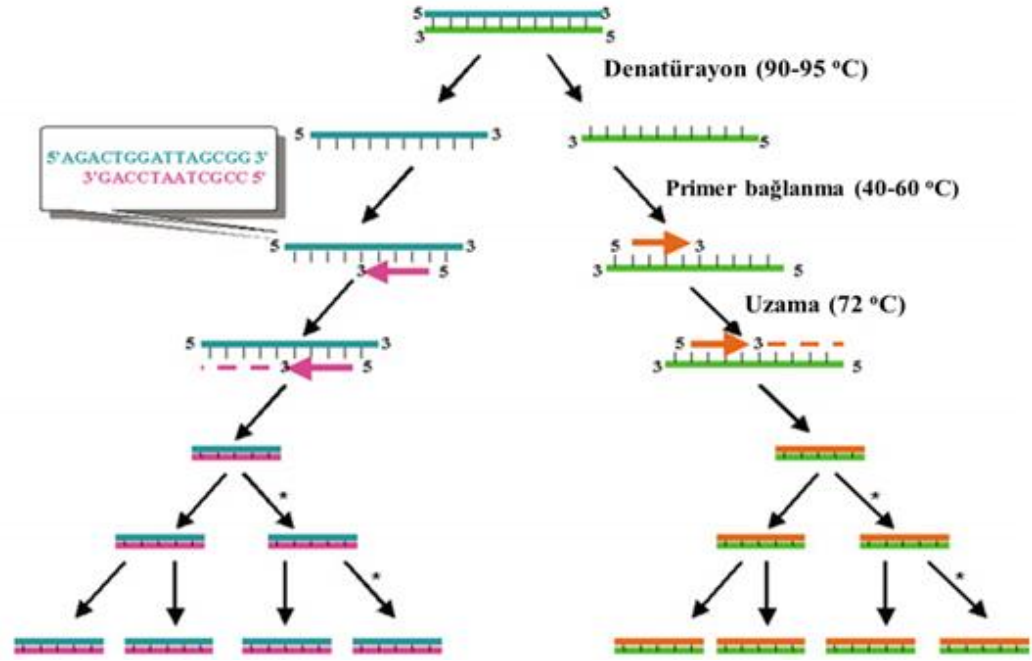
Primerler (oligonükleotidler): Kullanılacak primerler yalnızca amplifiye edilecek bölgeye özel olmalıdır. Tipik primerler yaklaşık % 50 G+C bazlarına sahip 18-28 nükleotid uzunluğunda, sentetik olarak sentezlenmiş tek zincirli oligonükleotidlerdir.

Tag DNA polimeraz: Termostabil karakterde DNA polimerazlardan PCR'de en yaygın kullanılanı *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA polimerazdır. Taq DNA polimeraz'ın polimerizasyon oranı (nükleotid/saniye) enzim için en uygun sıcaklık olan 70-80 ^{o}C'da 35-100'dür. 50 µl'lik bir reaksiyon hacmi için önerilen miktar 1.25-3 ünite (U) arasındadır.

$MgCI_2$: Mg^{+2} iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle ederler ve çift iplikli DNA'nın Tm değerini artırırlar, ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlarlar. Genellikle optimum $MgCI_2$ konsantrasyonu olarak 1.0-2.5 mM'lık değer tercih edilir.

PCR tamponu: PCR için uygun tampon 10-50 mM arasında değişen Tris-HCI'dir. Tamponun pH'sı ise 8.3-8.8 arasında değişir. Bu tampona son derişimi 50 mM kadar KCI çözeltisi eklenmesi primerin kalıp DNA'ya yapışmasını kolaylaştırır.

Deoksiribonükleotitler (dNTP): Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR 200 µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir.



Şekil 3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Okhravi ve ark., 2000)

3.2.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Real Time PCR; Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction, RT- PCR) özellikle gen ekspresyon çalışmalarında yerleşmiş bir yöntemdir. RT- PCR, döngüler sırasında reaksiyonlardan floresan sinyal toplayarak sürekli analize olanak verir. İfadelenmenin yanı sıra amplifikasyonlar, delesyonlar ve nokta mutasyonlarının da çalışılmasına olanak sağlayan bu yöntemin üstünlüğü hızında ve ürünlerin birikiminin gerçek zamanlı izlenebilmesinde yatmaktadır. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda (Q-RT-PCR) ise her reaksiyondan gelen floresan sinyaller her örnek için sayısal bir değere dönüştürülür. Q-RT-PCR yöntemi, genomik DNA kopya sayısını, tek nükleotid polimorfizmlerini, DNA metilasyon durumunu ve viral yükü belirlemekte kullanılabilir. Hızlı ısıtma ve soğutma özelliğine sahip olan LightCycler cihazı, çalışmaya göre değişen sürelerde (yaklaşık 20-30 dk) 30-40 PCR döngüsü gerçekleştirdiğinden çalışmalarda oldukça avantaj sağlamaktadır (Lohmann ve ark., 2000; Reuter ve ark., 2005). Floresan kaynağı olarak primerlere bağlı ya da onlardan bağımsız floresan işaretleyiciler kullanılır. En sık kullanılanlar arasında hidroliz

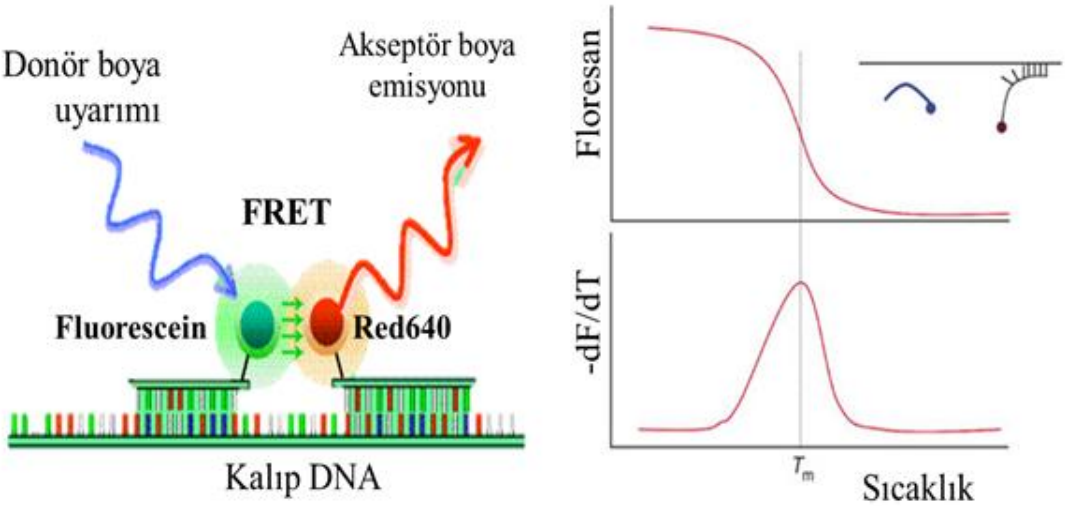
probları, hibridizasyon probları, TaqMan® probları, Molecular Beacon® probları ve SYBR® Green I boyası bulunmaktadır. Her deneyde hedeflenen amplikonun çoğalıp çoğalmadığını, kantifikasyona primer dimerlerinin ve nonspesifik ürünlerin karışmadığını gösterebilmek için, reaksiyon sonrası ürünler jelde görüntülenebilir ya da reaksiyondan sonra erime eğrisi ("melting curve") analizi basamağı yapılabilir. (Lau ve ark., 2011).

Syber green I boyası; yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlanan ve floresans veren boyalardır. Çoğalmaya bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarıyla ölçülmektedir. Primerin bağlanmasıyla uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan Syber green 1 miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. Floresans artışı her zaman özgül amplifikasyon göstermeyebilir. Çift sarmal DNA'ya entegre olan Syber green I hedef moleküller olmadığında primerlerin birbirleriyle olan bağlanmaları (primer dimeri) floresans oluşumuna neden olabilmektedir. Bu olumsuzluğu gidermek için amplifikasyon ürünlerinin melting curve (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, spesifik melting temperature (Tm, çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli olan sıcaklık) değerine sahiptir. PCR çoğalmasından sonra sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla ortamdaki floresans miktarı kaydedilir. Sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmayasıyla Syber green I serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden amplikonun Tm derecesi saptanabilir (Heid ve ark. 1996).

TaqMan Hidroliz Probları; 5' ve 3' uçlarından floresans veren maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probun 5' ucunda raportör floresans boya, 3' ucunda ise baskılayıcı (quencher) floresans boya bulunmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Probla hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör floresans boya maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı floresans boya tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz

aktivitesini kullanarak probu 5’ uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen amplikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır (Livak ve ark., 1995).

Hibridizasyon Probları; Problardan biri 3’ ucundan fluoresein boyayla işaretli (donör boya), diğer prob ise 5’ ucundan alıcı boyayla (acceptor dye) işaretlenmiştir. Problar, hedef amplikonlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotid uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. FRET (Fluoresance resonance energy transfer) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine, diğer bir ifadeyle PCR siklusu süresince oluşan amplikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır.



Şekil 3.2. FRET teknolojisi ile hibridizasyon probu (Chiou ve ark., 2007)

3.2.4. Deneyde Kullanılan Hibridizasyon Problarının Çalışma Prensibi

Bu çalışmamızda floresan rezonans enerji transferi (FRET) ile çalışan hibridizasyon probları kullanılarak polimorfizmler saptanmıştır. Saptama ve bağlama probları kullanılmıştır. Saptama (donör) probu, mutasyon veya SNP olduğu düşünülen bölgeyi hedef alır. 15-30 baz büyüklüğündedir. 3’ucu fluoresein boyası ile işaretlidir. Bağlama probu (akseptör), saptama probundan 1-5 baz uzaklığında olacak

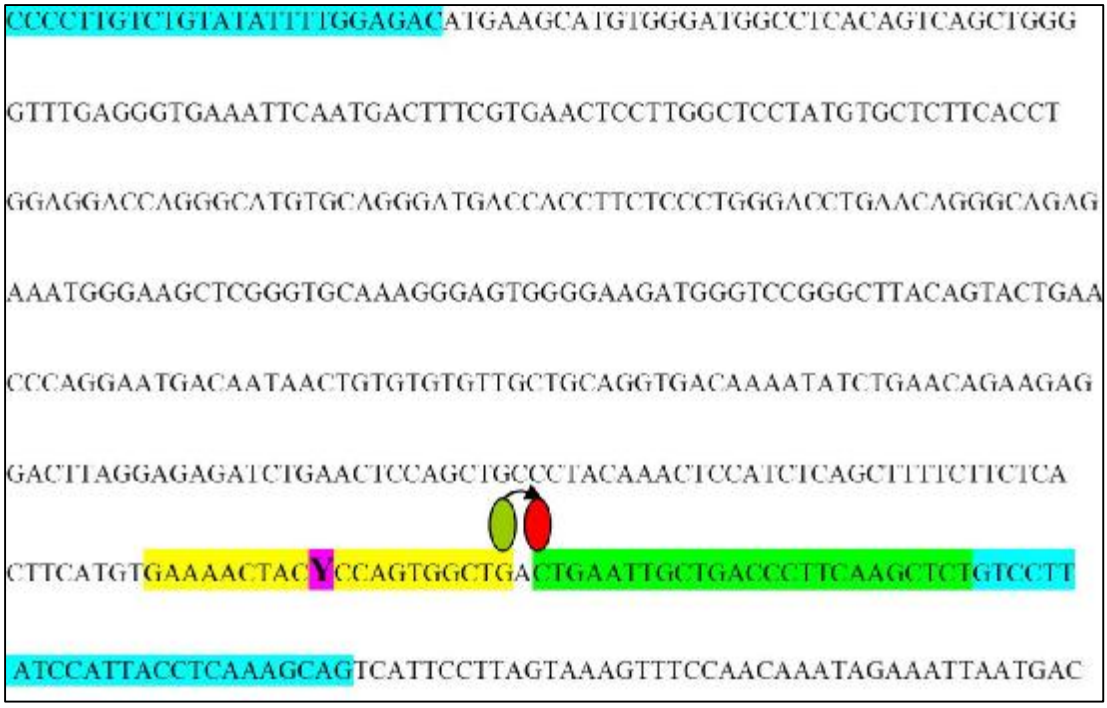
şekilde tasarlanır. Bağlama (akseptör) probunun erime sıcaklığı, saptama (donör) probu ve primerlerin erime sıcaklıklarından 5-10°C yüksektir. 5'ucu Red640 floresan bir boya ile işaretlenir. LightCycler cihazının verdiği mavi ışıkla bağlama (akseptör) probu direkt olarak uyarılamaz. Donör boyanın (fluoresein) uyarılması ve FRET ile enerjinin akseptör boyaya (Red640) aktarılması gerekir. Bu şekilde uyarıldıktan sonra, Red640 akseptör boya 640nm dalga boyunda kırmızı ışık saçar. Bu gözlenen floresanın miktarı elde edilen PCR ürünü, dolayısıyla DNA miktarıyla doğru orantılıdır. Bu aşamadan sonra mutasyon ya da polimorfizm saptanması için erime sıcaklığı hesaplanması ve erime tepesi elde edilmesi işlemine geçilir. Bunun için önce erime sıcaklığından 5-10°C düşük sıcaklık sağlanır. Sonra 0.1-0.2°C/s olacak şekilde sıcaklık yavaşça artırılır ve bu arada floresan miktarı devamlı izlenir. Saptama probunun %50'sinin ayrıldığı, dolayısıyla floresan miktarının belirgin azaldığı sıcaklık, erime sıcaklığı olarak belirlenir. Floresan miktarının azalmasıyla elde edilen eğri, erime eğrisi adını alır. Bu eğrinin daha kolay yorumlanabilmesi için negatif türevi alınarak erime pikleri elde edilir. Mutasyon veya SNP varlığında saptama probu kalıp DNA dizisiyle tam eşleşmediği için, mutasyon olmayan örneğe göre daha düşük bir sıcaklıkta ayrılacaktır ve elde edilen erime tepesi mutasyon veya SNP olmayan örneğinkinden farklı olacaktır (Chiou ve ark., 2006).

Roche LightCycler 480 RT-PCR için gerekli olan kimyasallar ve HLA-DP gen polimorfizimlerinin (rs3077, rs9277535) genetik analizi için hedef gen bölgesini çoğaltmada kullanılan spesifik primer ve hibridizasyon probları aşağıda verilmiştir (Lau ve ark., 2011).

3.2.5. HLA rs3077 Bölgesi ile Primerler ve Hibridizasyon Probları

Primer 1, Forward: 5' CCCCTTGTCTGTATATTTTGGAGAC 3'
Primer 2, Reverse: 5' CTGCTTTGAGGTAATGGATAAGGAC 3'
Probe 1, LC Red640-CTGAATTGCTGACCCTTCAA-GCTCT-phosphate,
Probe 2, GAAAACTACCCCAGTGGCTG-Fluorescein
Primerler gen dizisinde mavi ile boyanmıştır.

HLA-DPA1 geni rs3077 bölgesine primerlerin ve probların bağlanması



Şekil 3.3. HLA-DPA1 Rs3077 Bölgesine Primerlerin ve Probların Bağlanması (Lau ve ark., 2011)

Y=G/A (rs3077 polimorfizminin olduğu nokta)

Prob1:Red640-CTGAATTGCTGACCCTTCAA-GCTCT-phosphate

Prob2:GAAAACTACGCCAGTGGCTG- Fluorescein

3.2.6. HLA rs9277535 Bölgesi ile Primerler ve Hibridizasyon Probları

Primer 1, Forward: 5’ AATCAAGTTTAGTGCCCTCATCCA 3’

Primer 2, Reverse: 5’ CACACAAAGAAAATGGTTAAAGTGTA 3’

Probe1, Red640-GCACTAATTCAACATATACC-TTACTGAGAGCA-phosphate

Probe 2: CTGATAGGACCCATATTCCCAC-Fluorescein

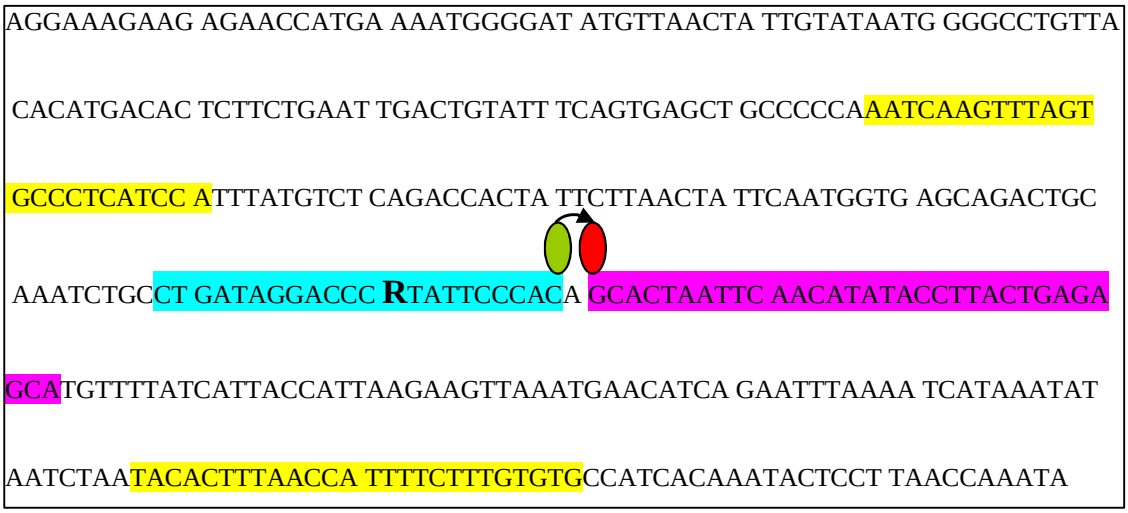
HLA-DPA1 geni rs9277535 bölgesine primerlerin ve probların bağlanması

Primerler gen dizisinde sarı ile boyanmıştır.

R=G/A (rs9277535 polimorfizminin olduğu nokta)

Probe 1: Red640-GCACTAATTCAACATATACC-TTACTGAGAGCA-phosphate

Probe 2: CTGATAGGACCC**A**TATTCCCAC-Fluorescein



Şekil 3.4. HLA-DPB1 rs9277535 Bölgesi ile Primerler ve Hibridizasyon Probları (Lau ve ark., 2011)

3.2.7. HLA Geni Rs3077 ve Rs9277535 Polimorfizmlerinin Real Time PCR Yöntemi ile Genotiplendirilmesi

294 kronik hepatit B'li hastaların ve 234 doğal bağışık bireyin DNA'larından rs3077 ve rs9277535 polimorfizmlerinin genotip tayini aşağıdaki deney protokolüne göre yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasallar için uygulanan deney protokolü

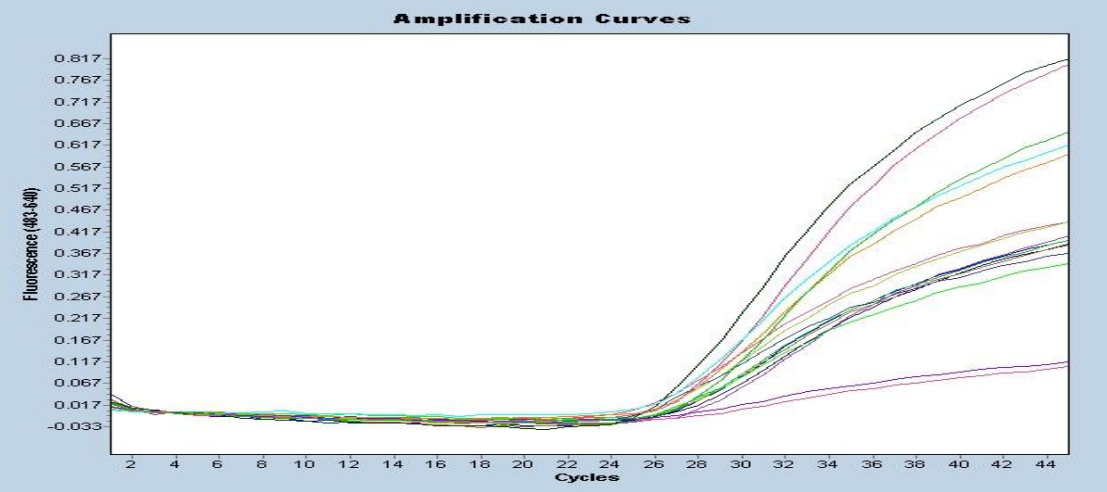
Her bir örnek için reaktif karışımının hazırlanması		
Kimyasallar	**20 µL total hacim**	**Son Derişim**
H_2O	2 µL	-
Primer 1, (1 pmol/ µL)	1 µL	0.05 pmol/ µL
Primer 2, (1 pmol/ µL)	1 µL	0.05 pmol/ µL
Prob 1, (1 pmol/µL)	0.5 µL	0.025 pmol/ µL
Prob 2, (1 pmol/µL)	0.5 µL	0.025 pmol/ µL
Probe Master Mix, (2X)	10 µL	1X
DNA , (~50ng)	5,0 µL	-

Real Time PCR protokolü aşağıda verilmiştir.

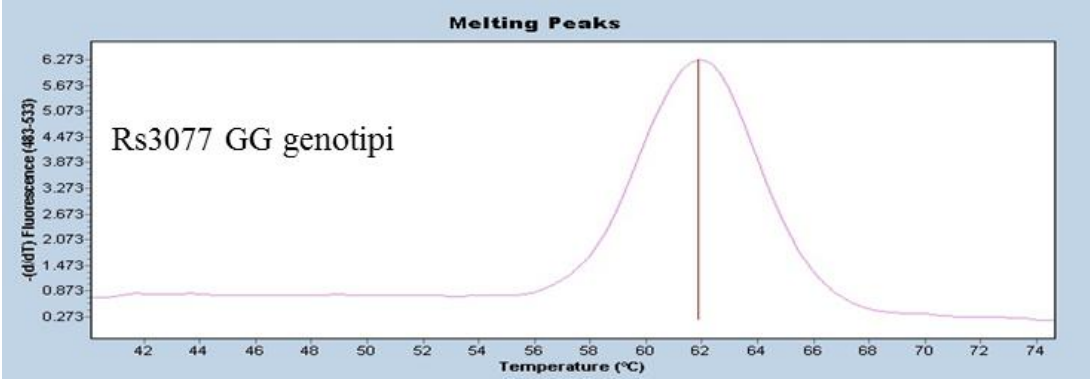
Çizelge 3.2. Kullanılan RT-PCR deney protokolü

Program	Denatürasyon	Cycling (döngü)			Erime			Soğuma
Parametreler								
Analiz Modu	Yok	Miktar			Erime eğrisi			Yok
Döngüler	1	45			1			1
Bölüm	1	1	2	3	1	2	3	1
Hedef (^{o}C)	95	95	60	72	95	40	75	40
Süre (hh:mm:ss)	10 dk	10sn	10sn	15sn.	30sn	2dk	0	30 sn
Ramp oranı (^{o}C/s) 384	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	-	2.0
Ramp oranı (^{o}C/s) 96	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	-	1.5
Elde etme Modu	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok	Yok	Cont.	Yok
Elde etme (her ^{o}C)	-	-	-	-	-	-	3	-

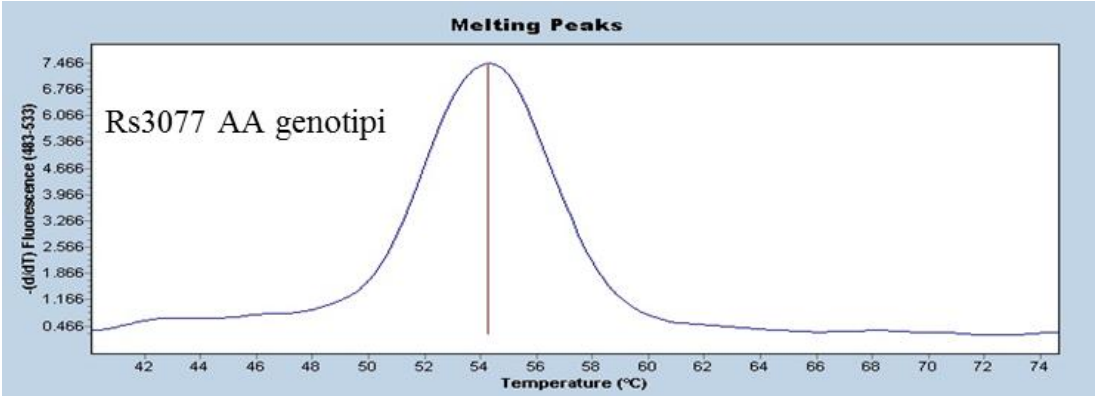
3.2.7.1. HLA-DPA1 Rs3077 Polimorfizmi için Erime Eğrisi Pikleri



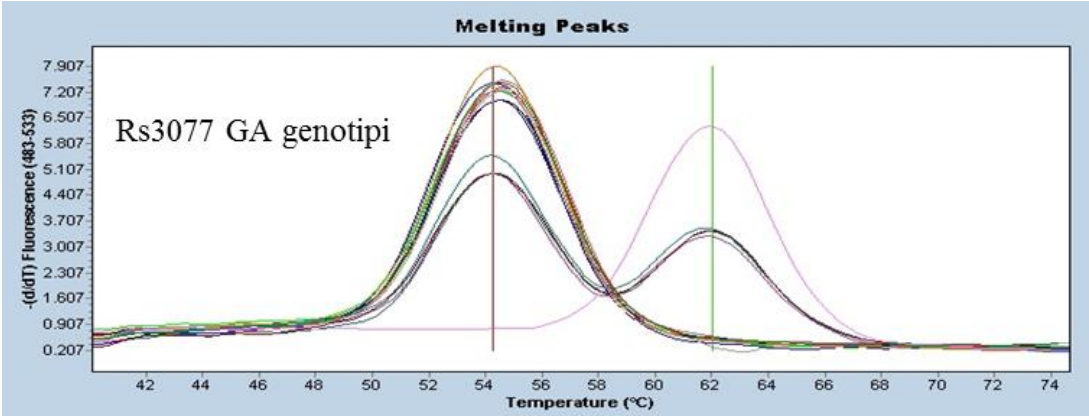
Şekil 3.5. Amplifikasyon (çoğalma) Eğrisi



Şekil 3.6. Rs3077 homozigot GG genotipinin erime piki

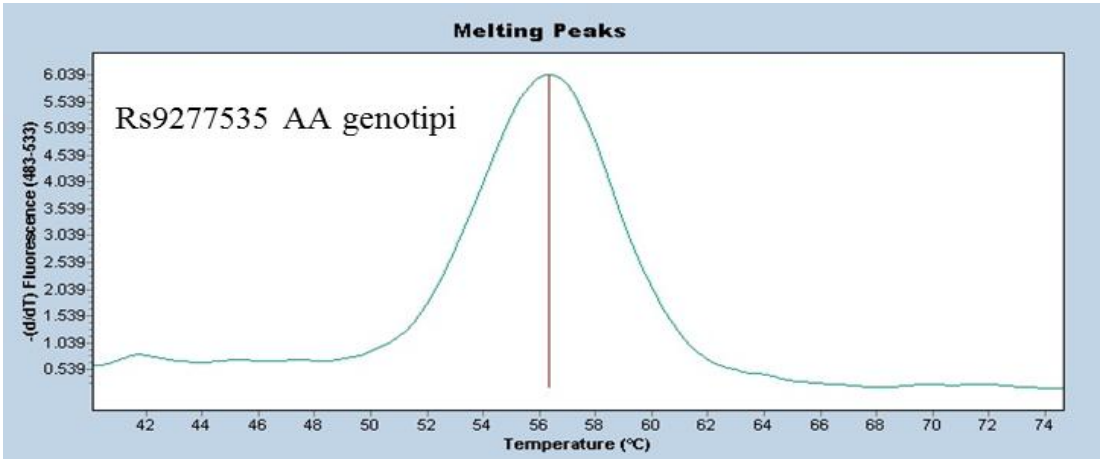


Şekil 3.7. Rs3077 homozigot AA genotipinin erime piki

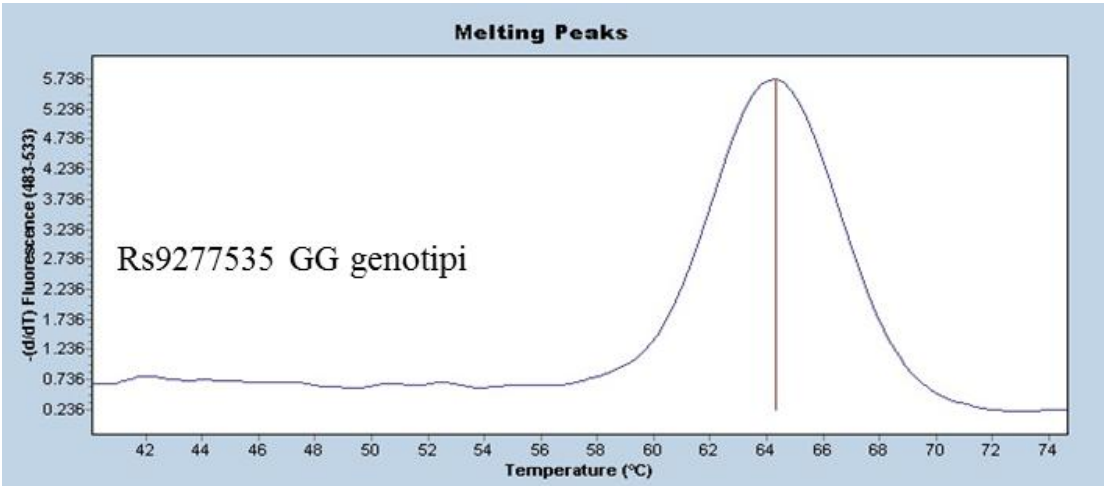


Şekil 3.8. Rs3077 heterozigot GA genotipinin erime eğrisi

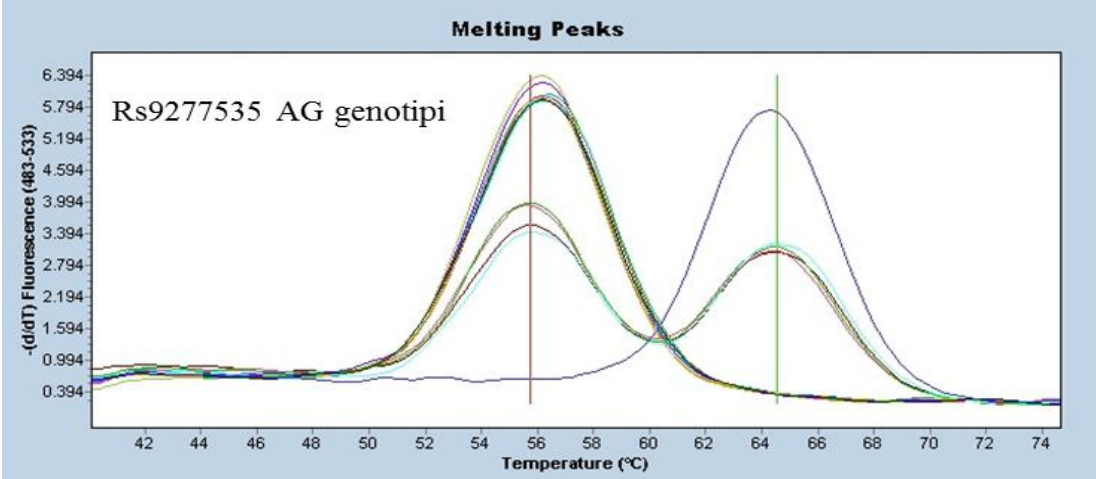
3.2.7.2. HLA-DPB1 Rs9277535 Polimorfizmi için Erime Eğrisi Pikleri



Şekil 3.9. Rs9277535 homozigot AA genotipinin erime piki



Şekil 3.10. Rs9277535 homozigot GG genotipinin erime piki



Şekil 3.11. Rs9277535 heterozigot AG genotipinin erime piki

3.2.8. İstatistiksel analizler

Kronik hepatit B ile HBV doğal bağışık grubunun normal dağılım gösteren sürekli değişkenleri ortalama±standart sapma değerleri ile normal dağılıma sahip olmayanlar ise ortanca (minumum-maksimum) değerleri verilerek gösterildi. Hasta ve kontrol grubu arasındaki demografik verilerin kıyaslanması grublara ait sürekli değişkenlerin dağılımlarına bağlı olarak Student's t-testi (≥üç grup varsa ANOVA) veya Mann-Whitney U testi (≥üç grup varsa Kruskal Wallis) ile yapıldı. Gruplar arasındaki kategorik değişkenlerin (cinsiyet ve alkol kullanımı gibi) kıyaslanmasında Ki-Kare ($\chi 2$) testi kullanılmıştır. Gözlenen genotip sıklıkları ile beklenen değerler Hardy-Weinberg teorisi ile hesaplanmıştır. Anlamlı değişkenler lojistik regresyon analizi yapılarak risk faktörleri belirlenmiştir. Ayrıca, genotip ve haplotip analizleri ile Linkage Diseuilibrium (LD) değeri SNP Statistics websitesinden (http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm) hesaplanmıştır. Sonuçlar %95 güven aralığı (CI), üstünlük oranı (odds ratio) ve iki yönlü anlamlılık değerleri (P değerleri) verildi. $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Çalışmaya 294 kronik hepatit B (KHB) hastası ve kontrol gurubu olarak 234 HBV doğal bağışık sağlıklı birey alınmıştır. Hasta ve kontrol grubu Çukurova Üniversitesi Gastroenteroloji polikliniğine başvuran bireyler arasından rastgele seçilmiştir. Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubundaki kişilerin demografik ve laboratuvar özellikleri Çizelge 4. 1'de verilmiştir. Çalışmaya alınan hasta grubunun 189'i erkek (% 64.3), 105'i kadın (% 35.7), yaş ortanca değeri 50 (15-89), alkol kullanan 10 (% 5.3), alkol kullanmayan 284 (% 94.7), vücut kitle indeksi 27.14±4.38 idi. Kontrol grubunun ise 114'ü erkek (% 48.7), 120'si kadın (% 51.3), yaş ortanca değeri 53 (21-82), alkol kullanan 8 (% 4.9), alkol kullanmayan 226 (% 95.1), vücut kitle indeksi 27.59±4.13 idi. Hasta grubu ve kontrol grubu; yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi ve alkol yönünden karşılaştırıldı. Her iki grupta karşılaştırılan bu parametreler arasında istatistiksel olarak yaş ve cinsiyette anlamlı fark saptandı (P değerleri sırasıyla 0.01 ve 0.001) (Çizelge 4.1). Ayrıca hasta grubunun HBeAg antijenine göre sınıfladığımızda HBeAg (-) olanlar 262 (% 89.1), HBeAg (+) olanlar 32 (% 10.9) idi. Hepatit B virüs sayısı log 7.01±7.56 idi. Hasta grubundaki bireylerin 7'si (% 2.4) immün töleran fazda, 16'sı (% 5.4) immün klirens fazda, 129'u (% 43.9) inaktif taşıyıcı, 134'ü (% 45.6) reaktivasyon fazında ve 8'i (% 2.7) HBsAg klirens fazında idi (Çizelge 4.1). Ayrıca hasta ve kontrol grubunun laboratuvar verileri karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı çıkanlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik ve Laboratuvar Özellikleri

Değişkenler	KHB'li Hasta (%), n =294	HBV doğal bağışık (%), n=234	*P* value
Yaş*	50 (15-89)	53 (21-82)	0.01[a]
Cinsiyet, erkek (%)	189 (64.3)	114 (48.7)	0.001[b]
Alkol kullanımı (%)	10 (5.3)	8 (4.9)	0.86[b]
BMI (kg/m^2)**	27.14 ± 4.38	27.59± 4.13	0.44[c]
ALT (U/L)*	24 (8-1028)	22 (8-237)	0.02[a]
AST(U/L)*	24 (11-585)	23 (11-153)	0.003[a]
GGT(U/L)*	17 (5-480)	20 (8-605)	0.02[a]
PLT(uL)*	219 (30-482)	241 (33-593)	0.001[a]
HCT(uL)**	40.82 ± 5.84	39.79 ± 5.45	0.07[c]
Albumin (g/dL)**	3.99 ± 0.69	4.27 ± 1.31	0.005[c]
Total Bilirubin(mg/dL)*	0.70 (0.01-30.6)	0.52 (0.01-1.6)	0.001[a]
PTZ**	12.98 ± 2.20	12.23 ± 1.25	0.001[c]
INR**	1.12 ± 0.20	1.01 ± 0.15	0.005[c]
HBeAg (-)/HBeAg (+), (%)	262 (89.1)/32 (10.9)	-	-
HBV DNA, log (IU/ml)**	7.01±7.56	-	-
HBV Fazları			
İmmün Töleran	7 (2.4)	-	-
İmmün Klirens	16 (5.4)	-	-
İnaktif Taşıyıcı	129 (43.9)	-	-
Reaktivasyon	134 (45.6)	-	-
HBsAg Klirens (okült)	8 (2.7)	-	-

[a]P değeri *Mann-Whitney* testi ile hesaplandı. [b]P değeri *chi-square* testi ile hesaplandı. [c]P değeri *student t* testi ile hesaplandı. *Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak gösterildi. **Veriler ortalama±SD. Alkol tüketiminde >40g/hafta esas alındı.

Kronik hepatit B (KHB) ile enfekte 294 kişi ile kontrol grubu olan HBV doğal bağışık 234 kişi HLA-DPA1 geni rs3077 G **à** A polimorfizmi alel ve genotip

frekansları yönünden karşılaştırılmıştır. Kronik HBV grubunda 118 G alleli (% 20.1) ve 470 A alleli (% 79.9) saptanmıştır. Kontrol grubunda ise G alleli 82 (% 17.5) ve A alleli 386 (% 82.5) idi. Hasta ve kontrol grubu allel frekansı yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (P=0.29) (Çizelge 4.2). Hasta ve kontrol grubu genotip açısından karşılaştırıldığında ise hasta grubunda GG genotipi 16 (% 5.4), GA genotipi 86 (% 29.3) ve AA genotipi 192 (% 65.3) iken, kontrol grubunda GG genotipi 8 (% 3.4), GA genotipi 66 (% 28.2) ve AA genotipi 160 (% 68.4) saptanmış olup istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (P=0.49). (Çizelge 4.2). Ayrıca kontrol ve hasta grubu dominant ve resesif genotip modellerde karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. KHB Grubu ile Kontrol Grubunun HLA-DPA1 rs3077 Polimorfizminin Alel ve Genotiplerinin Karşılaştırılması

HLA-DPA1 rs3077	KHB hasta grubu n =294, (%)	Kontrol grubu n =234, (%)	P değeri	OR (95% CI)
Alel sıklığı				
A	470 (% 79.9)	386 (% 82.5)		1.00 (Referans)
G	118 (% 20.1)	82 (% 17.5)	0.29[a]	1.18 (0.87-1.62)
Genel genotip				
AA	192 (% 65.3)	160 (% 68.4)	0.49[a]	1.00 (Referans)
GA	86 (% 29.3)	66 (% 28.2)	0.67[b]	1.09 (0.74-1.59)
GG	16 (% 5.4)	8 (% 3.4)	0.25[b]	1.67 (0.69-3.99)
Dominant genotip				
AA	192 (% 65.3)	160 (% 68.4)		1.00 (Referans)
GA+GG	102 (% 34.7)	74 (% 31.6)	0.46[b]	1.15 (0.79-1.67)
Resesif genotip				
AA+GA	278 (% 94.6)	226 (% 96.6)		1.00 (Referans)
GG	16 (% 5.4)	8 (% 3.4)	0.26[b]	1.64 (0.68-3.95)

[a]P değeri *chi-square* testi ile hasaplandı. [b]P değeri yaş ve cinsiyete göre uyarlanarak logistic regression analizi ile hesaplandı.

Kronik hepatit B'li 294 hasta ile 234 HBV doğal bağışık kontrol grubu HLA-DPB1 geni rs9277535 A **à** G polimorfizmi alel ve genotip frekansları yönünden karşılaştırılmıştır. Hasta grubunda A aleli 481 (% 81.8), G aleli 107 (% 18.2) iken, kontrol grubunda A alleli 360 (% 76.9) ve G aleli 108 (% 23.1) idi. Kontrol ve hasta grubunda alel frekansları yönünden karşılaştırıldığında A alelin HBV'nin kronikleşme riskini 1.35 kat arttırarak istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (P=0.05, OR=1.35 (1.00-1.82)) (Çizelge 4.3).

Hasta ve kontrol grubu genotipler yönünden karşılaştırıldığında ise hasta grubunda AA genotipi 200 (% 68), AG genotipi 81 (% 27.6) ve GG genotipi 13 (% 4.4) bulunurken, kontrol grubunda ise AA genotipi 140 (% 59.8), AG genotipi 80 (% 34.2), GG genotipi 14 (% 6) olarak saptanmış olup aralarında genotip yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (P=0.15) (Çizelge 4.3). Ayrıca hasta ve kontrol grupları dominant ve resesif genotipler yönünden karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla; P=0.84 ve P=0.28) (Çizelge 4.3). AA genotipi HBV enfeksiyonunun kronikleşme riskini 1.54 kat arttırırken istatistiksel olarak anlamlı değildir (P=0.28, OR=1.54 (0.70-3.42)) (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. KHB Grubu ile Kontrol Grubunun HLA-DPB1 rs9277535 Polimorfizminin Alel ve Genotiplerinin Karşılaştırılması

HLA-DPB1 Rs9277535	KHB hasta grubu n =294, (%)	Kontrol grubu n =234, (%)	P değeri	OR (95% CI)
Alel sıklığı				
G	107 (% 18.2)	108 (% 23.1)		1.00 (Referans)
A	481 (% 81.8)	360 (% 76.9)	0.05[a]	1.35 (1.00-1.82)
Genel genotip				
GG	13 (% 4.4)	14 (% 6)	0.15[a]	1.00 (Referans)
AG	81 (% 27.6)	80 (% 34.2)	0.84[b]	1.11 (0.49-2.54)
AA	200 (% 68)	140 (% 59.8)	0.28[b]	1.54 (0.70-3.42)
Dominant genotip				
GG	13 (% 4.4)	14 (% 6)		1.00 (Referans)
AG+AA	281 (% 95.6)	220 (% 94)	0.41[b]	1.39 (0.63-3.04)
Resesif genotip				
GG + AG	94 (% 32)	94 (% 40.2)		1.00 (Referans)
AA	200 (% 68)	140 (% 59.8)	0.06[b]	1.41 (0.98-2.03)

[a]P değeri *chi-square* testi ile hasaplandı. [b]P değeri yaş ve cinsiyete göre uyarlanarak logistic regression analizi ile hesaplandı.

HLA-DPA1 rs3077 polimorfizminin cinsiyete göre analizi; Kronik hepatit B grubu (KHB) ile HBV doğal bağışık kontrol grubundaki kadın ve erkeklerde alt grub analizi yapılarak rs3077 polimorfizmi allel ve genotip frekansları yönünden karşılaştırılmıştır. Erkek alt grup analizinde hasta grubunda bulunan 189 erkekte saptanan G alleli 77 (% 20.4) ve A alleli 301 (% 79.6) idi. HBV doğal bağışık olan grubta ise 114 erkek bulunmakta olup G alleli 37 (% 16.2) ve A alleli 191 (% 83.8) saptanırken istatistiksel açıdan iki gruptaki erkekler arasında allel sıklığı yönünden anlamlı bir fark saptanamamıştır (P=0.21). Genotip yönünden ise GG genotipi 11 (% 5.8), GA genotipi 55 (% 29.1) ve AA genotipi 123 (% 65.1) olarak saptandı. HBV doğal bağışık grubta ise GG genotipi 2 (% 5.8), GA genotipi 33 (% 28.9) ve AA

genotipi ise 79 (% 69.3) idi. Kontrol ve hasta grubundaki erkekler genotip yönünden karşılaştırıldığında ise G alel varlığı KHB kronikleşme riskini arttırmasına rağmen istatiksel olarak anlamlı bir değer saptanmamıştır (P=0.23) (Çizelge 4.4).

Kadın cinsiyeti yönünden her iki gruptaki alel ve genotip sıklıkları karşılaştırıldığında; hasta grubunda 105, kontrol grubunda ise 120 kadın vardı. Hasta grubunda G aleli 41 (% 19.5), A aleli 169 (% 80.5) iken kontrol grubunda G alleli 45 (% 18.8), A alleli 195 (% 81.2) idi. İki grubtaki kadınlar arasında alel sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (P=0,84). Genotip yönünden hasta grubundaki kadınlarda GG genotipi 5 (% 4.8), GA genotipi 31 (% 29.5) ve AA genotipi 69 (% 65.7) olarak saptandı. Kontrol grubunda ise kadınlarda GG genotipi 6 (% 5), GA 33 (% 27.5) ve AA genotipi 81 (% 67.5) olarak belirlenmiştir. Kontrol ve hasta grubundaki kadınlarda genotip yönünden karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (P>0.05) (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. KHB Grubu ile Kontrol Grubundaki Erkeklerde ve Kadınlarda HLA-DPA1 rs3077 Polimorfizminin Alel ve Genotip Sıklığının Karşılaştırılması

Cinsiyet	**rs3077,** Alel/Genotip	**Hasta, n (%)**	**Kontrol, n (%)**	**P değeri**	**OR (95% CI)**
Erkek		189 (64.3)	114 (48.7)		
	A	301 (79.6)	191 (83.8)		1.00 (Referans)
	G	77 (20.4)	37 (16.2)	0.21[a]	1.32 (0.86-2.03)
	AA	123 (65.1)	79 (69.3)	0.23[a]	1.00 (Referans)
	GA	55 (29.1)	33 (28.9)	0.80[b]	1.07 (0.64-1.79)
	GG	11 (5.8)	2 (5.8)	0.11[b]	3.53 (0.76-16.30)
Dominant	AA/GA+GG	123/66	79/35	0.45[b]	1.21 (0.74-1.99)
Resesif	AA+GA/GG	178/11	112/2	0.11[b]	3.46 (0.75-15.90)
Kadın		105 (35.7)	120 (51.3)		
	A	169 (80.5)	195 (81.2)		1.00 (Referans)
	G	41 (19.5)	45 (18.8)	0.84[a]	1.05 (0.6-1.68)
	AA	69 (65.7)	81 (67.5)	0.95[a]	1.00 (Referans)
	GA	31 (29.5)	33 (27.5)	0.74[b]	1.10 (0.61-1.98)
	GG	5 (4.8)	6 (5.0)	0.97[b]	0.98 (0.29-3.35)
Dominant	AA/GA+GG	69/36	81/39	0.78[b]	1.08 (0.62-1.89)
Resesif	AA+GA/GG	100/5	114/6	0.93[b]	0.95 (0.28-3.21)

[a]P değeri *chi-square* testi ile hasaplandı. [b]P değeri yaş ve cinsiyete göre uyarlanarak logistic regression analizi ile hesaplandı.

HLA-DPB1 rs9277535 polimorfizminin cinsiyete göre analizi; KHB grubu ile HBV doğal bağışık kontrol grubundaki kadın ve erkeklerde alt grup analizi yapılarak rs9277535 polimorfizmi allel ve genotip frekansları karşılaştırılmıştır. Erkek alt grup analizinde hasta grubunda bulunan 189 erkekte saptanan G alleli 65 (% 17.2) ve A alleli 313 (% 82.8) idi. HBV doğal bağışık olan grubta ise 114 erkek bulunmakta olup G alleli 57 (% 25) ve A alleli 171 (% 75) saptanırken istatistiksel açıdan iki gruptaki erkekler arasında allel sıklığı yönünden anlamlı bir fark saptanmıştır (P=0.02). Ayrıca A alelinin HBV kronikleşme riskini 1.61 kat arttırdığı

belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Genotip yönünden ise GG genotipi 8 (% 4.2), GA genotipi 49 (% 25.9) ve AA genotipi 132 (% 69.8) olarak saptanmıştır. HBV doğal bağışık grubunda ise GG genotipi 9 (% 7.9), GA genotipi 39 (% 34.2) ve AA genotipi ise 66 (% 57.9) idi. Kontrol ve hasta grubundaki erkekler genotip yönünden karşılaştırıldığında ise G alel varlığı HBV kronikleşme riskini arttırmasına rağmen istatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (P=0.09). Resesif genetik modelde ise AA genotipinin HBV kronikleşme riskini 1.68 kat arttırarak istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (P=0.03) (Çizelge 4.5).

Her iki gruptaki kadın cinsiyetinde rs9277535 polimorfizminin alel ve genotip sıklıkları karşılaştırılmıştır. Hasta grubunda G aleli 42 (% 20), A aleli 168 (% 80) iken kontrol grubunda G aleli 51 (% 21.2), A aleli 189 (% 78.) idi. İki grubtaki kadınlar arasında alel sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (P=0.74). Genotip yönünden hasta grubundaki kadınlarda GG genotipi 5 (% 4.8), GA genotipi 32 (% 30.4) ve AA genotipi 68 (% 64.8) olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda ise kadınlarda GG genotipi 5 (% 4.2), GA 41 (% 34.2) ve AA genotipi 74 (% 61.7) olarak belirlenmiştir. Kontrol ve hasta grubundaki kadınlarda genotip yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (P>0.05) (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. KHB Grubu ile Kontrol Grubundaki Erkeklerde ve Kadınlarda HLA-DPB1 rs9277535 Polimorfizminin Alel ve Genotip Sıklığının Karşılaştırılması

Cinsiyet	**Rs9277535,** Alel/Genotip	**Hasta, n (%)**	**Kontrol, n (%)**	**P değeri**	**OR (95% CI)**
Erkek		189 (64.3)	114 (48.7)		
	G	65 (17.2)	57 (25)		1.00 (Referans)
	A	313 (82.8)	171 (75)	0.02[a]	1.61 (1.07-2.40)
	GG	8 (4.2)	9 (7.9)	0.09[a]	1.00 (Referans)
	GA	49 (25.9)	39 (34.2)	0.52[b]	1.41 (0.50-4.00)
	AA	132 (69.8)	66 (57.9)	0.11[b]	2.25 (0.83-6.09)
Dominant	GG/AG+AA	8/181	9/105	0.18[b]	1.94 (0.73-5.18)
Resesif	GG+AG/AA	57/132	48/66	0.03[b]	1.68 (1.04-2.73)
Kadın		105 (35.7)	120 (51.3)		
	G	42 (20)	51 (21.2)		1.00 (Referans)
	A	168 (80)	189 (78.8)	0.74[a]	1.08 (0.68-1.71)
	GG	5 (4.8)	5 (4.2)	0.83[a]	1.00 (Referans)
	GA	32 (30.4)	41 (34.2)	0.71[b]	0.78 (0.21-2.93)
	AA	68 (64.8)	74 (61.7)	0.90[b]	0.92 (0.25-3.31)
Dominant	GG/AG+AA	5/100	5/115	1.00[b]	0.87 (0.25-3.10)
Resesif	GG+AG/AA	37/68	46/74	0.63[b]	1.14 (0.66-1.97)

[a]P değeri *chi-square* testi ile hasaplandı. [b]P değeri yaş ve cinsiyete göre uyarlanarak logistic regression analizi ile hesaplandı.

HLA geni rs3077 ve rs9277535 polimorfizmlerinin haplotip analizi; Hasta ve kontrol grubu arasında her iki polimorfizmin haplotip analizi yapılarak HBV'nin kronikleşmesi ya da HBV'nin klirensi üzerine etkisi incelendiğinde; yaptığımız haplotip analizinde rs3077 A aleli ve rs9277535 G alelinin oluşturduğu AG hoplotipinin HBV'nin spontan klirens şansını arttırdığı yani koruyucu haplotip olduğu belirlenmiştir (P= 0.003, OR=0.52 (0.34-0.80)) (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. KHB Grubu ile Kontrol Grubunun HLA rs3077 ve rs9277535 Polimorfizmlerinin Haplotip Sıklıklarının Karşılaştırılması

Haplotip HLA rs3077 G/A ve rs9277535 A/G	**Frekans**		**OR (95%CI)**	***P*-değeri**
	Hasta	**Kontrol**		
AA	0.7385	0.6991	1.00 (Referans)	--
GG	0.1211	0.1051	1.11 (0.73-1.67)	0.63
AG	0.0608	0.1257	0.52 (0.34-0.80)	0.003
GA	0.0795	0.0701	1.03 (0.64-1.67)	0.90
Global haplotip ilişkisi *P*-değeri: 0.014				

4.2. Tartışma

Türk popülasyonunda ilk kez yaptığımız bu çalışmada HLA geni rs3077 G/A ve rs9277535 A/G polimorfizmlerinin HBV enfeksiyonunun kronikleşmesi ya da spontan olarak klirensinde etkisi araştırılmıştır. Özellikle son zamanlarda yapılan Asya popülasyonundaki GWAS çalışmalarında bu polimorfizmlerin HBV enfeksiyonunun doğal klirensinde çok anlamlı bir etkisinin olduğu bildirilmiştir (Kamatani ve ark., 2009; Wang ve ark., 2011; Nishida ve ark., 2012). Rs3077 G ve rs9277535 G alelinin HBV enfeksiyonunun kronikleşme riskini arttırdığı bildirilirken rs3077 A ve rs9277535 A alelinin HBV enfeksiyonunun doğal klirens şansını istatistiksel olarak güçlü bir şekilde arttırdığı rapor edilmiştir (Li ve ark., 2011; Wang ve ark., 2011; Hu ve ark., 2012; Nishida ve ark., 2012; Yan ve ark., 2012). Bu sonuçlar ışığında kişiselleştirilmiş medikal-temelli tedavi yönetimlerinin uygulanması düşünülmektedir. Bu düşünceye göre HBV ile enfekte olan kişilerin tedavi yönetiminin ve HBV aşısına yanıt vermeyen bireylerin aşı stratejilerinin HLA genotiplerinin belirlenerek yeniden düzenlenebileceği bildirilmiştir (Howell ve ark., 2009; Davila ve ark., 2010). Bu çalışmaların sonuçları duyulduğunda akut HBV enfeksiyonundan sonra HBV enfeksiyonunun kronikleşme riskini öngörmede umut verici bir gelişme olarak görüldü. Fakat sonraki yapılan çalışmalarda kronik HBV enfeksiyonu ile bu polimorfizmler arasındaki ilişkinin tartışmalı olduğu bildirilmiştir (Vermehren ve ark., 2012; Hu ve ark., 2012; Yan ve ark., 2012; Al- Qahtani ve ark.,

2014). Bundan dolayı HLA genindeki HLA sınıf II moleküllerinin antijen sunum oluğunu oluşturan alfa ve beta zincirlerinin olduğu bölgede yer alan bu polimorfizmlerin HBV enfeksiyonu üzerine etkisini incelemeye karar verdik.

Bu çalışmada HLA rs3077 ve rs9277535 polimorfizmlerin G alellerinin Türk popülasyonundaki kontrol grubunda sıklıkları sırasıyla %17.5 ve %23.1 olarak bulunmuştur. Diğer popülasyonlarda yapılan önceki çalışmalara göre rs3077 G ve rs9277535 G alel sıklıkları dağılımları sırasıyla; Araplarda %23 ve %24, Almanlarda %18 ve %24, Japonlarda %73 ve %70, Çinlilerde %57.2 ve %55.4, Tayvanlılarda %78.5 ve %75 olarak rapor edilmiştir (Al- Qahtani ve ark., 2014; Vermehren ve ark., 2012; Mbarek ve ark., 2011; Wang ve ark., 2011; Cheng ve ark., 2013). Ayrıca Avrupa HapMap Kohort çalışmasında rs3077 G ve rs9277535 G alel sıklıkları %12-16 ve %14-30 arasında verilmiştir (European HapMap Cohort). Yaptığımız bu çalışmada rs3077 ve rs9277535 G alelleri minör alel olarak bulunurken, Asya popülasyonlarında bu aleller majör alel olarak bulunmuştur. Bizim sonuçlarımız "Caucasian" denilen beyaz popülasyondan iki çalışma ile paralellik göstermektedir (Almanya popülasyonu ile Avrupa kohort çalışmasında) (Vermehren ve ark., 2012; Brouwer ve ark., 2014). Fakat bu iki çalışmanın kontrol grubu HBV doğal bağışık bireylerden oluşmamaktaydı. Bizim bu çalışmamız beyazlarda kontrol grubunu HBV doğal bağışık bireylerden oluşturan ilk çalışmadır. Ayrıca Asya çalışmalarında bu polimorfizmlerin G alelleri, GG genotipleri ve GG haplotipleri HBV'nin kronikleşmesi ile yüksekçe ilişkili bulunurken A alelleri, AA genotipleri ve AA haplotipleri HBV'nin spontan klirensi ile ilişkili bulunmuştur (Kamatani ve ark., 2009; Lau ve ark., 2011; Guo ve ark., 2011; Mbarek ve ark., 2011; Wang ve ark., 2011; Nishida ve ark., 2012). Bu sonuçlara zıt olarak bizim sonucumuzda sadece rs9277535 polimorfizminin A aleli anlamlı bir şekilde HBV kronikleşme riskini arttırmıştır (P=0.05, OR=1.35 (1.00-1.82)). rs3077 polimorfizminin ise HBV enfeksiyonu üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca yaptığımız haplotip analizinde Asya popülasyonunda yapılan çalışmaların aksine AG haplotip bloğunun HBV enfeksiyonunun kronikleşmesine karşı koruyucu etki gösterdiği diğer bir ifade ile HBV'nin spontan klirensini sağladığı belirlenmiştir (P=0.03, OR=0.52 (0.34-0.80)). Buna ek olarak tüm genetik modellerde (co-

dominant, dominant, resesif) bu polimorfizimlerin genotipleri kronik HBV enfeksiyon riskini arttırmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bu çalışmaya başlandığında bu polimorfizmlerin HBV enfeksiyonu ile ilişkisini beyaz popülasyonda rapor eden sadece iki çalışma mevcuttu. Bunlardan biri Brouwer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HBeAg pozitif hastaların Peg-IFN tedavisine verdiği yanıtta rs9277535 G alelinin ve GG haplotip bloğunun HBeAg serokonversiyonunu (virüs replikasyonunun engellenmesi, iyileşme belirtisi) arttırdığı fakat rs3077 polimorfizminin herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir (Brouwer ve ark., 2014). Bizim sonucumuz ise rs9277535 A alelinin HBV kronikleşme riskini arttırdığı fakat rs3077 polimorfizminin katkısının olmadığı yönündedir. Yaptığımız çalışmanın sonucu bu çalışmanın sonucu ile benzerlik göstermektedir. Diğer çalışmada ise Vermehren ve arkadaşlarının Almanya'dan yaptığı HBV grubu ile sağlıklı kontrol grubundan oluşan çalışmada rs3077 G alelinin HBV enfeksiyonu ile ilişkili olduğunu fakat rs9277535 polimorfizminin anlamsız olduğunu rapor etmişlerdir (Vermehren ve ark., 2012). Bu çalışmanın kontrol grubu HBV doğal bağışık bireylerden oluşmamasına rağmen bizim çalışmanın sonucu ile uyumlu değildir. Bu çalışmaların dışında Arabistan'dan yapılan çalışmada HBV'li hasta grubu ile HBV doğal bağışık kontrol grubunun karşılaştırılmasında bu polimorfizmlerin HBV enfeksiyonu ile ilişkisi bulanamamıştır fakat kontrol grubu olarak sağlıklı bireyler aldığında GG haplotip bloğunun kronik HBV enfeksiyon riskini arttırdığını bildirmişlerdir (Al-Qahtani ve ark., 2014). Bu çalışmanın sonuçları da bizim sonuçlarımız ile aynı eğilimi göstermemektedir.

Ayrıca çalışmamızda bu polimorfizmlerin cinsiyete göre HBV enfeksiyonunun kronikleşmesinde etkisinin olup olmadığını incelemek için katmanlaştırılmış analiz yapılmıştır. Rs9277535 A aleli taşıyan erkek hastaların 1.61 kat HBV kronikleşme riskine sahip olduğunu ve istatistiksel olarak da anlamlı olduğunu tespit edilmiştir (P=0.02). Fakat aynı analizi rs3077 için yaptığımızda rs3077 G alelinin HBV kronikleşme riskini arttırmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirlenmiştir. Wang ve arkadaşları ise cinsiyete göre bu polimorfizmlerin HBV'nin kronikleşmesi ile ilişkisinin olmadığını bildirmişlerdir (Wang ve ark., 2011). Bu sonuç bizim çalışmamızın sonuçlarından rs3077 için

uyumlu iken rs9277535 için uyumlu değildir. Buna ek olarak diğer bir çalışmada ise rs3077 polimorfizminin erkekler ve kadınlar arasında herhangi bir anlamının olmadığını rapor etmişlerdir (Seto ve ark., 2013). Çin'den bildirilen bu iki çalışma rs3077 için bizim sonuçlarımız ile paralellik göstermesine rağmen rs9277535 polimorfizmi için uyumlu değildir. Ayrıca Tayvan'dan yapılan çalışmada HBeAg negatif erkek hastalarda rs9277535 GA ve AA genotipinin HBsAg seroklirensi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Cheng ve ark., 2013). Bu çalışmanın sonucu düşünüldüğünde rs9277535 A alelinin HBV enfeksiyonuna karşı koruyucu etkiye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonuç bizim sonucumuz ile uyumlu değildir. Erkeklerin kadınlara göre daha fazla HBV enfeksiyon riskine sahip olmasının temel sebebi önceki yapılan çalışmalarda bildirildiği üzere androjen hormonlarının HBV'nin transkripsiyonunu artırdığına yönelik bulgularıdır. Buna ek olarak kadınlardaki östrojen hormonunun kupffer hücrelerinde (karaciğer makrofajı) eksprese olan interlökin-6 sitokinini inhibe ettiği ve bundan dolayı karaciğer hastalıklarından kadınları koruduğu bildirilmiştir (Naugler ve ark., 2007; Wang ve ark., 2009).

Bu çalışmanın birkaç sınırlayıcı faktörü bulunmaktadır. İlk olarak çalışmaya katılan bireylerin Türkiye'nin güneyinde bulunan Akdeniz bölgesindeki Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesinden seçilmiştir. Dolayısıyla tüm popülasyondaki HBV pozitif ve HBV doğal bağışık bireyleri yansıtmamaktadır. İkinci olarak çalışmada cinsiyete göre alt grup analizi yapıldığında örneklem sayısının düşmesi çalışmayı sınırlamıştır. Cinsiyet yönünden daha büyük örnek sayısı ile cinsiyetteki etkisi araştırılmalıdır. Üçüncü olarak farklı etnik popülasyonlardaki farklı genetik varyasyonlar nedeniyle bu çalışma Türk popülasyonundaki bireyler ile sınırlandırılmıştır. Dördüncü olarak immune sistemin yanıtını etkileyebilen diğer gen-gen, gen-çevre ve aynı gen üzerindeki farklı yerlerdeki etkileşimler göz önüne alınmamıştır.

Son zamanlarda özellikle Asya popülasyonunda yürütülen çalışmalarda immün sistemde antijen sunumunda görev alan HLA sınıf II moleküllerinin alfa ve beta zincirlerini kodlayan HLA-DPA1 ve HLA-DPB1 genlerinin 3'-UTR (proteine kodlanmayan) bölgesinde yer alan rs3077 ve rs9277535 polimorfizmlerinin

aminoasit değişimine neden olmamasına rağmen genlerin transkripsiyonel olarak düzenlenmesinde rol alan mikroRNA'ların genlere bağlanma alanı üzerindeki mikroRNA-mRNA etkileşimini bozduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2011; Yu ve ark., 2007). Bundan dolayı HLA sınıf II moleküllerinin $CD4^+$ T hücrelerine HBV proteinlerinin sunumu etkilenebilmekte ve bunun sonucu olarak HBV'nin kronikleşmesinde veya klirensinde rol oynayabilmektedir.

Bu çalısmanın sonucu olarak HLA-DPB1 geni rs9277535 polimorfizminin özellikle erkeklerde HBV enfeksiyonunun kronikleşmesi üzerinde major etkiye sahip olduğu bulunmuştur. HLA-DPA1 geni rs3077 polimorfizminin ise HBV ile ilişkisi olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızın beyaz popülasyonda kontrol grubunun doğal bağışık bireylerden seçildiği ilk çalışma olması nedeniyle çalışmamızın literatüre katkısı önemli olacaktır. Beyaz popülasyonda yapılan kontrol grubunun doğal bağışık olmayan bireylerden oluştuğu diğer iki çalışmanın sonuçlarının çelişkili olması bu konunun aydınlatılması için diğer beyaz popülasyonlarda kontrol grubunun doğal bağışık bireylerden oluştuğu çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'nda kronik hepatit B tanısı konmuş hastalarda HLA-DPA1 geni rs3077 ve HLA-DPB1 geni rs9277535 polimorfizmlerinin HBV enfeksiyonunun kronikleşmesinde bir risk faktörü olup olmadığı akut HBV enfeksiyonundan sonra hastalığın prognozu için bir biyomarkır olup olamayacağının belirlenmesi amaçlanmıştır.

1. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda HLA-DPA1 geni rs3077 polimorfizminin G alel ve GG genotipinin HBV enfeksiyonunun kronikleşme riskini arttırmasına rağmen istatistiksel anlamının olmadığı tespit edilmiştir (sırasıyla, P=0.29, OR=1.18 (0.87-1.62) ve P=0.25, OR=1.67 (0.69-3.99)). HLA-DPB1 geni rs9277535 polimorfizminin A alelinin HBV kronikleşme riskini 1.35 kat arttırarak bir risk faktörü olduğu istatistiksel olarak önemli katkıda bulunduğu belirlenmiştir (P=0.05). HLA-DPB1 geni rs9277535 polimorfizminin AG ve AA genotiplerinin ise HBV kronikleşme riskini arttırmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (P=0.84, OR=1.11 (0.49-2.54); P=0.28, OR=1.54 (0.70-3.42)).
2. Ayrıca yaptığımız haplotip analizinde AG haplotip bloğunun HBV enfeksiyonunun kronikleşmesine karşı koruyucu etki gösterdiği diğer bir ifade ile HBV'nin spontan klirensini sağladığı belirlenmiştir (P=0.03, OR=0.52 (0.34-0.80)).
3. Bu polimorfizmlerin cinsiyete göre HBV kronikleşme riski üzerine etkisini incelediğimizde rs9277535 A aleli taşıyan erkek hastaların 1.61 kat HBV kronikleşme riskine sahip olduğunu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (P=0.02). Fakat aynı analizi rs3077 için yaptığımızda rs3077 G alelinin HBV kronikleşme riskini arttırmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (P=0.32, OR=1.32 (0.86-2.03)). Bu

polimorfizmlerin cinsiyete göre genotip analizleri yapıldığında rs9277535 polimorfizminin resesif genetik modelde de HBV kronikleşme riskini 1.68 kat arttırarak istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (P=0.03). Diğer genetik modellerde ne rs9277535 ne de rs3077 için istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Kadınlarda ise bu polimorfizmlerin herhangi bir katkısının olmadığı belirlenmiştir.

4. Bu çalışmada HLA rs3077 ve rs9277535 polimorfizmlerin G alellerinin Türk popülasyonundaki kontrol grubunda sıklıkları sırasıyla %17.5 ve %23.1 olarak bulunmuştur. Diğer popülasyonlarda ise rs3077 G ve rs9277535 G alel sıklıkları dağılımları sırasıyla; Araplarda %23 ve %24, Almanlarda %18 ve %24, Japonlarda %73 ve %70, Çinlilerde %57.2 ve %55.4, Tayvanlılarda %78.5 ve %75 olarak rapor edilmiştir Avrupa HapMap Kohort çalışmasında rs3077 G ve rs9277535 G alel sıklıkları %12-16 ve %14-30 arasında verilmiştir. Popülasyon genetiğine bağlı olarak alel sıklıklarının değiştiği görülmektedir.
5. HBV'li hasta grubu ile kontrol grubunun yaşa göre değerlendirilmesinde kontrol grubunun daha ileri yaşa sahip olduğu (HBV ortanca yaş=50; kontrol yaş=53) ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (P=0.01,). İleri yaşta enfeksiyona maruz kalındığında ileri yaşın HBV klirensinde pozitif katkısı olduğu tespit edilmiştir.
6. HBV'li hasta grubu ile kontrol grubunun cinsiyet dağılımı değerlendirilmesinde HBV grubunun %64.3'ünün, kontrol grubunun ise %48.7'sinin erkek olduğu görülmüştür. Erkek cinsiyetin HBV enfeksiyonunun kronikleşmesinde bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir (P=0.001).

5.2. Öneriler

· Bu çalışma Türk popülasyonunda yapılan ilk çalışmadır. Ayrıca beyaz popülasyonda (Caucasian) kontrol grubunun HBV doğal bağışık olduğu dünyadaki ilk çalışma olması nedeniyle sonuçlarımızın literatüre yapacağı

katkısı çok değerli olacaktır. Ancak cinsiyete göre alt grup analizinde örnek sayısının düşmesinden dolayı bu çalışmanın örnek sayısının arttırılarak istatistiksel olarak çalışmanın gücünün arttırılması ve farklı beyaz popülasyonlarda da çalışılması bu konunun aydınlatılması için önemli katkı sağlayacaktır.

- Asya'dan yapılan çalışmalarda iddia edildiği üzere HBV'nin tedavi stratejilerinin bu polimorfizmlere göre yeniden düzenlenmesinin özellikle immün töleran dönemde olan bireylerde bekle-gör stratejisi yerine hemen tedaviye başlamanın doğru olmayacağı kanısındayız.
- Bu polimorfizmlere bağlı olarak HBV aşısına yanıtsız bireylerin aşı dozu ve uygulamalarının yeniden düzenlenmesinin de uygun olmayacağı kanısındayız.
- Bu polimorfizmlerden rs9277535 polimorfizminin bir biyomarkır olarak HBV enfeksiyonunun kronikleşmesinde kullanılabileceğini fakat rs3077'nin kullanılmasının doğru olmayacağını kanısındayız.
- Erkek cinsiyetin HBV enfeksiyonunda bir risk faktörü olduğunun onaylandığı bu çalışma erkek bireylerin HBV aşısını mutlaka yaptırmaları gerektiğini (ileri yaş erkekler için de geçerli) tavsiye etmektedir.

KAYNAKLAR

ABBAS, A., MURPHY, K., SHER, A., 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature, 383(6603): 787-93.

ABBAS, A.K., AND LICHTMAN, A.H., 2003. The Major Histocompatibility Complex. Cellular and Molecular Immunology, W.B. Saunders Co, Philadelphia, Pennsylvania-USA, s. 65-80.

AGERBERTH, B., GUDMUNDSSON, G., 2006. Host antimicrobial defence peptides in human disease. Curr Top Microbiol Immunol, 306: 67–90.

AHN, S.H., HAN, K.H., PARK, J.Y., LEE, C.K., KANG, S.W., CHON, C.Y., KIM, Y.S., PARK, K., KIM, D.K., MOON, Y.M., 2000. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. Hepatology, 31(6):1371–1373.

AL-QAHTAN, A.A., AL-ANAZI, M.R., ABDO, A.A., SANAI, F.M., AL-HAMOUDI, W., ALSWAT, K.A., AL-ASHGAR, H.I., KHALAF, N.Z., ELDALI, A.M., VISWAN, N.A., AL-AHDAL, M.N., 2014. Association between HLA variations and chronic hepatitis B virus infection in Saudi Arabian patients. PLoS One, 9(1): e80445.

ANDO, K., MORIYAMA, T., GUIDOTTI, L.G., WIRTH, S., SCHREIBER, R.D., SCHLICHT, H.J., HUANG, S.N., CHISARI, F.V., 1993. Mechanisms of class I restricted immunopathology: a transgenic mouse model of fulminant hepatitis. J Exp Med, 178: 1541–54.

BAQAI, S.F., PROUDFOOT, J., YI, D.H., MANGAHAS, M., GISH, R.G., 2015. High rate of core promoter and precore mutations in patients with chronic hepatitis B. Hepatol. Int, 9: 209–217.

BAR-YISHAY, I., SHAUL, Y., SHLOMAI, A., 2011. Hepatocyte metabolic signalling pathways and regulation of hepatitis B virus expression. Liver Int, 31: 282-90.

BEASLEY, R.P., HWANG, L.Y., LEE, G.C., LAN, C.C., ROAN, C.H., HUANG, F.Y., CHEN, C.L., 1983. Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B virus infections with hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine. Lancet, 2(8359):1099-102.

BELLONI, L., POLLICINO, T., DE NICOLA, F., GUERRIERI, F., RAFFA, G., FANCIULLI, M., RAIMONDO, G., LEVRERO, M., 2009. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. Proc Natl Acad Sci U S A, 106: 19975-9.

BERTOLETTI, A., TAN, A.T., GEHRING, A.J., 2009. HBV-specific adaptive immunity. Viruses, 1: 91–103.

BLOCK, T.M., GISH, R., GUO, H., MEHTA, A., CUCONATI, A., LONDON, W.T., GUO, J.T., 2013. Chronic hepatitis B: what should be the goal for new therapies. Antiviral Res, 98: 27–34.

BOCK, C.T., SCHWINN, S., SCHRODER, C.H., VELHAGEN, I., ZENTGRAF, H., 1996. Localization of hepatitis B virus core protein and viral DNA at the nuclear membrane. Virus Genes, 12:53–63.

BOWERS, W., 2006. Immunology -Chapter Thirteen: Immunoregulation Microbiology and Immunology On-Line Textbook. USC School of Medicine.

BRASSARD, D.L., GRACE, M.J., BORDENS, R.W., 2002. Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein. J. Leukoc. Biol, 71: 565–581.

BROUWER, W.P., SONNEVELD, M.J., TABAK, F., SIMON, K., CAKALOGLU, Y., AKARCA, U.S., ZEUZEM, S., FERENCI, P., HEATHCOTE, J.E., DE KNEGT, R.J., BOONSTRA, A., HANSEN, B.E., JANSSEN, H.L., 2014. Polymorphisms of HLA-DP are associated with response to peginterferon in Caucasian patients with chronic hepatitis B. Aliment Pharmacol Ther, 40(7): 811-8.

BUSTER, E.H., JANSSEN, H.L., 2006. Antiviral treatment for chronic hepatitis B virus infection – immune modulation or viral suppression. Neth. J. Med. 64(6): 175–185.

CHANG, S.W., FANN, C.S., SU, W.H., WANG, Y.C., WENG, C.C., YU, C.J., HSU, C.L., HSIEH, A.R., CHIEN, R.N., CHU, C.M., TAI, D.I., 2014. A genome-wide association study on chronic HBV infection and its clinical progression in male Han-Taiwanese. PLoS One, 18;9(6): e99724.

CHARLES, A., JANEWAY J.R., 2005. Immunobiology. (6th ed. bas.). Garland Science. ISBN 0-443-07310-4.

CHENG, H.R., LIU, C.J., TSENG, T.C., SU, T.H., YANG, H.I., CHEN, C.J., KAO, J.H., 2013. Host genetic factors affecting spontaneous HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B patients. PLoS One, 8(1): e53008.

CHIEN, R.N., LIAW, Y.F., 2008. Nucleos(t)ide analogues for hepatitis B virus: strategies for long-term success. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol, 22: 1081–1092.

CHIOU, C.C., LUO, J.D., CHEN, T.L., 2006. Single-tube reaction using peptide nucleic acid as both PCR clamp and sensor probe for the detection of rare mutations. Nat Protoc, 1(6): 2604-12.

CHU, C.J., KEEFFE, E.B., HAN, S.H., PERRILLO, R.P., MIN, A.D., SOLDEVILA-PICO, C., CAREY, W., BROWN J.R., R.S., LUKETIC, V.A., TERRAULT, N., LOK, A.S.GROUP, U.S.H.E.S., 2003. Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. Hepatology, 38: 619–628.

COURSAGET, P., YVONNET, B., CHOTARD, J., VINCELOT, P., SARR, M., DIOUF, C., CHIRON, J.P., DIOP-MAR, I., 1987. Age- and sex-related study of hepatitis B virus chronic carrier state in infants from an endemic area (Senegal). J Med Virol, 22(1):1-5.

DANE, D.S., CAMERON, C.H., BRIGGS, M., 1970. Virus-like particles in serum of patientswith Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet, 1:695–698.

DAVILA, S., FROELING, F.E., TAN, A., BONNARD, C., BOLAND, G.J., SNIPPE, H., HIBBERD, M.L., SEIELSTAD, M., 2010. New genetic associations detected in a host response study to hepatitis B vaccine. Genes Immun, 11(3): 232-8.

DAVIS, G.L., HOOFNAGLE, J.H., WAGGONER, J.G., 1984. Spontaneous reactivation of chronic hepatitis B virus infection. Gastroenterology, 86: 230–235.

DELVES, P.J., ROITT, I.M., 2000. Advances in immunology: the immune system. N Engl J Med, 343: 108–17.

DER, S.D., ZHOU, A., WILLIAMS, B.R.G., SILVERMAN, R.G., 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 95: 15623–15628.

DORAK, M.T., 2006. Real-Time PCR (Advanced Methods Series). Oxford: Taylor & Francis, s.102-103.

DUNN, C., PEPPA, D., KHANNA, P., NEBBIA, G., JONES, M., BRENDISH, N., LASCAR, R.M., BROWN, D., GILSON, R.J., TEDDER, R.J., DUSHEIKO, G.M., JACOBS, M., KLENERMAN, P., MAINI, M.K., 2009. Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. Gastroenterology, 137: 1289–1300.

EASL., 2009. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B. J.Hepatol, 50: 227–242.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC), 2010. Hepatitis B and C in the EU neighbourhood: prevalence, burden of disease and screening policies. September.

EVANS, A.A., 1998. Epidemiology of hepatitis B. (In Zuckerman AJ, Thomas HC (editors). Viral hepatitis. London: Harcourt, LONDON, s.107–114.

FEITELSON, M.A., REIS, H.M., TUFAN, N.L., SUN, B., PAN, J., LIAN, Z., 2009. Putative roles of hepatitis B x antigen in the pathogenesis of chronic liver disease. Cancer Lett, 286: 69–79.

FERRARI, C., MISALE, G., BONI, C., URBANI, S., 2003. EASL International Consensus Conferance on hepatitis B:Immunopathogenesis of Hepatitis B. Journal of Hepatology, 39:1-7

FLINK, H.J., SPRENGERS, D., HANSEN, B.E., VAN ZONNEVELD, M., DE MAN, R.A., SCHALM, S.W., JANSSEN, H.L., 2005. Flares in chronic hepatitis B patients induced by the host or the virus? Relation to treatment response during peg-interferon alpha-2b therapy. Gut, 54: 1604–1609.

FORBES, S.A., TROWSDALE, J., 1999. The MHC quarterly report. Immunogenetics, 50: 152-9.

FRANCO, A., GUIDOTTI, L.G., HOBBS, M.V., PASQUETTO, V., CHISARI, F.V., 1997. Pathogenetic effector function of CD4-positive T helper 1 cells in hepatitis B virus transgenic mice. J Immunol, 159: 2001–08.

FRENETTE, C.T., GISH, R.G., 2009. To ‘‘Be’’ or not to ‘‘Be’’: that is the question. Am. J.Gastroenterol, 104: 1948–1952.

GANEM, D., 1991. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. Curr. Top. Microbiol. Immunol, 168:61–83.

GANEM, D., PRINCE, A.M., 2004. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. N Engl J Med, 350(11): 1118–1129.

GERIN, J.L., 1990. Experimental WHV infection of woodchucks: an animal model of hepadnavirus-induced liver cancer. Gastroenterol Jpn Suppl, 2: 38–42.

GISH, R.G., GIVEN, B.D., LAI, C.L., LOCARNINI, S.A., LAU, J.Y., LEWIS, D.L., SCHLUEP, T., 2015. Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. Antiviral Res, 121: 47-58.

GLAS, R., BOGYO, M., MCMASTER, J.S., GACZYNSKA, M., PLOEGH, H.L., 1998. A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. Nature, 392: 618-22.

GOODBOURN, S., DIDCOCK, L., RANDALL, R.E., 2000. Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral responses, and virus countermeasures. J. Gen. Virol, 81: 2341–2364.

GREWAL, I.S., FLAVELL, R.A., 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. Annu Rev Immunol, 16: 111-35.

GUERMONPREZ, P., VALLADEAU, J., ZITVOGEL, L., THÉRY, C., AMIGORENA, S., 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol, 20: 621-67.

GUIDOTTI, L.G., ROCHFORD, R., CHUNG, J., SHAPIRO, M., PURCELL, R., CHISARI F.V., 1999. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. Science, 284: 825–29.

GUO, X., ZHANG, Y., LI, J., MA, J., WEI, Z., TAN, W., O'BRIEN, S.J., 2011. Strong influence of human leukocyte antigen (HLA)-DP gene variants on development of persistent chronic hepatitis B virus carriers in the Han Chinese population. Hepatology, 53(2): 422-8.

GUO, Y.H., LI, Y.N., ZHAO, J.R., ZHANG, J., YAN, Z., 2011. HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. Epigenetics, 6: 720–726.

GUST, I.D., 1996. Epidemiology of hepatitis B infection in the Western Pacific and South East Asia. Gut, 38(Suppl. 2): S18–23.

HAJJOU, M., NOREL, R., CARVER, R., MARION, P., CULLEN, J., ROGLER, L.E., ROGLER, C.E., 2005. cDNA microarray analysis of HBV transgenic mouse liver identifies genes in lipid biosyntheticand growth control pathways affected by HBV. J Med Virol, 77: 57-65.

HARTY, J., TVINNEREIM, A., WHITE, D., 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. Annu Rev Immunol, 18: 275–308.

HE, D., TAO, S., GUO, S., LI, M., WU, J., HUANG, H., GUO, X., YAN, G., ZHU, P., WANG, Y., 2015. Interaction of TLR-IFN and HLA polymorphisms on susceptibility of chronic HBV infection in Southwest Han Chinese. Liver Int, 35(8): 1941-9.

HEID, C.A., STEVENS, J., LIVAK, K.J., WILLIAMS, P.M., 1996. Real-time quantitative PCR. Gen. Res, 6: 986-994.

HOLTMEIER, W., KABELITZ, D., 2005. Gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. Chem Immunol Allergy, 86: 151-83.

HONG, M., SANDALOVA, E., LOW, D., GEHRING, A.J., FIENI, S., AMADEI, B., URBANI, S., CHONG, Y.S., GUCCIONE, E., BERTOLETTI, A., 2015. Trained immunity in newborn infants of HBV-infected mothers. Nat. Commun, 6: 6588.

HOWELL, J.A., VISVANATHAN, K., 2009. A novel role for human leukocyte antigen-DP in chronic hepatitis B infection: a genomewide association study. Hepatology, 50(2): 647-9.

HU, L., ZHAI, X., LIU, J., CHU, M., PAN, S., JIANG, J., ZHANG, Y., WANG, H., CHEN, J., SHEN, H., HU, Z., 2012. Genetic variants in human leukocyte antigen/DP-DQ influence both hepatitis B virus clearance and hepatocellular carcinoma development. Hepatology, 55(5):1426-31.

IANNACONE, M.S., GIOVANNI, GUIDOTTI, L.G., 2006. Pathogenetic and antiviral immune responses against hepatitis b virus. Future Virol, 1(2): 189–196.

JAFRI, S.M., LOK, A.S., 2010. Antiviral therapy for chronic hepatitis B. Clin. Liver Dis, 14(3): 425-38.

JIANG, D.K., MA, X.P., YU, H., CAO, G., DING, D.L., CHEN, H., 2015. Genetic variants in five novel loci including CFB and CD40 predispose to chronic hepatitis B. Hepatology, 62(1): 118-28.

JIANG, X., MA, Y., CUI, W., LI, M.D., 2014. Association of variants in HLA-DP on chromosome 6 with chronic hepatitis B virus infection and related phenotypes. Amino Acids, 46: 1819–1826.

JUNG, M.C., PAPE, G.R.., 2002. Immunology of hepatitis B infection. Lancet Infect Dis, 2(1): 43-50.

KAJINO, K., JILBERT, A.R., SAPUTELLI, J., ALDRICH, C.E., CULLEN, J., MASON, W.S., 1994. Woodchuck hepatitis virus infections:very rapid recovery after prolonged viremia and infection of virtually every hepatocyte. J Virol, 68: 5792–803.

KAMATANI, Y., WATTANAPOKAYAKIT, S., OCHI, H., KAWAGUCHI, T., TAKAHASHI, A., HOSONO, N., KUBO, M., TSUNODA, T., KAMATANI, N., KUMADA, H., PUSEENAM, A., SURA, T., DAIGO, Y., CHAYAMA, K., CHANTRATITA, W., NAKAMURA, Y., MATSUDA, K., 2009. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. Nat Genet, 41(5): 591–595.

KAO, J.H., 2002. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and olecularcharacteristics. J. Gastroenterol. Hepatol, 17:643–650.

KARAASLAN, H., YURDAYDIN, C., 2009. Viral hepatitis at the Black Sea region: the problem of viral hepatitis in Turkey revisited. Turk J Gastroenterol, 20:1-2.

KARIYAWASAM, H., ROBINSON, D., 2006. The eosinophil: the cell and its weapons, the cytokines, its locations. Semin Respir Crit Care Med, 27(2): 117-27.

KAUFMAN, J., 2000. The generation and selection of Major Histocompatibility Complex polymorphisms, (Ed. R. Lechler, ve A. Warrens)' da, "HLA in Health and Disease" II. Baskı, Academic Press, London, s.171-181.

KAWAI, T., AKIRA, S., 2006. Innate immune recognition of viral infection. Nat Immunol, 7(2): 131-7.

KAZUHIRO, K., GUIDOTTI, L.C., YASUHIKO, K., CHISARI, F.V., 2000. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. J Exp Med, 192: 921–30.

KEHRY, M., HODGKIN, P., 1994. B-cell activation by helper T-cell membranes. Crit Rev Immunol, 14 (3–4): 221-38.

KEW, M.C., 1996. Progress towards the comprehensive control of hepatitis B in Africa: a view from South Africa. Gut, 38: S31–36.

KIM, J.W., LEE, S.H., PARK, Y.S., HWANG, J.H., JEONG, S.H., KIM, N., LEE, D.H., 2011. Replicative activity of hepatitis B virus is negatively associated with methylation of covalently closed circular DNA in advanced hepatitis B virus infection. Intervirology, 54: 316-25.

KIM, K.H., SHIN, H.J., KIM, K., CHOI, H.M., RHEE, S.H., MOON, H.B., KIM, H.H., YANG, U.S., YU, D.Y., CHEONG, J., 2007. Hepatitis B virus X protein induces hepatic steatosis via transcriptional activation of SREBP1 and PPARgamma. Gastroenterology, 132: 1955-67.

KLEIN, J., 1986. Natural history of the major histocompatibility complex. John Wiley, New York.

KLEIN, J., SATO, A., 2000. The HLA system. Second of two parts. N Engl J Med, 343(11): 782-6.

KLUG., W.S., CUMMINGS., M.R., 2003. Genetics: A Molecular Perspective. Prentice Hall. 691pp.

KONDO, Y., NINOMIYA, M., KAKAZU, E., KIMURA, O., SHIMOSEGAWA, T., 2013. Hepatitis B surface antigen could contribute to the immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. ISRN Gastroenterol, 2013: 935295.

KOVACS, B., MAUS, M., RILEY, J., DERIMANOV, G., KORETZKY, G., JUNE, C., FINKEL, T., 2002. Human CD8+ T cells do not require the polarization of lipid rafts for activation and proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(23): 15006-11.

KOWDLEY, K.V., WANG, C.C., WELCH, S., ROBERTS, H., BROSGART, C.L., 2012. Prevalence of chronic hepatitis B among foreign-born persons living in the United States by country of origin. Hepatology, 56: 422–433.

KRISHNASWAMY, G., AJITAWI, O., CHI, D., 2006. The human mast cell: an overview. Methods Mol Biol, 315: 13–34.

KUO, A., GISH, R., 2012. Chronic hepatitis B infection. Clin. Liver Dis, 16: 347–369.

LAI, C.L., WONG, D., IP, P., KOPANISZEN, M., SETO, W.K., FUNG, J., HUANG, F.Y., LEE, B.P., CULLARO, G., WU, C.H., CHENG, C., YUEN, C.H.J., NGAI, V., YUEN, M.F., 2014. Profound reduction in HBV covalently closed circular DNA with long-term nucleosid/tide analogue therapy. Hepatology, 60: 1090A.

LAMPERTICO, P., 2015. The royal wedding in chronic hepatitis B: the haves and the have-nots for the combination of pegylated interferon and nucleos(t)ide therapy. Hepatology, 61: 1459–1461.

LANG, T., LO, C., SKINNER, N., LOCARNINI, S., VISVANATHAN, K., MANSELL, A., 2011. The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway. J Hepatol, 55: 762-9.

LANGERMANS, J., HAZENBOS, W., VAN, FURTH, R., 1994. Antimicrobial functions of mononuclear phagocytes. J Immunol Methods, 174(1–2): 185-94.

LAU, K.C., LAM, C.W., LAW, C.Y., LAI, S.T., TSANG, T.Y., SIU, C.W., TO, W.K., LEUNG, K.F., MAK, C.M., POON, W.T., CHAN, P.K., CHAN, Y.W., 2011. Non-invasive screening of HLA-DPA1 and HLA-DPB1 alleles for persistent hepatitis B virus infection: susceptibility for vertical transmission and toward a personalized approach for vaccination and treatment. Clinica Chimica Acta, 412(11-12): 952-7.

LAVANCHY, D., 2004. Hepatitis B virüs epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. Journal of Viral Hepatitis, 11: 97-107.

LE, Y., ZHOU, Y., IRIBARREN, P., WANG, J., 2004. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. Cell Mol Immunol, 1(2): 95–104.

LEE, W.M., 1997. Hepatitis B virus infection. N Engl J Med, 337: 1733–45.

LEWELLYN, E.B., LOEB, D.D., 2011. The arginine clusters of the carboxy-terminal domain of the core protein of hepatitis B virus make pleiotropic contributions to genome replication. J. Virol, 85:1298–1309.

LI, J., YANG, D., HE, Y., WANG, M., WEN, Z., LIU, L., YAO, J., MATSUDA, K., NAKAMURA, Y., YU, J., JIANG, X., SUN, S., LIU, Q., JIANG, X., SONG, Q., CHEN, M., YANG, H., TANG, F., HU, X., WANG, J., CHANG, Y., HE, X., CHEN, Y., LIN, J., 2011. Associations of HLA-DP variants with hepatitis B virus infection in southern and northern Han Chinese populations: a multicenter case-control study. PLoS One, 6(8): e24221.

LIAW, Y.F., LEUNG, N., KAO, J.H., PIRATVISUTH, T., GANE, E., HAN, K.H., GUAN, R., LAU, G.K., LOCARNINI, S., 2008. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update. Hepatol. Int, 2: 263–283.

LISZEWSKI, M., FARRIES, T., LUBLIN, D., ROONEY, I., ATKINSON, J., 1996. Control of the complement system. Adv Immunol, 61: 201-83.

LITMAN, G., CANNON, J., DISHAW, L., 2005. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. Nat Rev Immunol, 5(11): 866-79.

LIU, J., YANG, H.I., LEE, M.H., LU, S.N., JEN, C.L., BATRLA-UTERMANN, R., WANG, L.Y., YOU, S.L., HSIAO, C.K., CHEN, P.J., CHEN, C.J. GROUP, R.E.V.E.A.L.H.S., 2014. Spontaneous seroclearance of hepatitis B seromarkers and subsequent risk of hepatocellular carcinoma. Gut, 63: 1648–1657.

LIVAK, K.J., FLOOD, S.J., MARMARO, J., GIUSTI, W., DEETZ, K., 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. Gen. Res, 4: 357-362.

LOHMANN, S., LEHMANN, L. VE TABITI, K., 2000. Fast and Flexible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System. Biochemica, 4: 23-28.

LOK, A.S., MCMAHON, B.J., 2009. Chronic hepatitis B: update 2009. Hepatology, 50: 661–662.

LUTGEHETMANN, M., VOLZ, T., KOPKE, A., BROJA, T., TIGGES, E., LOHSE, A.W., FUCHS, E., MURRAY, J.M., PETERSEN, J., DANDRI, M., 2010. In vivo proliferation of hepadnavirus-infected hepatocytes induces loss of covalently closed circular DNA in mice. Hepatology, 52(1): 16-24.

MANNSMANN, U., HERZIG, M., 2010. "The use of SNP profiles as clinical markers". IMBI, University of Heidelberg. http://www.biometrie.uni-heidelberg.de/mitarb eiter/MansmannUlrich, (Erişim tarihi: 10.12.2015).

MARTIN, P., LEIBOVICH, S., 2005. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. Trends Cell Biol, 15(11): 599–607.

MARUYAMA, T, KUWATA, S., KOIKE, K., LINO, S., YASUDA, K., YOTSUYANAGI, H., MORIYA, K., MAEKAWA, H., YAMADA, H., SHIBATA, Y., MILICH, D.R., 1998. Precore wild-type DNA and immune complexes persist in chronic hepatitis B after seroconversion: no association between genome conversion and seroconversion. Hepatology, 27: 245–53.

MARUYAMA, T., MCLACHLAN, A., LINO, S., KOIKE, K., KUROKAWA, K., MILCH, D.R., 1993. The serology of chronic hepatitis B infection revisited. J Clin Invest, 91: 2586–95.

MASON, W.S., JILBERT, A.R., SUMMERS, J., 2005. Clonal expansion of hepatocytes during chronic woodchuck hepatitis virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A, 102: 1139-44.

MAY, R., MACHESKY, L., 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. J Cell Sci, 114(Pt 6): 1061–77.

MAYER, G., 2006. Immunology - Chapter One: Innate (non-specific) Immunity. Microbiology and Immunology On-Line Textbook. USC School of Medicine.

MBAREK, H., OCHI, H., URABE, Y., KUMAR, V., KUBO, M., HOSONO, N., TAKAHASHI, A., KAMATANI, Y., MIKI, D., ABE, H., TSUNODA, T., KAMATANI, N., CHAYAMA, K., NAKAMURA, Y., MATSUDA, K., 2011. A genome-wide association study of chronic hepatitis B identified novel risk locus in a Japanese population. Hum Mol Genet, 20(19): 3884-92.

MCHEYZER-WILLIAMS, L.J., MALHERBE, L., MCHEYZER-WILLIAMS M.G, 2006. Helper T cell-regulated B cell immunity. Curr Top Microbiol Immunol, 311: 59–83.

MCMAHON, B.J., 2005. Epidemiology and natural history of hepatitis B. Semin. Liver Dis, 25(Suppl. 1): 3–8.

MEDZHITOV, R., 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature, 449(7164): 819–26.

MHC SEQUENCING CONSORTIUM., 1999. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. Nature, 401(6756): 921-3.

MIDDLETON, D., CURRAN, M., MAXWELL, L., 2002. Natural killer cells and their receptors. Transpl Immunol, 10(2–3): 147-64.

MILICH, D.R, MCLACHLAN, A., 1986. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T cell-independent and a T cell-dependent antigen. Science, 234: 1398–401.

MILLER, S.B., 2006. Prostaglandins in Health and Disease: An Overview. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 36(1): 37–49.

MİSTİK, R., 2007. Ülkemizde kronik viral hepatitlerin epidemiyolojisi. Klimik Dergisi, 20 (özel sayı 1): 61-3.

MORIYAMA, T., GUILHOT, S., KLOPCHIN, K., MOSS, B., PINKERT, C.A., PALMITER, R.D., BRINSTER, R.L., KANAGAWA, O., CHISARI, F.V., 1990. Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virüs transgenic mice. Science, 248(4953): 361–64.

NASSAL, M., 2008. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. Virus. Res. Res, 134:235–249.

NAUGLER, W.E., SAKURAI, T., KIM, S., MAEDA, S., KIM, K., ELSHARKAWY, A.M., KARIN, M., 2007. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. Science, 317(5834): 121-4.

NELSON, D.L., COX, M.M., 2000. Lehninger Principles of Biochemistry. (Kılıç, N, Editör, 2005). Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. 3. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, s.221-228.

NISHIDA, N., SAWAI, H., MATSUURA, K., SUGIYAMA, M., AHN, S.H., PARK, J.Y., 2012. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. PLoS One, 7(6): e39175.

O'BRIEN, T.R., KOHAAR, I., PFEIFFER, R.M., MAEDER, D., YEAGER, M., SCHADT, E.E., PROKUNINA-OLSSON, L., 2011. Risk alleles for chronic hepatitis B are associated with decreased mRNA expression of HLA-DPA1 and HLA-DPB1 in normal human liver. Genes Immun, 12(6): 428–433.

OGAWA, Y., CALHOUN, W.J., 2006. The role of leukotrienes in airway inflammation. J Allergy Clin Immunol, 118(4): 789–98.

OKHRAVI, N., ADAMSON, P., LIGHTMAN, S., 2000. Use of PCR in endophthalmitis. Ocul Immunol Inflamm, 8: 189.

OTT, J.J., STEVENS, G.A., GROEGER, J., WIERSMA, S.T., 2012. Global epidemiology of hepatitis B virüs infection: New estimates of age-spesific HBsAg seroprevalence and endemicity. Vaccine, 30: 2212-2219.

PARHAM, P., 1999. Pathways of antigen processing and presentation. Immunological reviews. Vol. 172. Copenhagen, Denmark: Munksgaard.

PARK, I.Y., SOHN, B.H., YU, E., SUH, D.J., CHUNG, Y.H., LEE, J.H., SURZYCKI, S.J., LEE, Y.I., 2007. Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein. Gastroenterology, 132: 1476-94.

PEI, R.J., CHEN, X.W., LU, M.J., 2014. Control of hepatitis B virus replication by interferons and Toll-like receptor signaling pathways. World J. Gastroenterol, 20(33): 11618–11629.

PETERSEN, J., DANDRI, M., GUPTA, S., ROGLER, C.E., 1998. Liver repopulation with xenogenic hepatocytes in B and T cell-deficient mice leads to chronic hepadnavirus infection and clonal growth of hepatocellular carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A, 95: 310-15.

PNG, E., THALAMUTHU, A., ONG, R.T., SNIPPE, H., BOLAND, G.J., SEIELSTAD, M., 2011. A genome-wide association study of hepatitis B vaccine response in an Indonesian population reveals multiple independent risk variants in the HLA region. Hum Mol Genet, 20: 3893-8.

POLLICINO, T., RAIMONDO, G., 2014. Occult hepatitis B infection. J. Hepatol, 61: 688– 689.

POSUWAN, N., PAYUNGPORN, S., TANGKIJVANICH, P., OGAWA, S., MURAKAMI, S., LIJIMA, S., MATSUURA, K., SHINKAI, N., WATANABE, T., POOVORAWAN, Y., TANAKA, Y., 2014. Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in thai population. PLoS One, 23;9(1): e86007.

RADOJA, S., FREY, A., VUKMANOVIC, S., 2006. T-cell receptor signaling events triggering granule exocytosis. Crit Rev Immunol, 26(3): 265-90.

RAMMENSEE, H.G., BACHMANN, J., STEVANOVIC, S., 1997. MHC ligands and peptide motifs. Springer, New York.

RAWLINGS, J.S., ROSLER, K.M., HARRISON, D.A., 2004. The JAK/STAT signaling pathway. J.Cell Sci, 117: 1281–1283.

REUTER, M., KUPPER, Y., SCHMITZ, A., BREUER, J.P., WEND, U., HENNIG, J., 2005. Detection of new single nucleotide polymorphisms by means of real time PCR. Journal of Genetics, 84(3): 341-345.

RIORDAN, S.M., SKINNER, N., KURTOVIC, J., LOCARNINI, S., VISVANATHAN, K., 2006. Reduced expression of toll-like receptor 2 on peripheral monocytes in patients with chronic hepatitis B. Clin. Vaccine Immunol, 13: 972–974.

ROBINSON, W.S., LUTWICK, L.I., 1976. The virus of hepatitis, type B (first of two parts). N. Engl. J. Med, 295:1168–1175.

RODNEY, G.E., 2000. Evolution and need for HLA polymorphism. G. E. Rodney (ed.), HLA Beyond Tears, De Novo Inc, Houston s. 37-43.

RUS, H., CUDRICI, C., NICULESCU, F., 2005. The role of the complement system in innate immunity. Immunol Res, 33(2): 103-12.

RYTER, A., 1985. Relationship between ultrastructure and specific functions of macrophages. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 8(2): 119-33.

SAITTA, C., TRIPODI, G., BARBERA, A., BERTUCCIO, A., SMEDILE, A., CIANCIO, A., RAFFA, G., SANGIOVANNI, A., NAVARRA, G., RAIMONDO, G., POLLICINO, T., 2015. Hepatitis B virüs (HBV) DNA integration in patients with occult HBV infection and hepatocellular carcinoma. Liver Int, 35(10):2311-7.

SALZET, M., TASIEMSKI, A., COOPER, E., 2006. Innate immunity in lophotrochozoans: the annelids. Curr Pharm Des, 12(24): 3043–50.

SCAGLIONI, P.P., MELEGARI, M., WANDS, J.R., 1997. Posttranscriptional regulation of hepatitis B virus replication by the precore protein. J. Virol, 71: 345-353.

SETO, W.K., WONG, D.K., KOPANISZEN, M., PROITSI, P., SHAM, P.C., HUNG, I.F., FUNG, J., LAI, C.L., YUEN, M.F., 2013. HLA-DP and IL28B polymorphisms: influence of host genome on hepatitis B surface antigen seroclearance in chronic hepatitis B. Clin Infect Dis, 56(12): 1695-703.

SIM, R., TSIFTSOGLOU, S., 2004. Proteases of the complement system. Biochem Soc Trans, 32(Pt 1): 21-7.

SOUSSAN, P., GARREAU, F., ZYLBERBERG, H., FERRAY, C., BRECHOT, C., KREMSDORF, D., 2000. In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. J Clin Invest, 105: 55-60.

SPROUL, T., CHENG, P., DYKSTRA, M., PIERCE, S., 2000. A role for MHC class II antigen processing in B cell development. Int Rev Immunol, 19(2–3): 139-55.

STEMLER, M., WEIMER, T., TU, Z.X., WAN, D.F., LEVRERO, M., JUNG, C., PAPE, G.R., WILL, H., 1990. Mapping of B-cell epitopes of the human hepatitis B virus X protein. J Virol, 64: 2802–09.

SUNG, J.J., TSOI, K.K., WONG, V.W., LI, K.C., CHAN, H.L., 2008. Meta-analysis: treatment of hepatitis B infection reduces risk of hepatocellular carcinoma. Aliment. Pharmacol. Ther, 28: 1067–1077.

TAKAHASHI, K., AOYAMA, K., OHNO, N., IWATA, K., AKAHANE, Y., BABA, K., YOSHIZAWA, H., MISHIRO, S., 1995. The precore/core promoter mutant (T1762A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and an easy method for detection. J. Gen. Virol, 76(Pt 12): 3159–3164.

TANG, H., OISHI, N., KANEKO, S., MURAKAMI, S., 2006. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. Cancer Sci, 97:977-983.

TANGKIJVANICH, P., CHITTMITTRAPRAP, S., POOVORAWAN, K., LIMOTHAI, U., KHLAIPHUENGSIN, A., CHUAYPEN, N., WISEDOPAS, N., POOVORAWAN, Y., 2015. A randomized clinical trial of peginterferon alpha-2b with or without entecavir in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: Role of host and viral factors associated with treatment response. J Viral Hepat, Sep 21.

TAROCCHI, M., POLVANI, S., MARRONCINI, G., GALLI, A., 2014. Molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis. World J. Gastroenterol, 20: 11630–11640.

TEMİZKAN, G., YILMAZER, S., ÖZTÜRK, M., ARI, Ġ., ERTAN, H., OLGUN, A., SARIKAYA, T.A. VE ARDA, N., 2004. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Temizkan, G. ve Arda, N. Nobel, İstanbul, s.57-67.

THE EASL JURY, 2003. EASL international consensus conference on hepatitis B:13-14 september, 2002 Geneva, Switzerland consensus statement (long version). J.Hepatol, 39: 3–25.

THIO, C.L., MOSBRUGER, T.L., KASLOW, R.A., KARP, C.L., STRATHDEE, S.A., VLAHOV, D., O'BRIEN, S.J., ASTEMBORSKI, J., THOMAS, D.L., 2004. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene and recovery from hepatitis B virus infection. J Virol, 78(20): 11258–11262.

THURSZ, M.R., KWIATKOWSKI, D., ALLSOPP, C.E., GREENWOOD, B.M., THOMAS, H.C., HILL, A.V., 1995. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. N Engl J Med, 332(16): 1065–1069.

VERMEHREN, J., LOTSCH, J., SUSSER, S., WICKER, S., BERGER, A., ZEUZEM, S., SARRAZIN, C., DOEHRING, A., 2012. A common HLA-DPA1 variant is associated with hepatitis B virus infection but fails to distinguish active from inactive Caucasian carriers. PLoS One, 7(3): e32605.

VITVITSKI-TRÉPO, L., KAY, A., PICHOUD, C., CHEVALLIER, P., DE, DINECHIN, S., SHAMOON, B.M., MANDART, E., TRÉPO, C., GALIBERT, F., 1990. Early and frequent detection of HBxAg and/or anti-HBx in hepatitis B virüs infection. Hepatology, 12: 1278–83.

WALSH, R., LOCARNINI, S., 2012. Hepatitis B precore protein: pathogenic potential and therapeutic promise. Yonsei Med. J, 53:875–885.

WANG, L., WU, X.P., ZHANG, W., ZHU, D.H., WANG, Y., LI, Y.P., TIAN, Y., LI, R.C., LI, Z., ZHU, X., LI, J.H., CAİ, J., LIU, L., MIAO, X.P., LIU, Y., LI, H., 2011. Evaluation of genetic susceptibility loci for chronic hepatitis B in Chinese: two independent case-control studies. PLoS One, 6(3): e17608.

WANG, S.H., YEH, S.H., LIN, W.H., WANG, H.Y., CHEN, D.S., CHEN, P.J., 2009. Identification of androgen response elements in the enhancer I of hepatitis B virus: a mechanism for sex disparity in chronic hepatitis B. Hepatology, 50(5): 1392-402.

WARNER, N., LOCARNINI, S., 2012. Replication of hepatitis B virus. (BOYER, T.D., MANNS, M.P., SANYAL, A.J. Eds.), Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease, 6 ed. Elsevier, Philadelphia.

WEI, C., NI, C., SONG, T., LIU, Y., YANG, X., ZHENG, Z., JIA, Y., YUAN, Y., GUAN, K., XU, Y., CHENG, X., ZHANG, Y., YANG, X., WANG, Y., WEN, C., WU, Q., SHI, W., ZHONG, H., 2010. The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein. J Immunol, 185: 1158-68.

WIRTH, S., GUIDOTTI, L.G., ANDO, K., SCHLICHT, H.J., CHISASRI, F.V., 1995. Breaking tolerance leads to autoantibody production but not autoimmune liver disease in HBV envelope transgenic mice. J Immunol, 154: 2504–15.

WONG, D.K., WATANABE, T., TANAKA, Y., SETO, W.K., LEE, C.K., FUNG, J., LIN, C.K., HUANG, F.Y., LAI, C.L., YUEN, M.F., 2013. Role of HLA-DP polymorphisms on chronicity and disease activity of hepatitis B infection in Southern Chinese. PLoS One, 8(6): e66920.

WONG, D.K., YUEN, M.F., YUAN, H., SUM, S.S., HUI, C.K., HALL, J., LAI, C.L., 2004. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. Hepatology, 40: 727-37.

WU, J., MENG, Z., JIANG, M., PEI, R., TRIPPLER, M., BROERING, R., BUCCHI, A., SOWA, J.P., DITTMER, U., YANG, D., ROGGENDORF, M., GERKEN, G., LU, M., SCHLAAK, J.F., 2009. Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. Hepatology, 49: 1132–1140.

XU, X., YUE, M., JIANG, L., DENG, X., ZHANG, Y., ZHANG, Y., ZHU, D., XIAO, W., ZHOU, Z., YAO, W., KONG, J., YU, X., WEI, J., 2014. Genetic variants in human leukocyte antigen-DP influence both hepatitis C virus persistence and hepatitis C virus F protein generation in the Chinese Han population. Int J Mol Sci, 15(6): 9826-43.

XU, Y., HU, Y., SHI, B., ZHANG, X., WANG, J., ZHANG, Z., SHEN, F., ZHANG, Q., SUN, S., YUAN, Z., 2009. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells. Mol Immunol, 46: 2640-6.

YAN, H., LIU, Y., SUI, J., LI, W., 2015. NTCP opens the door for hepatitis B virüs infection. Antiviral Res, 121: 24–30.

YAN, Z., TAN, S., DAN, Y., SUN, X., DENG, G., WANG, Y., 2012. Relationship between HLA-DP gene polymorphisms and clearance of chronic hepatitis B virus infections: case-control study and meta-analysis. Infect Genet Evol, 12(6): 1222-8.

YANG, B., BOUCHARD, M.J., 2012. The hepatitis B virus x protein elevates cytosolic calcium signals by modulating mitochondrial calcium uptake. J Virol, 86: 313-27.

YAO, J.L., 1996. Perinatal transmission of hepatitis B virus infection and vaccination in China. Gut, 38: S37–38.

YİLDİZ, S.M., CANDEVİR, A., KİBAR, F., KARABOGA, G., TURHAN, F.T., KİS, C., DİNCER, S., GUVENC, B., 2015. Hepatitis B, Hepatitis C, Human immunodeficiency virus and syphilis frequency among blood donors: A single center study. Transfus Apher Sci, 53(3): 308-14.

YU, Z., LI, Z., JOLICOEUR, N., ZHANG, L., FORTIN, Y., WANG, E., WU, M., SHEN, S.H., 2007. Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. Nucleic Acids Res, 35(13): 4535-41.

YUE, M., XU, K., WU, M.P., HAN, Y.P., HUANG, P., PENG, Z.H., WANG, J., SU, J., YU, R.B., LI, J., ZHANG, Y., 2015. Human Leukocyte Antigen Class II Alleles Are Associated with Hepatitis C Virus Natural Susceptibility in the Chinese Population. Int J Mol Sci, 16(8): 16792-805.

ZEN, K., PARKOS, C., 2003. Leukocyte-epithelial interactions. Curr Opin Cell Biol, 15(5): 557-64.

ZOULIM, F., 2005. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. J Hepatol, 42: 302-8.ALDEMİR, O. S. ve UÇAN, U. S., 2001. Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Temel Prensipler. Hayvancılık Araştırma Dergisi, 11 (1): 53-59.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Kayseri'de doğdu. İlköğrenimini 1990 yılında Sarıçam İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimini 1993 yılında Sunar Nuri Çomu Lisesi ortaokulunda ve lise öğrenimini 1996 yılında Sunar Nuri Çomu Lisesi'nde tamamladı. 1999 yılında kazandığı Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2003 yılında mezun oldu. 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında doktora çalışmasına başladı. 2006 yılından bu yana atandığı Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesinde Kimyager olarak çalışmaya devam etmektedir.