T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM
DALI

İNTERFERON GAMA İLİŞKİLİ PROTEİN-10 (IP-10) GENİNDEKİ PROMOTER BÖLGE POLİMORFİZMLERİNİN KRONİK HEPATİT B HASTALARINDA HEPATİT B YÜZEY ANTİJEN KAYBI ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Melek Tutku Kaçar Şahin
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Aslıhan CANDEVİR

ADANA-2024

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM
DALI

İNTERFERON GAMA İLİŞKİLİ PROTEİN-10 (IP-10) GENİNDEKİ PROMOTER BÖLGE POLİMORFİZMLERİNİN KRONİK HEPATİT B HASTALARINDA HEPATİT B YÜZEY ANTİJEN KAYBI ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Melek Tutku Kaçar Şahin
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Aslıhan CANDEVİR

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu Tarafından TTU-2023-15769 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2024

TEŞEKKÜR

Öncelikle biz kadınlara özgürce yaşama, eğitim ve çalışma hakkı veren, her zaman ilham kaynağım olan cumhuriyetimizin kurucusu, ulu önder Mustafa Kemal ATATÜRK ve silah arkadaşlarına yürekten teşekkür ederim.

Tez çalışmamın oluşmasında ve yürütülmesinde her türlü desteği gösteren ve deneyimlerini benimle paylaşan hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Aslıhan CANDEVİR'e, tüm eğitim sürecimde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Yeşim TAŞOVA'ya, Prof. Dr. Behice KURTARAN'a, Doç. Dr. Süheyla KÖMÜR'e, Doç. Dr. Ferit KUŞCU'ya, Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Seza İNAL'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin laboratuvar çalışmalarını özveriyle yürüten, tüm samimiyeti ile yol gösteren değerli hocam Doç. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER'e ve Biyoteknoloji Merkezi çalışanlarına teşekkür ederim.

2019 yılında başlayan COVİD-19 pandemisinde tüm dünyada olduğu gibi ülkemiz ve biz Enfeksiyon Hastalıkları hekimleri için zorlu bir süreç olmasına rağmen, bu zaman zarfında ve sonrasında dayanışma içinde olduğum, desteklerini esirgemeyen birlikte çalışmaktan onur duyduğum mesai arkadaşlarıma ve tüm Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan en büyük destekçilerim sevgili annem, babam ve kardeşime şükranlarımı sunarım. Son olarak tez sürecinin tüm aşamalarında desteğini sonuna kadar hissettiğim, takıldığım tüm konularda fikrini aldığım, sürekli beni teşvik eden sevgili eşim, hayat arkadaşım Dr. Remzi Emre ŞAHİN'e gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Melek Tutku KAÇAR ŞAHİN

Eylül, 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR I
İÇİNDEKİLER II
TABLOLAR LİSTESİ IV
ŞEKİLLER LİSTESİ V
KISALTMALAR LİSTESİ VI
ÖZET IX
ABSTRACT XI
1. GİRİŞ ve AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Hepatit B Enfeksiyonu 4
2.1.1. Epidemiyoloji 4
2.1.2. Viroloji 5
2.1.3. İmmünopatogenez 8
2.1.4. Prognoz ve Komplikasyonlar 13
2.1.5. Serolojik Belirteçler 17
2.1.6. HBsAg Kaybının Önemi 18
2.1.7. HBsAg Kaybı ile İlişkili Faktörler 19
2.2. IP-10 Molekülü 23
2.2.1. IP-10 Molekülünün Önemi 23
2.2.2. IP-10 Molekülünün Hepatit B Enfeksiyonundaki Rolü 24
2.2.3. IP-10 Molekülü Promoter Bölge Polimorfizmleri ve Hepatit B Enfeksiyonu İlişkisi 26
3. GEREÇ ve YÖNTEM 27
3.1. Çalışmanın Tasarımı 27
3.2. Materyal ve Metod 29
3.3. İstatistiksel Yöntem ve Analizler 32
4. BULGULAR 34
4.1. Hastaların Özellikleri 34
4.2. IP-10 Polimorfizmlerinin Görülme Sıklığı 43
4.2.1. c.-135C>T Polimorfizmi Genotip ve Allel Sıklığı 43
4.2.2. c.85C>T Polimorfizmi Genotip ve Allel Sıklığı 43

4.2.3. c.83T>G Polimorfizmi Genotip ve Allel Sıklığı 44
5. TARTIŞMA 45
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 55
7. KAYNAKLAR 57

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo No **Sayfa No**

Tablo-1. HBV markerleri ve karaciğer hastalığı belirteçlerine dayalı olarak kronik HBV enfeksiyonu olan hastaların doğal seyri ve değerlendirilmesi 14
Tablo 2. Vaka ve kontrol grubu demografik verileri 34
Tablo 3. Vaka ve kontrol gruplarında bulaş yolu ve komorbiditelerin dağılımı 37
Tablo 4. Vaka ve kontrol gruplarına göre laboratuvar bulguları dağılımı 38
Tablo 5. Roc Curve testi ile bazal laboratuvar değerlerinin HBsAg negatifleşmesini öngörmesi 39
Tablo 6. Vaka ve kontrol grubunda hepatosteatoz ve biyopsi bulguları 42
Tablo 7. Vaka ve kontrol gruplarına göre tedavi kullanımı 43
Tablo 8. Vaka ve kontrol grubunun allel ve genotip dağılımı 44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 1. Hepatit B virüs partiküllerinin yapısı 6
Şekil 2. Hepatit B virüsünün yaşam döngüsü 7
Şekil 3. Kronik hepatit B enfeksiyonunun doğal seyri 16
Şekil 4. IP-10 etki mekanizmaları ve HBV enfeksiyonunda klinik etkileri 25
Şekil 5. Çalışma katılımcılarının belirlenmesi 28
Şekil 6. IP-10 promoter, exon 1, intron 1, exon 2 bölgesini içeren yaklaşık 1000 bazlık gen bölgesinin PCR reaksiyonu ile çoğaltılması ardından agaroz jeldeki görüntüsü 31
Şekil 7. Sanger sekanslamanın Geneious Prime Trial versiyonu programındaki kromatogram görünümü 31
Şekil 8. Ek hastalıkların dağılımı 36
Şekil 9. Bazal laboratuvar değerlerinin HBsAg negatifleşmesini öngörebilmesinin Roc Curve testi ile incelenmesi 39
Şekil 10. Hepatosteatoz ve biyopsi bulgularının dağılımı 41

KISALTMALAR LİSTESİ

ALT : Alanin Aminotransferaz
Anti-HBc : Hepatit B Core (Kor) Antijen Antikoru
Anti-HBe : Hepatit B e Antijen Antikoru
Anti-HBs : Hepatit B Surface Antijen Antikoru
APOBEC3A : Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme, Catalytic Polypeptide-Like 3A
APOBEC3B : Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme, Catalytic Polypeptide-Like 3B
AS : Ankilozan Spondilit
AUC : Eğri Altında Kalan Alan
cccDNA : Kovalent Kapalı Dairesel Deoksiribonükleik Asit
CD : Cluster of Differantiation
CMIA : Chemiluminescent Microparticle Immunoassay
CTL : Sitotoksik T Lenfosit
CTLA-4 : Sitotoksik T Lenfosit Antijen-4
CXCR3 : Kemokin Reseptör 3
DM : Diabetes Mellitus
DNA : Deoksiribonükleik Asit
EASL : Avrupa Karaciğer Çalışmaları Derneği
ECL : Electro Chemiluminescent Immunoassay
ER : Endoplazmik Retikulum
gDNA : Genomik DNA
HAV : Hepatit A Virüs
HBcAg : Hepatit B Core (Kor) Antijen
HBeAg : Hepatit B e Antijen
HBsAg : Hepatit B Suface (Yüzey) Antijeni
HBV : Hepatit B Virüs
HCC : Hepatoselüler Karsinom
HCV : Hepatit C Virüs
HDV : Hepatit Delta Virüs

hg 19 : Human Genome 19

hg 38 : Human Genome 38

HIV : İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü

HT : Hipertansiyon

ICAM-1 : Hücreler Arası Adezyon Molekülü-1

IFN : İnterferon

IL : İnterlökin

IP-10/ CXCL-10 : İnterferon-γ İlişkili Protein-10

K2EDTA : Etilendiamintetraasetik Asit di Potasyum

KAH : Koroner Arter Hastalığı

kb : Kilo Baz

KLL : Kronik Lenfositik Lösemi

LPS : Lipopolisakkarit

MCP-1 : Monosit Kemoatraktan Protein-1

MDS : Myelodisplastik Sendrom

MG : Myastenia Gravis

MHC I : Major Histocompatibility Complex I

MHC II : Major Histocompatibility Complex II

MIP-1β : Makrofaj İnflamatuvar Protein-1 Beta

MS : Multiple Skleroz

NA : Nükleos(t)id Analogları

NK hücreleri : Natural Killer (Doğal Öldürücü) Hücreler

NKT hücreler : Natural Killer T Hücreler

nm : Nanometre

NTCP : Sodyum Taurokolat Ko-Transporting Polipeptid

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Peg-IFN : Pegile İnterferon

pgRNA : Pregenomik RNA

PRR : Pattern Tanıma Reseptörü

RA : Romatoid Artrit

RCC : Renal Hücreli Karsinom

rcDNA : Relaxed Circular DNA

RNA : Ribonükleik Asit
ROC : Receiver Operating Characteristic
S/CO : Sample/Cut-Off
SNP : Tek Nükleotid Polimorfizmi
SPSS : Statistical Package for The Social Sciences
SVP : Subviral Partikül
TAF : Tenofovir Alafenamid Fumarat
TDF : Tenofovir Disoproksil Fumarat
Th0 : T Helper 0 Hücreler
Th1 : T Helper 1 Hücreler
Th2 : T Helper 2 Hücreler
TNF-α : Tümör Nekroz Faktör Alfa
Treg : T Regülatuvar Hücreler
VHSD : Viral Hepatitle Savaşım Derneği
VKİ : Vücut Kitle İndeksi
WHO : Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

İnterferon Gama İlişkili Protein-10 (IP-10) Genindeki Promoter Bölge Polimorfizmlerinin Kronik Hepatit B Hastalarında Hepatit B Yüzey Antijen Kaybı Üzerine Etkisi

Giriş ve Amaç: Kronik hepatit B enfeksiyonu aşı ile önlenebilir bir hastalık olmasına rağmen günümüzde hala önemli bir karaciğer hastalığıyla ilişkili morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. Mevcut tedaviler ile ulaşılabilecek ideal sonlanım noktası hepatit B yüzey antijen (HBsAg) kaybıdır. HBsAg kaybının siroz, hepatosellüler karsinom (HCC) gibi komplikasyonları dolayısı ile karaciğer kaynaklı mortalite ihtimalini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. HBsAg kaybını etkileyen faktörler daha önceki hepatit B ile ilgili çalışmaların odak noktalarından biri olmuştur. Bu doğrultuda çalışmamızda HBsAg kaybı üzerine etkisi olabilecek önemli bir proinflamatuvar kemokin olan, IP-10 (CXCL10) molekülünün promoter bölge polimorfizmlerinin bakılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma 2005-2022 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji polikliniğine başvuran, 1950 kronik hepatit B hastası içinden retrospektif şekilde taranarak bulunan ve dahil edilme kriterlerine uyan HBsAg kaybı olmuş 60 hasta ile HBsAg pozitifliği devam eden 60 kontrol grubu hastası üzerinde yapılmıştır. Hastaların laboratuvar sonuçlarına hastane otomasyon sistemi üzerinden ulaşılmıştır. Daha sonrasında hastalar çağırılarak periferik kan örnekleri alınmış, IP-10 polimorfizmleri bakılması amacıyla deoksiribonükleik asit (DNA) izolasyonu yapılmış ve ilgili gen bölgesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemiyle çoğaltılmıştır. Sanger sekanslama yapılmıştır. Sekanslanan IP-10 (GRCh38/hg38'e göre chr4:76,022,698-76,023,698 arasında kalan bölge) promoter, exon 1, intron 1 ve exon 2'yi içeren bölgede; GWAS veritabanı ve literatür taranarak 3 varyant belirlenmiştir. Elde edilen sekans dataları (ab1) CLC Genomic Workbench 24 programında analiz edilmiştir.

Bulgular: IP-10 promoter ve exon 2 bölgelerinde c.-135C>T(rs56061981), c.85C>T(rs11548618), c.83T>G polimorfizmleri olduğu görüldü. Vaka ve kontrol grubu arasında bu 3 polimorfizmin genotip ve allel sıklıkları açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). 2005-2022 yılları arasındaki HBsAg kaybı oranı % 5,33 olarak bulundu. Başlangıçtaki yaş ortalaması HBsAg kaybı olan grupta 38,1±12,0 yıl, HBsAg pozitif devam eden grupta 34,9±14,5 yıldı fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,105$). Vaka grubunda HBsAg kaybı yaş ortalaması 53,2±11,3 yıl idi. Bazal ve maksimum HBsAg düzeyi, maksimum hepatit B virüs (HBV) DNA düzeyi, bazal hepatit B e antijen (HBeAg) serolojisi, antiviral tedavi kullanımı bu 2 grupta birbirinden farklıydı. Bazal ve maksimum HBsAg ($p<0,001$), maksimum HBV DNA ($p=0,002$) vaka grubunda daha düşük iken, bazal HBeAg negatiflik oranı ($p=0,015$), antiviral kullanmama oranı ($p<0,001$) vaka grubunda daha yüksekti. İnterferon (IFN) ve nükleozid/nükleotid analogları (NA) kullanımı ($p=0,042$), sadece NA kullanımı ($p<0,001$), IFN ve NA kullanım süresi ($p=0,011$), sadece NA kullanım süresi ($p=0,01$) kontrol grubunda anlamlı düzeyde daha yüksekti. Bazal HBsAg nin HBsAg kaybını

öngörebilecek cut-off değeri ≤1559 S/CO (% 77,2 AUC, % 58,33 duyarlılık, % 86,67 özgüllük, p<0,001) olarak belirlendi.

Sonuç: Çalışmamızdan elde edilen sonuçlarla c.-135C>T, c.85C>T, c.83T>C polimorfizmlerinin HBsAg kaybı üzerinde etkisi olmadığını söyleyebiliriz. Bazal ve takipteki maksimum HBsAg seviyesinin düşük olmasının, takipteki maksimum HBV DNA'nın düşük olmasının, bazal HBeAg seronegatifliğinin ve antiviral tedavi kullanmamanın HBsAg kaybını öngörebileceğini öne sürebiliriz.

Anahtar kelimeler: Kronik HBV enfeksiyonu, HBsAg kaybı, IP-10, CXCL10, Polimorfizm

ABSTRACT

Effect of Promoter Region Polymorphisms in the Interferon Gamma-İnducible Protein-10 (IP-10) Gene on Hepatitis B Surface Antigen Loss in Chronic Hepatitis B Patients

Introduction and Objective: Although chronic hepatitis B infection is a vaccine-preventable disease, it still remains an important cause of liver disease-related morbidity and mortality. The ideal endpoint that can be achieved with current treatments is the loss of hepatitis B surface antigen (HBsAg). It has been shown that the loss of HBsAg significantly reduces the possibility of liver-related mortality due to complications such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Factors affecting HBsAg loss have been one of the focal points of previous studies on hepatitis B. In this context, our study aimed to investigate the promoter region polymorphisms of the IP-10 (CXCL10) molecule, an important proinflammatory chemokine that may have an effect on HBsAg loss.

Materials and Methods: The study was conducted on 60 patients with HBsAg loss who were retrospectively screened among 1950 chronic hepatitis B patients who applied to the Infectious Diseases and Clinical Microbiology outpatient clinic of Çukurova University Hospital between 2005 and 2022 and who met the inclusion criteria and 60 control group patients who were HBsAg positive**.** The laboratory results of the patients were accessed through the hospital automation system. Afterwards, patients were called and peripheral blood samples were taken, deoxyribonucleic acid (DNA) was isolated to look for IP-10 polymorphisms and the relevant gene region was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) method. Sanger sequencing was performed. In the sequenced IP-10 (the region between chr4:76,022,698-76,023,698 according to GRCh38/hg38) promoter, exon 1, intron 1 and exon 2 region; 3 variants were identified by scanning the GWAS database and literature. The obtained sequence data (ab1) were analyzed in the CLC Genomic Workbench 24 program.

Results: It was observed that there were c.-135C>T(rs56061981), c.85C>T(rs11548618), c.83T>G polymorphisms in the IP-10 promoter and exon 2 regions. No significant difference was found between the case and control groups in terms of genotype and allele frequencies of these 3 polymorphisms ($p>0,05$). The HBsAg loss rate between 2005-2022 was found to be 5,33%. The mean age at the beginning was 38,1±12,0 years in the HBsAg loss group and 34,9±14,5 years in the HBsAg positive group, but this difference was not statistically significant ($p=0,105$). The mean age of HBsAg loss in the case group was 53,2±11,3 years. Basal and maximum HBsAg levels, maximum hepatitis B virus (HBV) DNA levels, baseline Hepatitis B e antigen (HBeAg) serology, and antiviral treatment use were different in these 2 groups. While basal and maximum HBsAg ($p<0,001$), and maximum HBV DNA ($p=0,002$) were lower in the case group, basal HBeAg negativity ($p=0,015$), and antiviral non-use ($p<0,001$) rates were higher in the case group. Interferon (IFN) and nucleoside/nucleotide analogs (NA) use ($p=0,042$), only NA use ($p<0,001$), duration of IFN and NA use ($p=0,011$), and only NA use ($p=0,01$) were significantly higher in the

control group. The cut-off value of baseline HBsAg to predict HBsAg loss was determined as ≤1559 S/CO (77,2% AUC, 58,33% sensitive, 86,67% specificity, p<0,001).

Conclusion: Based on the results obtained from our study, we can say that c.-135C>T, c.85C>T, c.83T>C polymorphisms have no effect on HBsAg loss. We can suggest that low baseline and follow-up maximum HBsAg levels, low follow-up maximum HBV DNA, baseline HBeAg seronegativity, and not using antiviral treatment may predict HBsAg loss.

Keywords: Chronic HBV infection, HBsAg loss, IP-10, CXCL10, Polymorphism

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonu aşı ile önlenebilir bir hastalık olmasına rağmen tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. 2022 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kronik HBV enfeksiyonu olan hasta sayısını 254 milyon, kronik HBV enfeksiyonuna bağlı komplikasyonlardan ölüm sayısını ise 1,1 milyon olarak bildirmiştir.[1] Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) pozitifliği prevalansı ülkeler arasında büyük farklılıklar gösterir ancak yaklaşık % 3,5 olduğu tahmin edilmektedir. Dünyadaki en yüksek prevalanslı bölge olduğu düşünülen Afrika'da ise bu oran % 4,7'dir.[2]

Akut HBV enfeksiyonunun seyri virüsün alındığı yaşa bağlı olarak değişir. Yenidoğanların kabaca % 95'inde, çocukların (1-5 yaş arası) % 20-30'unda ve yetişkinlerin % 5'inden azında kronik enfeksiyon gelişir. HBV aşısının uygulamaya girmesiyle birlikte, dünyanın birçok yerinde çocuklarda enfeksiyon prevalansında ciddi bir düşüş olmuştur. Genel olarak perinatal HBV enfeksiyonu geçiren erkeklerin % 40'ının ve kadınların % 15'inin siroz veya hepatoselüler karsinom (HCC) nedeniyle öleceği tahmin edilmektedir.[3]

HBsAg kaybı iyi prognozun göstergelerinden biri olduğu için kronik HBV enfeksiyonunun en önemli sonlanım noktalarından biridir. Ancak intrahepatik kovalent bağlı kapalı dairesel HBV DNA'nın (cccDNA) persistansı nedeniyle kronik enfeksiyonda HBsAg klirensi nadir bir olaydır. Yıllık spontan HBsAg klirens oranı yaklaşık % 0,5-1'dir. Mevcut antiviral tedaviler ile, Asya popülasyonunda yıllık HBsAg klirensi insidansının % 0,33 ile % 5 arasında değiştiği, spontan HBsAg klirensi insidansının ise % 0,5 ile % 2,66 arasında olduğu bulunmuştur. HBsAg konsantrasyonları 1000 IU/mL'nin altında olan inaktif fazdaki hastalarda spontan HBsAg klirensi görülme olasılığı daha yüksektir ve siroz, HCC gelişim riski daha düşüktür. Kronik HBV enfeksiyonunun doğal seyri beş faza ayrılabilir: hepatit B e antijeni (HBeAg) pozitif kronik enfeksiyon, HBeAg pozitif kronik hepatit, HBeAg negatif kronik enfeksiyon, HBeAg negatif kronik hepatit ve HBsAg negatif faz. HBeAg negatif kronik enfeksiyon fazındaki hastalar HBsAg'yi temizlemeye daha yatkındır.[3,4]

Son zamanlarda hepatit B enfeksiyonunun doğal seyrini inceleyen çalışmalar, spontan HBsAg klirensini öngören klinik parametreleri belirlemeye çalışmıştır. Bu

parametreler arasında; başlangıçtaki düşük serum HBsAg düzeyi, serum HBsAg seviyesinin düşme hızındaki artış ve kalıcı olarak saptanamayan viral yük yer alır. Bununla birlikte, bu serolojik ve virolojik parametreler kronik HBV'nin remisyonda kalacağını gösteren vekil belirteçlerdir; çünkü kronik HBV hastaları arasındaki bağışıklık kontrolündeki farklılıklar büyük olasılıkla insan genomik profillerindeki farklılıklarla ilişkilidir. Bu nedenle, HBsAg klirensinin konakçıdaki genetik belirleyicilerini tanımlamayı amaçlayan çalışmalara ihtiyaç vardır.[5] Genetik belirleyicilerle ilgili çalışmalar daha çok HBV'nin immünolojik kontrolünde rol alan sitokin ve kemokin ailelerine yönelmiştir.

HBV enfeksiyonuyla ilgili en kritik CXC ailesi kemokin ligand ve reseptör çiftleri CXCL9/10/11-CXCR3 ve CXCL13-CXCR5'tir. Serum CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13 seviyeleri, HBV enfeksiyonu olan hastalarda sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksektir. Akut hepatit B hastalarında ve HBV ile aşılanmış şempanzeler üzerinde yapılan bir çalışmada kemokinlerdeki artışın ardından HBsAg'nin azalması ile HBsAg kaybı meydana geldiği gösterilmiştir; bu durum da kemokinlerin akut HBV'nin çözümlenmesi ve kronik HBV'nin fonksiyonel küre ulaşması için önemli olabileceğini gösterir. Çok sayıda çalışma, interferon gama ilişkili protein-10 (IP-10) olarak da adlandırılan CXCL10'un HBV patogenezindeki rolünü tanımlamıştır. HBx'in, NF-κB aktivasyonu yoluyla doza bağlı bir şekilde CXCL10 ekspresyonunu arttırdığı, böylece periferik lökositlerin karaciğere göçünü arttırdığı gösterilmiştir. HBV transgenik fare modelinin kullanıldığı bir deneyde, CXCL9 ve CXCL10'un bloke edilmesinin, antijen spesifik olmayan lenfositlerin toplanmasını azalttığı ve aynı zamanda HBV' ye özgü sitotoksik T lenfositlerin etkilerini değiştirmeden karaciğer hastalıklarının şiddetini azalttığı gözlemlenmiştir. Öte yandan CXCL10'un hastalığın ilerlemesi ve tedaviye yanıtın bir göstergesi olduğu vurgulanmıştır.[6]

Günümüzdeki tedavilerin nihai hedefi HBsAg klirensini sağlamaktır. Nükloezid/nükleotid analogları (NA) ile tedavi çok düşük oranda HBsAg serokonversiyonu sağlar ve hemen hemen tüm vakalarda yaşam boyu tedavi gereklidir. Bu nedenle HbsAg klirensini sağlayan yeni yaklaşımlara ihtiyaç vardır. HBV' nin immün kontrolünü gösteren ve HBsAg kaybını öngören yeni biyobelirteçlerin bulunması, tedavi başarısının izlenmesine ve kişiselleştirilmesine olanak sağlayacaktır. Bu tür biyobelirteçlerin örnekleri arasında; viral biyobelirteçler ve alternatif olarak gen

polimorfizmleri veya konakçının immün cevapları yer alır. Hepatit B için ilginç bir konak biyobelirteci IP-10 (CXCL10) ve bunun gen polimorfizmleridir. Literatürde IP-10 molekülünün hepatit B patogenezindeki rolü çok sayıda çalışma ile açıklanmasına rağmen bu molekülün ekspresyonunu değiştirerek hastalık progresyonu üzerine etki edecek promoter bölge polimorfizmlerinin araştırıldığı çalışmalar çok nadirdir. Bu projede kronik HBV ile takipli hastalarda HBV'nin klinik sonuçları üzerinde önemli rolleri olan, HBsAg kaybı ile ilişkili olabilecek, IP-10 molekülünün promoter bölgesindeki polimorfizmlerin bakılması ve literatüre kazandırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatit B Enfeksiyonu

2.1.1. Epidemiyoloji

Hepatit B'ye karşı etkili aşılar ve tedavi stratejileri olmasına rağmen, HBV enfeksiyonu hala dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Tüm dünyada 360 milyonu kronik enfeksiyona sahip olmak üzere yaklaşık 2 milyar HBV ile enfekte insan bulunmaktadır. Her yıl hepatit B ilişkili karaciğer hastalığı ve HCC nedeniyle yaklaşık 600 bin ölüm gerçekleşmektedir.[7]

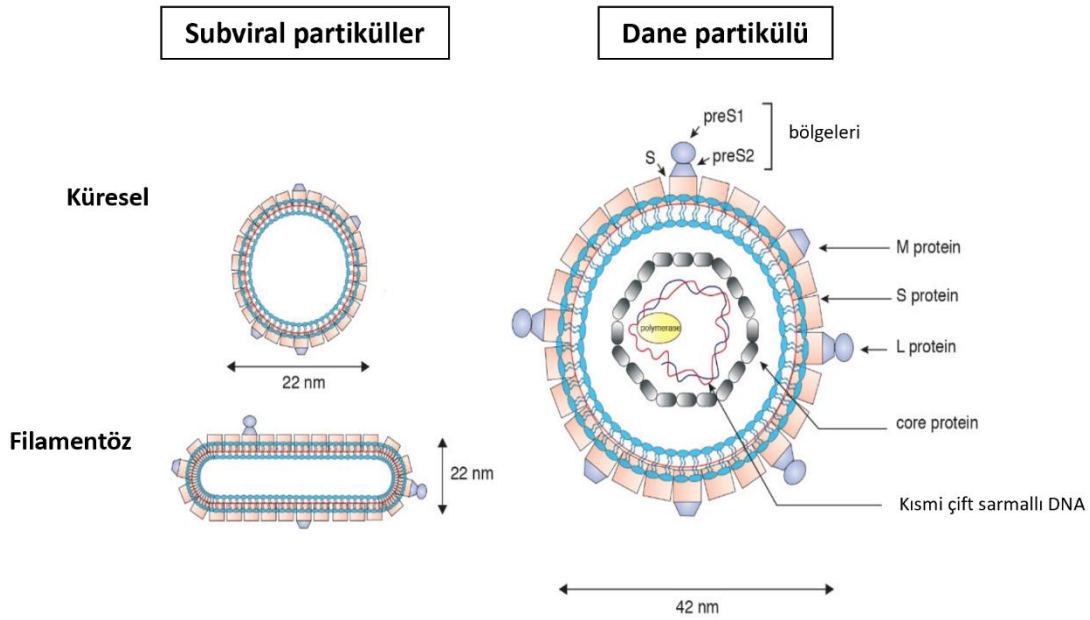
HBsAg pozitifliğine göre ülkeler yüksek endemisiteli (>% 8), orta endemisiteli (% 2-8) ve düşük endemisiteli (<% 2) ülkeler olarak gruplandırılmaktadır.[8] Orta Doğu bölgesindeki ülkeler orta endemisiteli gruba girmektedir. Yakın zamanda yapılan bir araştırma, Orta Doğu'daki kan donörlerinde HBV yaygınlık oranının % 1,62 olduğunu bildirmiştir. Bireysel olarak ülkelere bakıldığında bu oran İran'da % 0,58; Irak'da % 0,67; Suudi Arabistan'da % 3,02; Kıbrıs'ta % 3; Türkiye'de % 1,68; Yemen'de % 5,05; Kuveyt'te % 1,92; Ürdün'de % 1,72; Lübnan'da % 0,92 olarak bulunmuştur.[9]

WHO'ya göre Türkiye hepatit B için orta düzeyde (% 2-8) endemik bir ülkedir. Bu bilgi esas olarak kan bağışçıları üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. HBsAg pozitifliği genel prevalansının daha önce % 4 ila % 5 aralığında olduğu bildirilmiş olup, bu oran son yıllarda % 2'ye kadar düşmüştür. Ülkemizde tahmini hepatit B taşıyıcısı sayısı 3,3 milyondur ve genel hepatit B prevalansı % 4,57'dir.[10] Türkiye'deki çalışmalar batıdan doğuya doğru gidildikçe hepatit B prevalansının arttığını göstermiştir. Viral Hepatitle Savaşım Derneği (VHSD)'nin saha çalışmalarına göre; 2008-2011 yılları arasında HBsAg pozitifliği en yüksek % 4,1 oranı ile Güneydoğu Anadolu bölgesinde, en düşük %1,4 oranı ile Ege bölgesinde saptanmıştır. Aynı derneğin 2009-2011 yılları arasında yaptığı "Otobüs projesi"nde tüm coğrafi bölgeleri kapsayacak şekilde gönüllülerden 40000 üzerinde kan örneği toplanmış ve HBsAg pozitifliği % 6, anti-HBs pozitifliği ise % 16 olarak bulunmuştur. Bu çalışma verisindeki yüksek HBsAg pozitiflik oranının, çalışmaya başvuran kişilerin çoğunlukla bilinen kronik HBV enfeksiyonu olan hastalar olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.[11]

2.1.2. Viroloji

HBV Hepadnaviridae ailesinde bulunan, yaklaşık 3,2 kb (kilo baz)' lik dairesel ve kısmen çift sarmallı deoksiribonükleik asit (DNA) genomuna sahip küçük, zarflı bir virüstür. Yalnızca insanların ve primatların hepatositlerini enfekte eder. Kanda birkaç farklı biçimde bulunur. Enfeksiyöz form olan Dane partikülü, 42 nm (nanometre) çapındadır. Viral genom kısmen çift sarmallı dairesel bir DNA içerir. DNA'nın negatif iplikçiği tam uzunlukta iken pozitif iplikçik tüm genomun 2/3'ü uzunluğundadır. Negatif iplikçiğin 5' ucuna DNA polimeraz bağlıdır. Pozitif iplikçiğin 5' ucunda ise pozitif iplikçik sentezinde primer olarak kullanılan bir ribonükleik asit (RNA) oligomeri bulunur. Zarf büyük (L), orta (M), küçük (S) olarak adlandırılan üç zarf proteini içerir ve bunlar HBsAg' yi oluştururlar. Zarf proteinleri, hepatositlere bağlanma için gerekli alanları bulundurur. Kor protein, viral partiküllerin kapsidini oluşturur. Bu nükleokapsid yapısı hepatit B kor antijeni (HBcAg) olarak bilinir. Büyük miktarlarda salgılanan, bulaştırıcılığı olmayan subviral partiküller (SVP) olarak tanımlanan diğer iki form da mevcuttur ve bunlar yalnızca zarf proteinlerini içerir. [12,13]

Viral genom oldukça kompakttır ve olgun viryon içinde bulunan formu rcDNA (relaxed circular DNA) olarak adlandırılır. S, C, P ve X olarak adlandırılan dört geni içerir. S geni, HBsAg olarak bilinen viral zarf proteinini, C geni, kor proteinini ve prekor proteinini, P geni, ters transkripsiyon aktivitesine sahip viral DNA polimerazı kodlar. Zarf proteinlerini kodlayan S geninin C-terminal ucu, üç zarf proteini için ortaktır ve preS1, preS2 ve S alanlarını içerir. Prekor proteini endoplazmik retikulumda (ER) işlenerek HBeAg oluşur. X geni ise viral gen ekspresyonu ve replikasyonunun arttırılması da dahil olmak üzere birçok işlevi olan düzenleyici bir protein olan X proteinini kodlar. X proteininin karsinogenezi hızlandırabileceği düşünülmektedir.[13,14]

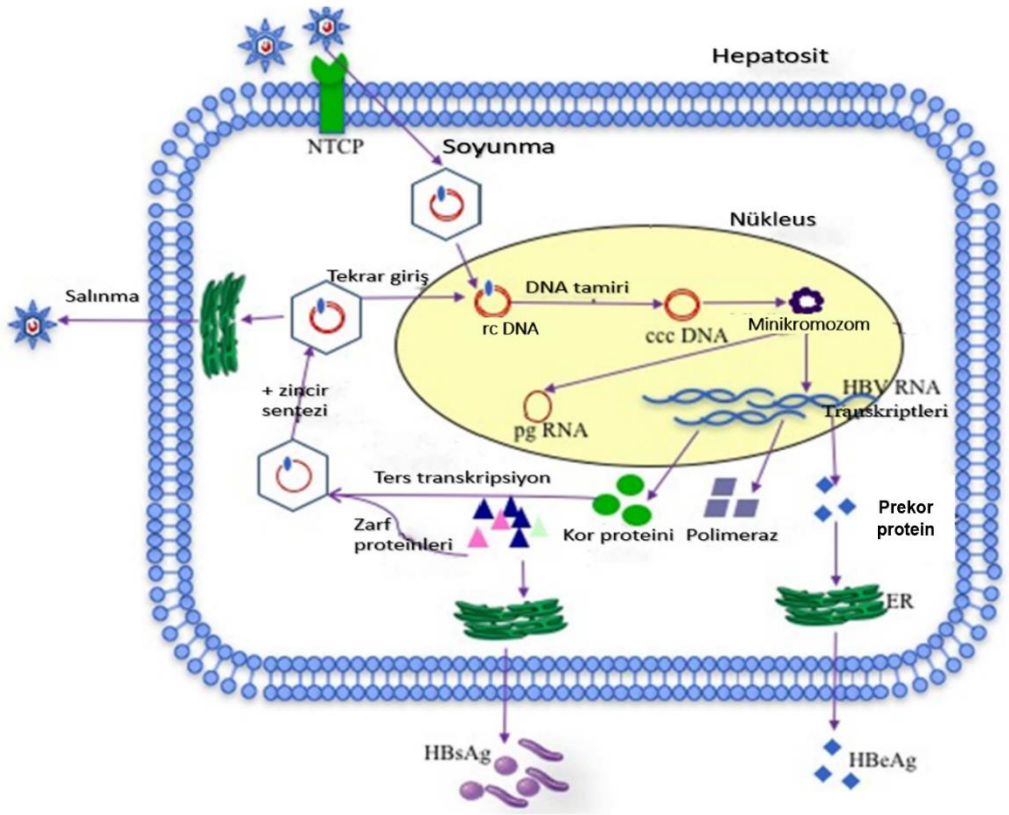


Şekil 1. Hepatit B virüs partiküllerinin yapısı[12]

Yaşam döngüsü:

HBV'nin yaşam döngüsü iyi karakterize edilmiştir ve 3 aşamada sınıflandırılabilir: erken, orta ve geç. Erken aşamalar, viral bağlanma, hepatosit içine giriş süreçleri ve ardından viral minikromozom oluşumu ve transkripsiyonu içerir. HBV başlangıçta karaciğerdeki Disse aralığında hepatositlerin yüzeyinde eksprese edilen heparan sülfat proteoglikanlarına bağlanır, ardından preS1 bağlanma bölgesi yoluyla sodyum taurokolat ko-transporting polipeptid (NTCP) reseptörüne yüksek özgüllükle bağlanır ve endozomal veziküllere alınır. Hepatosit içine girdikten sonra, yüzey proteinleri uzaklaştırılır ve nükleokapsid mikrotübüller aracılığıyla çekirdeğe taşınır. HBV, replikasyon stratejisi olarak bir pararetrovirüstür; DNA virüsüdür ancak bir RNA kullanarak ters transkripsiyon yoluyla çoğalır. Retrovirüslerden farklı olarak cccDNA molekülü olarak bulunan bir minikromozoma dönüştürülür. rcDNA, cccDNA' yı oluşturmak için önce tamamen çift sarmallı bir genom haline getirilir. cccDNA, HBV' nin hepatositte kalmasına izin veren ve böylece devam eden virüs üretimini sağlayan, tüm viral mRNA'ların kopyalandığı stabil bir viral DNA formudur. cccDNA, mRNA'nın transkripsiyonu için şablon görevi gören bir minikromozom oluşturmak üzere histonlara ve diğer kromatinize edici proteinlere bağlanır. cccDNA, HBV enfeksiyonunun kronisite , karsinogenez ve antiviral tedavinin göreceli etkisizliği gibi klinik durumlarını

belirleyen önemli bir özelliğidir. Viral genomdan daha uzun olan pregenomik RNA (pgRNA), subgenomik RNA gibi bilinen tüm Hepadnaviral RNA'lar şablon olarak cccDNA' yı kullanır ve hücresel RNA polimeraz II tarafından transkripte edilirler. pgRNA' nın 2 temel görevi vardır: kor protein ve ters transkriptaz enzimi için mRNA görevi görürken, bir yandan da yeni viral genom oluşumu için şablon görevi görür. Viral DNA replikasyonu sitozolde immatür nükleokapsidler içinde gerçekleşir. Viral yaşam döngüsünün geç olayları ise viral toplanma ve salınımı içerir. Sitozolde, rcDNA içeren, olgunlaşan yeni nükleokapsidler iki yoldan birini izler. Enfeksiyonun erken döneminde ve yeterli miktarda HBsAg birikinceye kadar, cccDNA havuzunu yenilemek için çekirdeğe geri gönderilir veya yeni viryonların oluşumu için üç zarf proteinini içeren hücre içi zarlara doğru hareket eder. Bu hücre içi zarlar, yeni viryonların oluşumu için zarflanma ve tomurcuklanma bölgeleri olarak işlev görür. Zarfla kaplanan viryonlar ER lümeninde biriktirilir ve salınır.[15,16,17]



Şekil 2. Hepatit B virüsünün yaşam döngüsü[15]

2.1.3. İmmünopatogenez

HBV ile ilişkili karaciğer hastalığının patogenezi, büyük ölçüde immün aracılı mekanizmalardan kaynaklanmaktadır. Ancak bazı durumlarda HBV doğrudan karaciğer hasarına neden olabilir. CD8+ T hücreler, sitolitik ve sitolitik olmayan mekanizmalar yoluyla HBV ile enfekte hepatositlerin parçalanmasına neden olur. HBV ile ilişkili karaciğer hasarının genellikle enfekte hepatositlerin sitotoksik T lenfosit (CTL) aracılı lizisi yani sitolitik yolla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, immün aracılı viral klirens, sitokinlerin salınması yoluyla yani sitolitik olmayan yollarla da meydana gelebilir. HBV genel olarak sitopatik bir virüs değildir. Kronik HBV' li hastaların çoğunda viral yük ile karaciğer hastalığının ciddiyeti arasında doğrudan bir ilişki yoktur. Bununla birlikte, doğrudan sitopatik etki, karaciğer nakli sonrası hepatit B'si tekrarlamış olan bazı hastalarda görülen fibrozing kolestatik hepatitte olduğu gibi viral yük çok yüksek olduğunda meydana gelebilir.[18]

HBV enfeksiyonunun prognozu virüsün özellikleri ve konağın immün sistemine dayanır. HBV replikasyonu tek başına kısa sürede karaciğer hücre hasarına neden olmaz, ancak konağın HBV' ye karşı antiviral immün yanıtı, virüsü ortadan kaldırırken karaciğer inflamasyonu ve hepatosit hasarına neden olabilir. Konağın immün yanıtı temel olarak 2 kısmı içerir: doğal (innate) ve edinsel (adaptif) immün yanıt. Doğal immün yanıt pattern tanıma reseptörü (PRR), doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri), doğal öldürücü T hücreler (NKT), monositler/makrofajlar tarafından indüklenir; adaptif immün yanıt ise CD4+ T lenfositleri, CD8+ T lenfositleri ve B lenfositleri içerir. HBV' ye özgü T lenfosit ve B lenfosit yanıtları, serbest virüs ve virüsle enfekte olmuş hepatositlerin klirensinde belirleyici faktörlerdir. Kronik HBV enfeksiyonu sürecinde virüs, çeşitli mekanizmalar yoluyla doğal ve adaptif immün sisteminin antiviral etkilerinden kaçar, konağın çeşitli bağışıklık hücrelerinin işlevini bozar ve bunları inhibe eder, böylece replikasyonunu sürekli gerçekleştirir.[19]

Akut hepatit B enfeksiyonu:

Hayvan modeli çalışmaları, viral DNA'nın akut hepatit semptomlarının başlangıcından veya bir T hücresi aracılı tepkinin indüklenmesinden önce zirve yaptığını ve ardından azaldığını göstermektedir. HBV DNA' daki bu düşüş, temel olarak doğal ve edinsel bağışıklık sistemi tarafından üretilen sitokinlerin antiviral

aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Özellikle, interferon-gama (IFN-γ), interferon-alfa (IFN-α), interferon-beta (IFN-β) ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α) enfekte olmuş hücreleri doğrudan yok etmeden viral replikasyonu inhibe edebilir. HBV enfeksiyonunun ilk kontrolünde NK hücrelerin rolü konusunda çelişkiler vardır. Şempanze modellerinde HBV, hastalığın erken evresinde doğal bağışıklığı indüklemiyor gibi görünmektedir. Bu nedenle bu virüs "gizli virüs" olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, akut HBV' nin dağ sıçanı modelleri, enfeksiyondan hemen sonra, NK hücrelerinin aktive edildiğini ve virüs yükünün önemli ölçüde azaldığını göstermiştir.[20] Bazı çalışmalarda NK ve NKT hücrelerinin, IFN-γ ve TNF-α salgılanması yoluyla akut HBV enfeksiyonunun erken viral kontrolünde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Sonraki *ex vivo* çalışmalar, IFN-γ ve TNF-α stimülasyonunun, APOBEC3A (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A) ve APOBEC3B (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B)' nin aktivasyonu yoluyla cccDNA' yı degrade edebileceğini göstermiştir. Ayrıca bu çalışmalar, doğal bağışıklık tepkisinin tek başına virüsü temizleyemese de akut HBV enfeksiyonu sırasında hızlı viral klirens için önemli olduğunu öne sürmüştür.[21]

Viral enfeksiyonların tamamen ortadan kaldırılması ve kontrolü, tek başına doğal bağışıklık tarafından gerçekleştirilemez. Bu nedenle, HBV ile başarılı bir şekilde başa çıkmak için belirli viral yapıları doğru bir şekilde tanıyabilen edinsel bağışıklığa ihtiyaç vardır. Antijen sunan hücreler, Kupffer hücreleri ve özellikle dentritik hücreler, yabancı antijeni CD4+ ve CD8+ T hücrelerine sunar, İnterlökin-12 (IL-12) ve TNF-α üretir. Bu sitokinler de IFN-γ üretimini ve CD8+ T hücrelerinin proliferasyonunu indükler. IL-12 ayrıca, CD4+ T hücrelerin tip 1 alt kümesine (Th1) farklılaşmasını indükler. Akut HBV enfeksiyonunda, HBV spesifik CD4+ T hücreleri, HBV DNA seviyelerinin yüksek olduğu zamanda (karaciğer hasarının zirvesinden önce) tespit edilebilir ve HBV enfeksiyonu çözüldükten sonra uzun süre varlığını sürdürür. CD4+ T hücre yanıtı zarf proteinleri ve polimeraz gibi HBV gen ürünlerine karşı da oluşur. Diğer HBV proteinlerine göre kor proteini CD4 + T hücreleri oluşumunu daha yaygın olarak uyarır.[22] Akut HBV'li hastalarda HBV' ye özgü CTL yanıtını araştıran birkaç çalışma vardır. Akut HBV'li hastalar HBV antijenlerine karşı kronik HBV'li hastalara kıyasla daha güçlü poliklonal T hücre tepkisi üretir. Kronik HBV'li hastalar ise yalnızca monoklonal, hatta saptanamayan bir T hücresi tepkisi geliştirir. CD4+ T hücre yanıtı,

HBV yüzey antijenine karşı nötralize edici antikorların (anti-HBs) gelişimini ve CTL yanıtlarının indüklenmesini sağlar. CD8+ T hücreleri, antiviral sitokinlerin (örneğin, IFN-γ) üretimine katkıda bulunur ve virüsle enfekte hepatositleri ortadan kaldırmak için sitotoksik aktivite gerçekleştirir. HBV ile enfekte hepatositlerin parçalanması perforin veya Fas sistemleri aracılığıyla gerçekleşir.[23,24] Hümoral yanıt, HBV' nin uzun süreli temizlenmesi ve HBV enfeksiyonundan korunma için kritiktir. Akut HBV enfeksiyonundan iyileşen hastalarda T helper tip 2 (Th2) hücreler, B hücresinden anti-HBs, anti-HBc ve anti-HBe antikor üretimini indükler. Anti-HBs, sonraki HBV enfeksiyonlarına karşı koruma sağlamada önemlidir ve aşılanmış bireylerde korumanın temelidir.[22]

Kronik Hepatit B Enfeksiyonu

Dendritik hücreler, NK hücreleri, HBV'ye özgü efektör T hücreleri, düzenleyici T hücreleri, B hücreleri, sitokinler, virüse özgü olmayan lenfositler gibi hem immün düzenleyici faktörler hem de immün hücreler virüs bileşenlerinin temizlenmesinde görev alırlar. Bununla birlikte, bağışıklık tepkileri son derece karmaşıktır ve kısmen anlaşılmıştır. Virüsü temizlerken, viral antijenik peptidler önce antijen sunan hücreler, özellikle dentritik hücreler tarafından işlenir. MHC I (Major histocompatibility complex I) veya MHC II (Major histocompatibility complex II) kompleksleri tarafından bağlanır. Bu bağlanma, dentritik hücrelerin olgunlaşmasına katkıda bulunur. Daha sonra, naif T hücreleri üzerindeki T hücresi antijen reseptörleri, viral antijenik peptit-MHC II/MHC I komplekslerini olgunlaşmış dentritik hücreler üzerinde yakalar ve T hücreleri üzerindeki CD (cluster of differantiation) 28, dentritik hücreler üzerindeki CD80/CD86 ile bağlanır. Bu süreç, klonal T hücrelerinin genişlemesini, farklılaşmasını indükler ve naif T hücrelerini fonksiyonel T hücrelerine çevirir. Buna karşılık, T hücreleri üzerindeki sitotoksik T lenfosit antijeni 4 (CTLA-4), inhibe edici bir faktör olarak hareket ederek, CD28/CD80/CD86 yolunu negatif olarak düzenler ve T hücresi aktivitesini inhibe eder. Son olarak fonksiyonel T hücreleri, B hücrelerini ve diğer bağışıklık hücrelerini aktive ederek CD40 ve hücreler arası adezyon molekülü 1'in (ICAM-1) yüksek ekspresyonuna neden olur ve inflamatuar sitokinlerin salgılanmasını indükler.[25]

Kronik HBV'li hastalarda periferik kanda, HBV'ye özgü T helper lenfositler ve sitotoksik T lenfositler, muhtemelen yüksek viral yükten kaynaklanan T hücre yanıtının

tükenmesi veya HBV' ye tolerans nedeniyle zorlukla saptanabilir. Buna karşılık, birkaç çalışma, kronik HBV'de intrahepatik CD4+ ve CD8+ T lenfositlerini karakterize etmiştir. Kronik HBV'li hastalarda intrahepatik CD4+T lenfositlerinin T helper 0 (Th0) hücreleri olarak bulunduğu gösterilmiştir. Bu hücreler sadece IFN-γ değil, aynı zamanda IL-4 ve IL-5 de üretirler. IL-17 üreten CD4+ T lenfositleri, kronik HBV 'li hastaların karaciğerini infiltre eder ve inflamasyonda rol alır.[26] Sonuç olarak doğal ve adaptif bağışıklık tepkileri, kronik HBV hastalarında karaciğer hasarını indükler.

HBsAg pozitif HCC'si olan hastaların çoğunda entegre HBV DNA' nın bulunması 1980' lerin başında HBV' nin onkojenik olabileceğini düşündürmüştür. HBV DNA'nın entegrasyonu hücresel protoonkogenleri aktive edebilir veya büyüme düzenleyici genleri baskılayabilir. HBV enfeksiyonunun onkojenik etkisine tamamen karaciğer hasarının indüklenmesinin aracılık etmesi de mümkündür. Kronik karaciğer hücresi hasarı, artan hücresel DNA sentezi ve bozulmuş hücresel onarım ile karakterize edilen bir olaylar dizisini başlatır ve böylece edinilmiş mutasyonlar için zemin hazırlar.[18]

Viral persistansın nedenleri

Bağışıklığı yeterli yetişkinlerde HBV enfeksiyonu genellikle kendi kendini sınırlayan, geçici bir karaciğer hastalığı ile sonuçlanır ve yetişkinlerin % 95'inden fazlasında virolojik kontrol sağlanır. Öte yandan, doğumda veya perinatal yaşta HBV' ye maruz kalan bireylerin % 90'ından fazlası kalıcı olarak enfekte olur. Kronikleşme oranlarındaki bu dramatik farkın, enfeksiyon anında konağın immünolojik durumunu yansıttığına inanılmaktadır. Örneğin, HBV taşıyıcı annelerden doğan yenidoğanlar, anne karnında maruz kaldıkları viral proteinlere karşı immünolojik olarak toleranslı olabilir. HBcAg/HBeAg' nin tolerojenik potansiyeli özellikle ilgi çekicidir çünkü bu antijenlerin immün aracılı viral temizleme mekanizmaları için önemli hedefler olduğuna dair kanıtlar vardır.[27] HBV enfeksiyonunun kronikleşmesinin mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır, ancak bu durumu etkileyen çok faktör vardır ve yetersiz immün yanıtla ilişkili olabilir. Deneysel çalışmalar, yalnızca enfeksiyon alınma yaşının değil, aynı zamanda inokulumun yolu ve boyutunun da viral yayılma kinetiğini etkilediğini, dolayısıyla immünolojik hazırlanmayı ve enfeksiyonun gidişatını etkileyebileceğini göstermiştir. Genel olarak, enfeksiyonun çözülmesi etkili viral tanınma, doğal ve adaptif bağışıklık tepkilerinin uyumlu indüksiyonunu gerektirir. Çalışmalar, kendi kendini

sınırlayan akut HBV enfeksiyonunda, HBV proteinlerine karşı CD8+ ve CD4+ T hücre yanıtlarının güçlü, poliklonal ve multispesifik, kronik HBV enfeksiyonunda ise immün yanıtın zayıf ve antijen spesifik olduğunu göstermiştir. Hepatit B virüsü alındıktan sonra virüs erken evrelerde hepatositlerde interferon yanıtını indüklemez. İnsan çalışmaları, tip I interferonların pre-semptomatik dönemde kanda saptanamadığını göstermiştir. HBV, enfekte hepatositlerin doğal bağışıklığı tarafından tanınmaktan kaçan bir "gizli virüs" gibi davranır. Bu durum viral replikasyondaki bazı özelliklere atfedilebilir: çekirdek içinde lokalize olmuş konakçı kromatin yapılarına benzer transkripsiyon şablonu kullanması, viral kapsidlerin koruması altında yeni viral progenler üretmesi ve insan hepatositlerinde DNA algılama yollarının olmaması veya etkisizleştirilmesi. Edinsel bağışıklığın, akut HBV enfeksiyonunun kontrolünde çok önemli olduğu kabul edilmektedir. İnsan ve şempanze çalışmaları, saptanabilir CD4+T hücre yanıtının, enfeksiyondan 4-7 hafta sonra, viral yayılımın başlangıcında ortaya çıktığını ve ardından CD8+ sitotoksik T lenfosit yanıtının ortaya çıktığını göstermiştir. HBV'ye özgü CD8+ T hücrelerinin tepkiselliğinin azalması, sitotoksisitesinin azalması, proliferasyon ve kronik enfeksiyon sırasında virüsün yok edilmesinden sorumlu olan TNF-α ve IL-2 dahil olmak üzere anti-viral sitokin üretiminin azalması ile sonuçlanır. HBV' ye özgü toleransı etkileyen diğer faktörler, CD4+ CD25+ FoxP3+ düzenleyici T hücrelerinin (Treg) immün düzenleyici etkilerindeki bozukluğu ve dendritik hücrelerin işlev bozukluğunu içerir. Treg' ler, efektör T hücrelerini baskılar. Kronik HBV enfeksiyonunun dendritik hücre fonksiyonu üzerindeki immünomodülatör etkisi tam olarak anlaşılmamış olsa da son çalışmalar, dendritik hücrelerin disfonksiyonunun antiviral immün yanıtın inhibisyonuna katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Anti-HBs antikorlarının hepatositlere yeni viryonların girişini bloke ettiği gösterilmiştir. Ancak HBsAg' ye özgü B hücrelerinin antikor üreten hücrelere dönüşümü bozulmuştur ve böylece kronik enfeksiyonu olan hastalarda tespit edilemeyecek miktarda anti-HBs üretilir. HBV genomunun kodladığı proteinler (HBsAg, HBcAg, X proteini gibi) de, HBV enfeksiyonunun kronikleşmesinde önemli bir rol oynarlar. Sonuç olarak konakçı ve viral faktörlerin her ikisi de HBV enfeksiyonuna karşı yeterli özgül bir immün yanıtın indüklenememesine sebebiyet verir.[28, 29,23,30]

HBV genomu, immün denetime rağmen devam eder ve gizli bir viral kalıcılık durumu oluşturur. cccDNA hepatositlerde stabil olarak kalır. cccDNA amplifikasyonu

virüs replikasyonundan bağımsızdır. Akut enfeksiyonun temizlenme fazında cccDNA'da azalma meydana gelir. Bu muhtemelen enfekte hepatositlerin öldürülmesi, HBV nükleokapsid oluşumunu engelleyen ve böylece cccDNA geri dönüşümünü engelleyen sitokinler sayesinde olur. Ayrıca, IFN- α, TNF- α ve IFN- γ'nin APOBEC3 deaminazlarını yukarı regüle ederek depürinasyon ve degradasyon için cccDNA'yı hedeflediği rapor edilmiştir. İntrahepatik cccDNA havuzunun, akut enfeksiyonun temizlenme fazı sırasında önemli ölçüde azaltılabilmesine rağmen, düşük seviyede bir cccDNA kalabilir. Kalan cccDNA'nın ömrü belirsizdir, ancak uzun olması beklenmektedir. Transkripsiyonel aktivite, konağın immünolojik ve muhtemelen epigenetik mekanizmaları tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. HBsAg temizlenebilmesine rağmen, HBV çoğalmaya devam edebilir. Küçük bir miktar HBV genomu, cccDNA ve entegre viral DNA, hepatositlerin çekirdeğinde kalabileceğinden, klinik iyileşme HBV enfeksiyonunun tamamen iyileştiğini göstermez. Teorik olarak, cccDNA eradike edildiğinde tam kür mümkündür; ancak bu durumda viral replikasyon potansiyeli imkansız hale gelebilir. Bununla birlikte hem cccDNA'nın hem de entegre DNA'nın her enfekte hepatositten tamamen yok edilip edilemeyeceği sorgulanmaya açıktır.[30]

2.1.4. Prognoz ve Komplikasyonlar

Yüksek endemik bölgelerde, perinatal ve horizontal bulaş en yaygın bulaş yollarıdır. Düşük prevalanslı bölgelerde ise HBV cinsel temas ve perkütan (esas olarak damar içi uyuşturucu kullanımı) yolla yayılır; bu durumda enfeksiyon kendini genellikle akut hepatit olarak gösterir. Semptomatik akut HBV'li bağışıklığı yeterli yetişkinlerin % 95'inden fazlası kendiliğinden iyileşir. Vertikal bulaş ile enfekte olanların % 80-90'ında kronik HBV enfeksiyonu gelişirken, 6 yaşından önce ve yetişkinlik döneminde enfekte olanların sırasıyla %30-50'si ve %5'inden azı kronikleşir. Akut HBV enfeksiyonunun çözülmesine anti-HBs serokonversiyonu ve viral klirens eşlik eder. Bununla birlikte, enfekte hepatositlerin çekirdeğinde cccDNA'nın kalması ile oluşan latent enfeksiyon vakaları vardır. Virüs reaktivasyonunun kronik taşıyıcıların yaklaşık % 20-30'unda meydana gelebileceği tahmin edilmektedir. Kronik enfeksiyon, konakçı ve viral faktörler arasındaki sinerjinin sonucunda oluşur ve viral klirens etkisiz olduğunda ortaya çıkar. Kronik HBV enfeksiyonu, serum HBsAg'nin en az 6 ay boyunca pozitif

olması olarak tanımlanır. 2017'de Avrupa Karaciğer Çalışmaları Derneği (EASL), kronik HBV enfeksiyonu evreleri için yeni bir terminoloji önermiştir. Bu evrelerin temelini, kronikleşmenin iki ana özelliği olan enfeksiyon veya hepatit oluşturur. Tablo 1'de bu evreler gösterilmiştir ve evreler birbirini takip etmek zorunda değildir.[31]

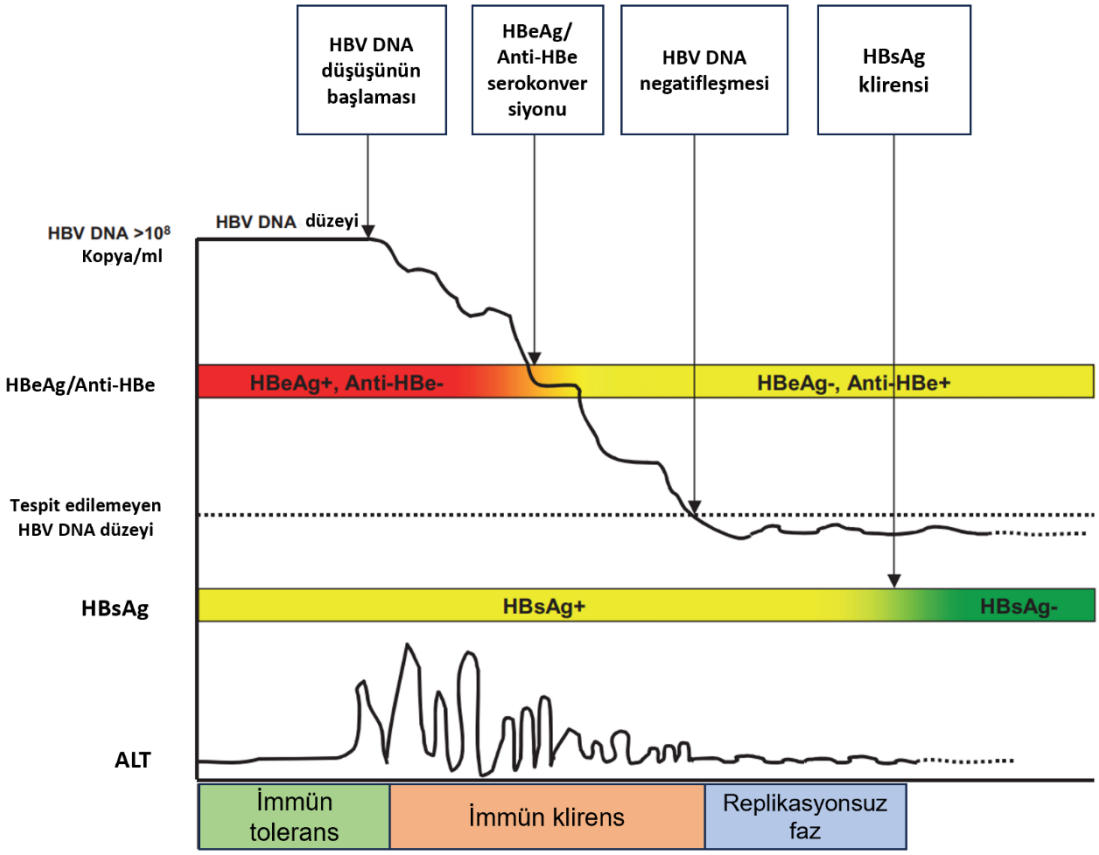
Tablo-1. HBV markerleri ve karaciğer hastalığı belirteçlerine dayalı olarak kronik HBV enfeksiyonu olan hastaların doğal seyri ve değerlendirilmesi. * Persistan veya intermitan **HBV DNA kronik hepatit belirtileri olmayan bazı hastalarda 2000 ila 20000 IU/ml arasında olabilir.[32]

	HBeAg pozitif		**HBeAg negatif**	
	Kronik enfeksiyon	**Kronik hepatit**	**Kronik enfeksiyon**	**Kronik hepatit**
HBsAg	Yüksek	Yüksek/Orta	Düşük	Orta
HBeAg	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
HBV DNA	$>10^7$ IU/ml	10^4-10^7 IU/ml	<2000 IU/ml**	>2000 IU/ml
ALT	Normal	Yüksek	Normal	Yüksek *
Karaciğer hastalığı	Yok/Minimal	Orta/Şiddetli	Yok	Orta/Şiddetli
Eski terminoloji	İmmün toleran	İmmün reaktif	İnaktif taşıyıcı	HBeAg negatif kronik hepatit

Bu aşamaların dışında bir aşama daha tanımlanmıştır; HBsAg-negatif faz, HBsAg negatif, antiHBs antikorları pozitif veya negatif ve antiHBc antikorlarının pozitif olması ile karakterize edilen aşamadır. Bu aşama aynı zamanda "okkült HBV enfeksiyonu" olarak da bilinir. Bu fazdaki hastaların ALT değerleri normaldir ve her zaman olmamakla birlikte genellikle serumda HBV DNA saptanamayacak düzeylerdedir. HBV DNA sıklıkla karaciğerde saptanabilir (cccDNA). HBsAg kaybı, siroz başlamadan önce gerçekleşmişse siroz, dekompansasyon, HCC riskinde düşme ve sağkalımda iyileşme ile ilişkilidir. Ancak, HBsAg kaybı siroz geliştikten sonra olmuşsa, hastalar HCC riski altındadır, bu nedenle HCC açısından takibe devam edilmelidir. İmmünsüpresyon bu hasta grubunda HBV reaktivasyonuna neden olabilir.[32]

REVEAL-HBV çalışmasının bulgularına göre, kronik HBV'nin doğal seyri, Şekil 3'te serum HBV DNA seviyesindeki uzun vadeli değişim temel alınarak gösterilmiştir. İmmün toleran fazda, tespit edilebilir HBsAg ve HBeAg, normal serum ALT seviyesiyle birlikte yüksek düzeyde HBV replikasyonu vardır (serum HBV DNA>10^8 kopya/mL). Bu faz, önemli bireysel farklılıklar olmakla birlikte onlarca yıl sürebilir ve karaciğer hasarıyla ilişkili olmadığı düşünülmektedir. İmmün toleran faz perinatal ve erken çocukluk HBV enfeksiyonunda sıklıkla görülür. Erişkin HBV enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu kendiliğinden iyileşir ve enfeksiyonu temizleyemeyen az sayıda hasta (%5

civarı) immün toleran fazı yaşamadan doğrudan immün klirens aşamasına geçer. İmmün klirens fazı, konak bağışıklık sistemi HBV ile enfekte hepatositleri temizlemeye çalıştığında başlar; bu durum, hepatik inflamasyon ve serum ALT düzeyinin yükselmesiyle sonuçlanır. HBV DNA düzeylerindeki düşüşle birlikte HBeAg serokonversiyonu gelişir. HBeAg seroklirensinden sonra, serum HBV DNA düzeyleri, immün klirens fazı sona erdiğinde tespit edilemez hale gelene kadar düşmeye devam eder. Bu aşama, HBeAg seroklirensine göre "HBeAg-seropozitif" ve "HBeAg-seronegatif" kronik HBV enfeksiyonu olarak da sınıflandırılabilir. Serum ALT düzeyleri, HBeAg-seropozitif aşamada, HBeAg-seronegatif aşamadan çok daha yüksektir. İmmün klirens evresinin süresi oldukça değişkendir. Tekrarlayan akut karaciğer inflamasyonu ataklarıyla uzayan evre, tekrarlayan yaralanma, rejenerasyon/fibrozis döngülerine ve sonuçta siroz, HCC riskinin artmasına neden olabilir. HBV DNA'nın seroklirensinden sonra, kronik HBV taşıyıcılarının bir kısmı HBV replikasyonunu inaktive ederek "inaktif HBV taşıyıcısı" olarak adlandırılan bir faza ulaşır. Bu durum HBsAg pozitifliği, HBeAg negatifliği ve/veya anti-HBe pozitifliği ve normal ALT seviyesi ile karakterizedir. Bu fazda bazı bireylerde HBsAg'nin spontan seroklirensi meydana gelirken, bazı bireylerde HBV replikasyonu reaktive olabilir ve immün klirens fazına geri dönebilirler. İnaktif taşıyıcı durumundaki HBsAg pozitif hastalar, immün klirens fazı sırasında meydana gelen olaylara ve önceden var olan karaciğer fibrozisine bağlı olarak son evre karaciğer hastalıklarına ilerleyebilir. Ancak, HBsAg seroklirensi olan bireylerde siroz ve HCC riski düşüktür.[33]



Şekil 3. Kronik hepatit B enfeksiyonunun doğal seyri[33]

Kronik HBV ile enfekte kişilerin bir kısmı, son dönem karaciğer hastalığı ve HCC dahil olmak üzere karaciğerle ilişkili bir komplikasyona ilerleyerek dünya çapında karaciğer hastalıklarına bağlı ölümlerin yarısından fazlasına neden olmaktadır. Sirotik hastalarda 5 yıllık hepatik dekompansasyon olasılığı % 15-20, yıllık HCC gelişme insidansı % 3-6'dır. Kompanse sirozu olan hastalarda tahmini 5 yıllık sağkalım oranı % 80-85 iken dekompanse sirozu olan hastalarda % 30-50'dir.[34] Erkek cinsiyet, ileri yaş, genetik duyarlılık, HBV replikasyon düzeyi, başvuru anında fibrozis evresinin şiddeti, hepatit D virüsü (HDV) veya hepatit C virüsü (HCV) ile ko-enfeksiyonlar, alkol kullanımı, diabetes mellitus ve kronik karaciğer hastalığının diğer nadir nedenlerinin tümü, kronik HBV hastalarında karaciğer hastalığının ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) ile ko-enfekte olmak da karaciğer hastalığının ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir, ancak hem HIV hem de HBV enfeksiyonları için etkili antiviral tedavi çağında yapılan son çalışmalar, karaciğer sonuçlarının öncekinden daha iyi olduğunu göstermiştir. Altta yatan karaciğer hastalığının ciddiyetine bakılmaksızın,

HBV enfeksiyonu olan kişilerde HCC riski, muhtemelen HBV enfeksiyonunun daha erken edinilmesi, daha uzun hastalık süresi ve/veya çevresel faktörlere maruz kalma nedeniyle Doğu Asya ülkelerinde Batı ülkelerine göre daha yüksektir.[35,36]

2.1.5. Serolojik Belirteçler

HBV enfeksiyonu için serolojik belirteçler, HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe ve anti-HBc IgM ve IgG'den oluşur. Serolojik belirteçlerin tanımlanması şunları sağlar: HBV enfeksiyonu olan hastaları belirlemek, kronik HBV'nin doğal seyrini aydınlatmak, enfeksiyonun klinik evrelerini değerlendirmek ve antiviral tedaviyi izlemek. HBsAg, HBV enfeksiyonunun serolojik ayırıcı özelliğidir. HBV'ye akut maruziyetten sonra, serumda 1 ila 10 hafta içinde ortaya çıkar. Bu belirteçte 6 aydan fazla pozitiflik olması, kronik HBV enfeksiyonunu gösterir. Birkaç çalışma, cccDNA'nın karaciğerdeki transkripsiyon aktivitesi ile serum HBsAg seviyeleri arasındaki ilişkiyi göstermiştir. Anti-HBs, nötralize edici bir antikor olarak bilinir ve uzun süreli bağışıklık sağlar. Aşılama yoluyla bağışıklığı olan hastalarda anti-HBs, serumda saptanan tek serolojik belirteçtir. Geçirilmiş HBV enfeksiyonunda, anti-HBc IgG ile birlikte bulunur. Nadiren, HBsAg pozitif hastalarda HBsAg ve anti-HBs' nin aynı anda ortaya çıktığı bildirilmiştir. Geçmişte pencere dönemini belirlemede kullanılan akut HBV enfeksiyonunun bir diğer immünolojik belirteci, kronik hepatit alevlenmeleri sırasında da saptanan anti-HBc IgM'dir. Anti-HBc IgM, HBsAg'den kısa bir süre sonra ortaya çıkar ve 6-24 ay serumda saptanır. Daha sonra, HBV enfeksiyonunun düzelmesi sırasında yerini anti-HBc IgG'ye bırakır. Anti-HBc IgG, iyileşmiş HBV enfeksiyonu ve kronik HBV' si olan her iki hasta grubunda da saptanmaya devam eder. Bazı HBsAg negatif kişilerde anti-HBs olmadan anti-HBc pozitiftir, bu durum izole anti-HBc pozitifliği olarak kabul edilir. Üç durumda görülebilir. Birincisi; akut enfeksiyonun pencere döneminde ağırlıklı olarak IgM sınıfı olarak, ikincisi; akut enfeksiyon sona erdikten sonra, anti-HBs'ler saptanabilir seviyenin altına düşmüşse, üçüncüsü; birkaç yıllık kronik HBV enfeksiyonundan sonra, HBsAg saptanamayan seviyelere düşmüşse görülebilir. Birkaç çalışma, HBsAg negatif/anti-HBc pozitif numunelerin % 0,5-1'inin düşük HBV DNA seviyeleri içerdiğini göstermiştir. Aktif viral replikasyon ile ilişkili HBeAg varlığı, hastalığın bulaşıcılığının göstergesidir. HBeAg ve anti-HBe genellikle kronik HBV enfeksiyonun evresini belirlemek için kullanılır. Anti-HBe'nin ortaya

çıkması viral replikasyonun düşük seviyesini gösterir ve enfeksiyonun çözülmesi için güçlü bir kanıttır. HBeAg'nin anti-HBe'ye serokonversiyonu, hepatik hastalığın remisyonu ile ilişkilidir. Ancak anti-HBe serokonversiyonu olan bazı hastalarda prekor ve kor proteininin HBeAg üretimini inhibe eden veya azaltan bölgesindeki mutasyonlar nedeniyle aktif viral replikasyon sürdürülür ve HBeAg üretimi devam eder.[37,38,39]

2.1.6. HBsAg Kaybının Önemi

Kronik HBV enfeksiyonu ciddi bir halk sağlığı sorunudur, siroz ve HCC'nin önde gelen nedenlerinden biridir. Geçtiğimiz on yılda antiviral tedavilerin gelişmesiyle birlikte, kronik HBV'ye yönelik tedavi hedefi, viral baskılanmanın ve HBeAg serokonversiyonu/klirensinin ötesine geçmiştir. HBV kılavuzları, anti-HBs serokonversiyonu ile birlikte olsun veya olmasın HBsAg klirensini antiviral tedavi için ideal sonlanım noktası olarak belirlemiştir. [40]

HBsAg klirensi, HBV replikasyonunun ve cccDNA transkripsiyonunun belirgin bir şekilde baskılandığının bir göstergesidir. Tespit edilebilir virüsün olmadığı ve karaciğer fonksiyonunun normal olduğu HBsAg klirensinin sağlandığı durumda, hastanın, akut HBV enfeksiyonunu başarıyla çözen kişilere benzer şekilde "fonksiyonel kür" sağladığı kabul edilir. Fonksiyonel kür, mevcut kronik HBV tedavisinin hedefidir ve nadiren elde edilir. Yıllık olarak tedavi edilmeyen hastaların yalnızca % 1-2'sinde meydana gelir. Ancak bu nadir olay doğrusal bir oranda gerçekleşmemektedir. Tayvan' da kronik HBV'li 1076 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada, spontan HBsAg kaybının kümülatif olasılığının, 10 yıl sonra % 8,1 iken 25 yıl sonra % 44,7'ye yükseldiği gösterilmiştir. HBsAg klirensi, HBsAg klirensinin eşlik etmediği HBV DNA baskılanmasına göre ek faydalar sağlar. Siroz, HCC gelişim riskinde önemli bir azalma ve hayatta kalma oranlarında artış ile ilişkilidir. Aynı zamanda çok düşük seroreversiyon ve viral nüksetme olasılığı ile NA'ların kesilmesine de olanak tanır.[41,42,43,44]

Fonksiyonel kür kavramının dışında "parsiyel kür" ve "sterilize edici kür" kavramları da mevcuttur. Parsiyel kürde HBsAg pozitif, HBeAg negatif, HBV DNA saptanamayan veya düşük düzeydedir ve karaciğer histolojisi inaktiftir. NA alan çoğu hastada ulaşılabilen daha gerçekçi bir hedeftir ve 10 yıla kadar NA ile tedavi edilen HBeAg negatif hastaların % 83'ünde gerçekleştiği rapor edilmiştir. Sterilize edici kür, şu anda mevcut olan tedaviyle elde edilebileceklerin ötesindedir. Klinik senaryo, hiç

HBV ile enfekte olmamış bir kişiyle benzerdir: HBsAg negatif, anti-HBs pozitif veya negatif, HBeAg negatif, saptanamayan serum HBV DNA, saptanamayan cccDNA, saptanamayan entegre HBV DNA ve ilerleyici karaciğer hastalığına dair histolojik kanıtın olmadığı durumdur. Akut HBV enfeksiyonu iyileşmiş, bağışıklık sistemi normal yetişkin hastalar bile bu duruma ulaşamazlar. Bu katı sonlanım noktasına ulaşmak için, gelecekte cccDNA'yı ve entegre HBV DNA'yı kesip çıkarabilecek yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır.[45]

Kronik HBV'li hastalarda spontan HBsAg kaybının patofizyolojik mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da bu süreçte T hücresi aracılı bir immün yanıtın rol oynayabileceğine dair bazı kanıtlar vardır. Rehermann ve ark. HBsAg' yi kendiliğinden veya IFN-α tedavisinden sonra temizleyen kronik HBV hastalarının, akut enfeksiyondan sonra HBsAg'yi temizleyenlere benzer güçlü, multispesifik sitotoksik T lenfosit yanıtına sahip olduğunu göstermiştir.[46]

2.1.7. HBsAg Kaybı ile İlişkili Faktörler

En az 6 ay arayla iki kez serum HBsAg negatifliği olarak tanımlanan [47] HBsAg kaybı kendiliğinden olabilir veya antiviral tedaviyle tetiklenebilir.[48] Çeşitli konakçı faktörleri ve viral faktörlerden etkilenen nadir bir olay olduğundan, doğru bir insidans oranının ve prediktörlerinin belirlenmesi zor olmuştur. Spontan HBsAg kaybının prediktörleri, konakçı ve viral faktörler olarak sınıflandırılır.[49] Önceki çalışmalar cinsiyet, yaş, ALT düzeyi, yağlı karaciğer, siroz gibi konakçı faktörleri ve HBeAg serolojisi, HBV DNA düzeyi, serum HBsAg düzeyi, genotip, HCV süperenfeksiyonu gibi viral faktörlerden etkilendiğini göstermiştir.

Konakçı faktörleri

Cinsiyet

Önceki çalışmalarda erkeklerde spontan HBsAg klirensi olasılığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Liu ve arkadaşları, Liaw ve arkadaşları erkeklerde spontan HBsAg klirensi olasılığının önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Ferreira ve ark. yaptığı çalışmada ise, kronik HBV enfeksiyonu olan erkeklerin spontan HBsAg klirensi olasılığının kadınlardan daha fazla olduğu, ancak aradaki farkın istatistiksel

olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Cinsiyetler arasındaki bu farklılığa yol açan genetik veya hormonal faktörlerin rolü hala anlaşılamamıştır.[50]

Yaş

HBsAg klirensi için en önemli faktörlerden biri, birçok çalışmada gösterildiği gibi, hastaların kayıt sırasındaki yaşının ileri olmasıdır. Örneğin, Chu ve ark. 1965 inaktif taşıyıcı üzerinde yaptıkları çalışmalarında, HBsAg klirensi yıllık insidansının 30 yaş altı bireylerde % 0,77 olduğunu ve 30-39 yaş arası, 40-49 yaş arası, 50 yaş üstü bireylerde sırasıyla bu oranın % 1,07, % 1,65, % 1,83' e yükseldiğini göstermişlerdir. Muhtemelen HBsAg klirens ihtimali, hastaların yaşının da yansıttığı gibi enfeksiyon süresiyle birlikte artar. Bu özellikle HBV enfeksiyonunun ağırlıklı olarak perinatal dönemde veya erken çocukluk döneminde alındığı ülkeler için geçerlidir; çünkü bu ülkelerde hastanın yaşı neredeyse enfeksiyonun süresine eşittir.[47]

ALT düzeyi

Anti-HBe pozitif olan ve tanı sırasında normal ALT seviyeleri sergileyen HBsAg taşıyıcılarının, anormal ALT seviyelerine sahip olanlara göre HBsAg'yi temizleme ihtimalleri daha yüksektir. Benzer şekilde, sürekli biyokimyasal remisyona sahip inaktif taşıyıcıların serum HBsAg klirens olasılığı, hepatit B reaktivasyonu olanlara göre daha yüksektir.[47]

Yağlı karaciğer ve vücut kitle indeksi

Birçok HBsAg taşıyıcısının, hepatoselüler karsinom taraması sırasında hepatosteatozun ultrason bulgularına sahip olduğu bulunmuştur. Aşırı kilo veya obezite ile ilişkili hepatosteatoz genellikle makroveziküler tiptedir; hepatositler genişler ve sitoplazma, çekirdeği eksantrik konuma getiren bir veya daha fazla büyük yağ damlacığı ile doludur. İmmünohistokimyasal çalışmalarda ortaya çıkan ilginç bir konu, karaciğerde HBsAg' nin sitoplazmik dağılımını etkileyebilecek önemli miktarda yağ infiltrasyonunun, kronik HBV enfeksiyonunda HBsAg klirensine katkıda bulunup bulunmayacağıdır. Chu ve arkadaşları HBsAg klirensi olanlarda, HBsAg pozitifliği devam edenlere göre anlamlı derecede daha yüksek VKİ (Vücut kitle indeksi) ve ultrasonik hepatosteatoz derecesine sahip olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Bu çalışmaya

göre hafif hepatosteatozlu HBsAg taşıyıcılarında HBsAg klirens olasılığı artmamıştır. Ancak orta ve şiddetli hepatosteatoz, hepatosteatoz kanıtı olmayanlarla karşılaştırıldığında üç ila dört kat daha fazla HBsAg klirensi ile ilişkili bulunmuştur. Hepatosteatozu olan hastalarda HBsAg klirensinin, steatoza bağlı apoptoza ve inflamasyona bağlı olabileceği düşünülmüştür. Özellikle Fas reseptörünün, non-alkolik steatohepatitli hastaların hepatositlerinde güçlü bir şekilde eksprese edilmesi sonucunda, bu hücrelerin apoptoza duyarlılığının artmasına yol açması ve dolayısıyla virüsün temizlenmesini kolaylaştırmasının muhtemel neden olduğu düşünülmektedir.[51]

Siroz

Sa'nchez-Tapias ve ark. çalışmasında HBsAg' nin temizlenmesi başlangıçta sirozu olan hastalarda daha sık bulunmuştur. [52] Ayrıca takip sırasında gelişen sirozun da HBsAg klirensi ile anlamlı derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir. Altta yatan mekanizma belirsizliğini korumaktadır. Ancak siroz varlığında artan seroklirens, sirotik hastalarda gelişebilecek bir durum olan, karaciğerde bulunan HBV genomlarının azalması veya kısmi ekspresyonunundan kaynaklanıyor olabilir. Karaciğer rejenerasyonunun bir sonucu olarak karaciğer hücre dönüşümünün artmasının HBsAg seroklirensini artırıp artırmayacağı daha fazla araştırılması gereken bir konudur.[47]

Viral faktörler

HBeAg serolojisi ve HBV DNA düzeyi

Önceki çalışmalarda başlangıçta antiHBe pozitif olan hastalarda HBsAg temizlenme oranı daha yüksek bulunmuştur.[53] HBeAg pozitif hastalarda, HBeAg serokonversiyonu sonrasında HBV DNA'daki hızlı azalmanın, HBsAg kaybının en iyi öngörücüsü olduğu rapor edilmiştir.[54] HBeAg negatif veya HBV DNA negatif olan HBsAg taşıyıcılarının kronik HBV enfeksiyonunun inaktif fazında olma olasılıkları daha yüksektir ve dolayısıyla HBsAg'yi serumdan temizleme olasılıkları da daha yüksektir. Daha az aktif HBV replikasyonu olan hastaların hastalıkta remisyona ve dolayısıyla HBsAg seroklirensine sahip olma olasılığının daha yüksek olduğu düşünülebilir.[47]

HBsAg düzeyi

HBsAg spontan klirensi ile ilgili Zhou ve ark., Yeo ve ark. yaptığı 2 büyük meta-analiz başlangıçta HBeAg negatif olan ve kantitatif HBsAg'si daha düşük olan hastalarda daha yüksek HBsAg temizlenme oranları olduğunu bulmuştur. Başlangıçtaki düşük serum HBsAg düzeylerinin, özellikle HBsAg düzeyleri 100 IU/mL' nin altında olduğunda HBsAg klirensini öngörebileceği bildirilmiştir.[40]

Genotip

Sa'nchez -Tapias ve ark. çalışmasında genotip A, genotip D ve F' ye göre HBsAg kaybı ile daha ilişkili bulunmuştur.[52] Çok merkezli bir kohort çalışmasında genotip C genotip B' ye göre daha yüksek olasılıkla bağımsız bir risk faktörü olarak bulunmuştur.[55] Ancak başka bir çalışmada genotip B enfeksiyonu olan HBsAg taşıyıcılarının, genotip C enfeksiyonu olanlara göre HBsAg' yi temizleme olasılığının daha yüksek olduğu gösterilmiştir.[56]

Viral süperenfeksiyonlar

Birkaç sporadik vaka raporunda, kronik HBsAg taşıyıcılarındaki HAV (hepatit A virüsü), HCV veya HDV ile akut süperenfeksiyonu, anti-HBs antikoru oluşumu ile birlikte geçici veya kalıcı bir HBsAg kaybı takip etmiştir. İtalya'da yapılan bir çalışmada, HDV süperenfeksiyonu olan HBsAg taşıyıcılarının, olmayanlara göre HBsAg'yi temizleme olasılıklarının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak Chu ve ark. çok değişkenli analizleri HDV süperenfeksiyonunun spontan HBsAg seroklirensi için bir faktör olmadığını göstermiştir. Buna karşılık, HCV süperenfeksiyonu olan HBsAg taşıyıcılarının HBsAg'yi temizleme ihtimalinin, HDV süperenfeksiyonu veya HBV monoenfeksiyonu olan HBsAg taşıyıcılarına göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur.[47]

İlaçlar

Genel olarak kronik HBV hastalarında NA'larla tedavinin uzatılmasıyla klirens oranı artabilir, ancak mevcut NA'larla tedavinin HBsAg klirens oranı düşüktür.[40] NA'lar doğrudan cccDNA'ya etki etmek yerine HBV DNA polimerazı inhibe ederek replikasyonu baskılar. Sonuç olarak cccDNA'ya etki etmemeleri nedeniyle NA'ların

HBV partikülleri ve antijenlerinin üretimini engellemesi oldukça zordur. Yakın zamanda 4769 kronik HBV hastasını kapsayan büyük, çok merkezli bir kohort çalışması, 26614 kişi-yıl entekavir veya TDF (tenofovir disoproksil fumarat) tedavisi sırasında HBsAg'nin 10 yıllık kümülatif kayıp oranının yalnızca % 2 olduğunu göstermiştir. Pegile interferon- α (PegIFN-α) HBV üzerine dual etki gösterir; immünmodülatuvar etki ve minimal direkt antiviral etki. PegIFN-α'nın HBV DNA'yı inhibe etme yeteneği NA'lara göre çok daha zayıf olmasına rağmen, PegIFN-α'nın, 48 haftalık tedaviden sonra HBsAg'deki % 3-7'lik bir klirens oranıyla HBsAg seviyesindeki düşüşü daha belirgin şekilde teşvik ettiği görülmüştür. Bir meta-analiz, başlangıçta kombinasyon tedavisi ile (PegIFN-α + NA), NA monoterapisini karşılaştırmış ve kombinasyonun HBsAg klirens oranını önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Ancak kombinasyon tedavisi ile PegIFN-α monoterapisi arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca, antiviral tedavinin önerildiği inaktif HBsAg taşıyıcılarında PegIFN-α'nın, özellikle başlangıç HBsAg düzeyleri düşük olan hastalarda yüksek bir HBsAg klirens oranı sağladığı görülmüştür.[57]

2.2. IP-10 Molekülü

2.2.1. IP-10 Molekülünün Önemi

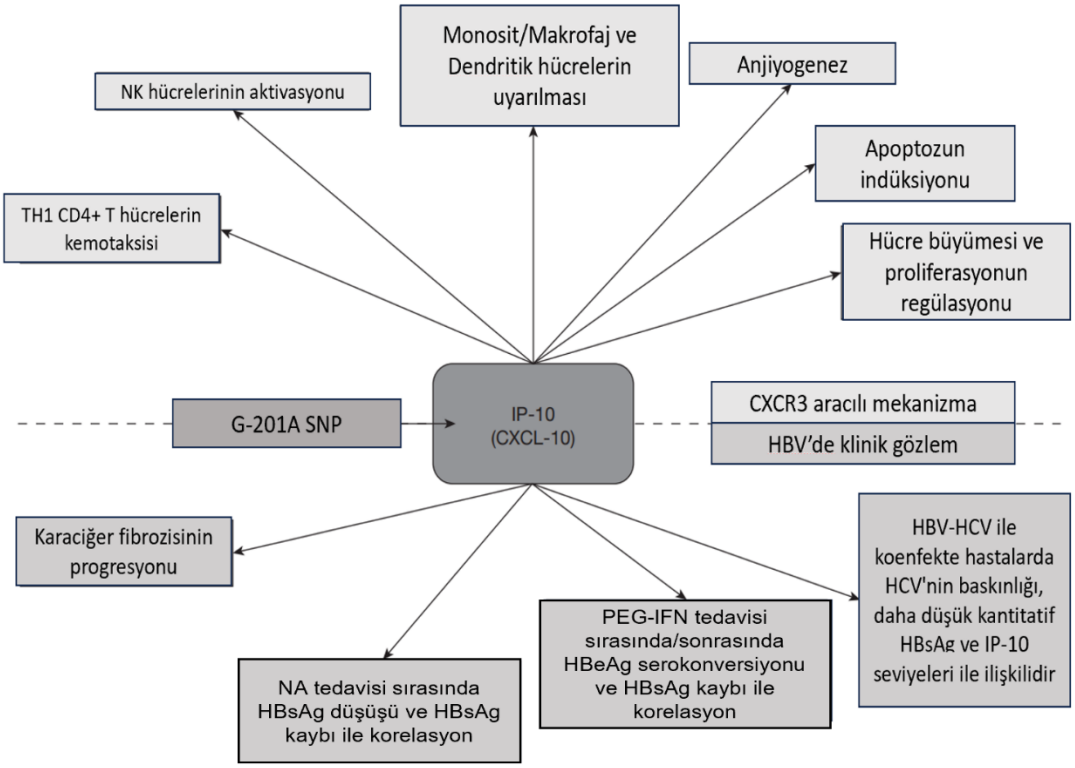
İmmün sistem hücreleri sadece sitotoksik etkiler göstermez, aynı zamanda sitokinler ve kemokinler gibi immün fonksiyonların moleküler mediatörlerini üreterek destekleyici etkiler de gösterir. İnflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinlerin yanı sıra kemokinler de HBV ile ilişkili kronik inflamasyonda kritik bir rol oynar; IL-1β, IL-6 ve IL-17 önemli proinflamatuar sitokinlerdir. Önemli bir anti-inflamatuar sitokin olan IL-10, fibrogenezde immünosüpresif bir rol oynar. IP-10, monosit kemoattraktan protein-1 (MCP-1/CCL2), makrofaj inflamatuar protein-1β (MIP-1β/CCL4) ve Interlökin-8 (IL-8/CXCL8) makrofajların, monositlerin, nötrofillerin ve lenfositlerin inflamasyon bölgesine göçünü indükleyerek etkilerini gösteren kemokinlerdir. Aktive edilmiş T hücrelerinin güçlü bir kemoatraktan maddesi olan IP-10, kronik inflamatuar hastalıklarda yer alan kemokinler üzerine yapılan çalışmaların odak noktası olmuştur.[58] IP-10, viral enfeksiyonlar ve otoimmün hastalıklar (tip 1 DM, graves, romatoid artrit, psöriyatik artrit, sistemik lupus eritematozus, sjögren sendromu gibi) da dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda bağışıklık tepkisinin uyarılmasında önemli bir role sahiptir.

Aktive olmuş Th1 lenfositleri, hedef hücrelerden IP-10 salgılanmasını uyaran, IFN-γ ve TNF-α üretiminin artmasına neden olur. Eksojen lipopolisakkaritlerin (LPS) uyarısı da IP-10 salgısının uyarılmasında ikincil bir rol oynayabilir. IFN-γ ve TNF- α etkisiyle T lenfositler, nötrofiller, monositler, endotel hücreleri, fibroblastlar, keratinositler vb. dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından IP-10 salgılanır. IP-10, işlevini G proteinlerine bağlı yedi trans-membran reseptörü olan kemokin (C-X-C motifi) reseptörü 3'e (CXCR3) bağlanarak gerçekleştirir. CXCR3 ağırlıklı olarak NK hücreler, aktive T ve B lenfositler üzerinde, aynı zamanda dendritik ve makrofaj hücreleri üzerinde de bulunur. IP-10' un ana biyolojik etkisi, lökositlerin enfekte hepatositlere yönelmesidir. Bu nedenle işlevsel olarak inflamatuar kemokin olarak sınıflandırılır. Bağışıklık hücrelerinin kemotaksisi yanında apoptozda, hücre proliferasyonunda ve anjiyogenez aktivitesinin düzenlenmesinde de rol oynar.[59,60,61,62]

2.2.2. IP-10 Molekülünün Hepatit B Enfeksiyonundaki Rolü

IP-10'un esas olarak kronik inflamatuar ve otoimmün hastalıkların patogenezinde, aynı zamanda çeşitli enfeksiyöz hastalıklarda ve kanserde etkisi olan bir proinflamatuar kemokin olduğu düşünülmektedir. Anti-IP-10 antikorları veya IP-10 antagonistleri, otoimmün ve kronik inflamatuar hastalıkların tedavisine yönelik deneysel modellerde başarıyla kullanılmış, IP-10'un kanser immünoterapisinde umut verici bir hedef olduğu öne sürülmüştür. Narumi ve arkadaşlarının, kronik HBV'de IP-10 mRNA'sının esas olarak intralobüler fokal ve periportal peacemeal nekroz çevresindeki hepatositler tarafından sentezlendiğini göstermesi IP-10'un viral hepatitin patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Bu inflamatuar bölgelerdeki yüksek IP-10 konsantrasyonları T hücrelerinin birikmesini ve uyarılmış NK hücrelerinden IFN-γ üretimini sağlar. Bu olay sitokinlerin aracılık ettiği intrahepatik cccDNA'nın sitolitik olmayan eliminasyonu için önemli olan, kendi kendini aktive edici bir bağışıklık tepkisi ile sonuçlanır. Ancak IP-10 antiviral etkilere veya immünopatolojiye yol açan iki ucu keskin bıçaktır. Hepatit B'de bağışıklık sisteminin uyarılması, yalnızca virüsle enfekte hücrelerin sitolitik olmayan yolla temizlenmesini tetiklemekle kalmaz, aynı zamanda sitolitik yanıtları da tetikleyebilir. Bu ifade doğrultusunda, kronik HBV'li hastalarda yüksek IP-10 transkripsiyonunun karaciğer hastalığının ilerlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. IP-10'un uyarılmasının HBV'nin kontrolü üzerinde olumlu bir etkisi

olduğu görülmektedir. Dolayısıyla IP-10'un HBsAg temizlenmesini sağlamak için başlı başına bir terapötik yaklaşım olduğu bile tartışılabilir. Şu ana kadar IP-10' u hedef alan terapötik kavramlar hâlâ erken preklinik aşamalardadır. Daha ileri düzeydeki fikir, HBsAg kaybını hedef alan gelecekteki terapötik yaklaşımlar için IP-10'u bir biyobelirteç olarak kullanma fikridir.[63]



Şekil 4. IP-10 etki mekanizmaları ve HBV enfeksiyonunda klinik etkileri[63]

Yakın zamanda yapılan Papatheodoridis ve ark. 2 farklı çalışması, IP-10 seviyesinin, HBeAg negatif hastalarda entekavir veya TDF tedavisi sırasında HBsAg düşüşünü öngördüğünü göstermiştir. Ancak HBsAg seroklirensi üzerindeki etkisi araştırılmamıştır. Öte yandan IP-10 molekülünün HBeAg serokonversiyonuyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Önceki raporlarda gösterilen bazı virolojik belirteçlere (HBeAg serokonversiyonu ve HBsAg seviyesinde düşüş) dayanarak, IL-10, IL-12, IL-21 ve IP-10 gibi birkaç sitokinin HBV' nin immün kontrolü üzerindeki potansiyel rolüne rağmen, Wong ve ark. çalışmasında yalnızca serum IP-10 düzeyinin HBsAg seroklirensi ile ilişkili olduğu bulunmuştur.[64,65,66]

2.2.3. IP-10 Molekülü Promoter Bölge Polimorfizmleri ve Hepatit B Enfeksiyonu İlişkisi

c.-135C>T Polimorfizmi

Human Genome 19 (hg19)'da G-201A olarak bilinen polimorfizm Human Genome 38 (hg38)'de -135G/A olarak belirtilmiştir [(NM_001565.4) c.-135C>T].

Kronik HBV'li hastalarda tedavinin sonucu, birçok viral ve konakçı faktörleriyle ilişkilidir. Veriler, konakçı genetik varyasyonlarının kronik HBV'li hastaların doğal seyrinde ve tedavi sonuçlarında önemli roller oynayabileceğini öne sürmektedir. İnsan genlerindeki bazı tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) gibi genetik duyarlılıkların, HBV enfeksiyonunda viral klirens ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Ancak insan SNP' lerinin neler olduğu ve bunların HBV ile ilişkili hastalığın ilerlemesini nasıl etkilediği hala net değildir.[67] IP-10 geninin promoter bölgesinde yer alan G-201A polimorfizminin, IP-10 ekspresyonunu düzenleyerek kronik HBV'li hastalarda hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca HCV-HBV koenfeksiyonu olan hastalarda daha yüksek IP-10 düzeylerinin, daha düşük HBsAg düzeyleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir.[62]

Limothai ve ark. makalesinde, çok değişkenli analizde Peg-IFN'ye verilen virolojik yanıtla ilişkilendirilen tek faktörün IP-10 titreleri değil, aynı zamanda G-201A polimorfizmi olduğu da bulunmuştur. IP-10 seviyesi dalgalanabilir ve başka faktörlerden etkilenebilir. Dolayısıyla G-201A polimorfizmi, IP-10' un katkısıyla immün reaksiyonları hedef alan tedavi yaklaşımlarına daha iyi yanıtlar verilmesini sağlayabilir. G-201A polimorfizminin IP-10 ve hepatit B açısından değerini ve rolünü açıkça ortaya koymak için daha büyük çalışmalara ihtiyaç vardır.[63] Bildiğimiz kadarıyla bu polimorfizmin kronik HBV'de HBsAg klirensi ile ilişkisini doğrudan araştıran bir çalışma yapılmamıştır.

Tüm veriler ışığında çalışmamızın hipotezi IP-10 promotör bölgesindeki polimorfizmlerin IP-10 ekspresyonunu değiştirerek immün yanıtı etkileyebileceği ve HBsAg klirensine etki edebileceği yönündedir. Önceki çalışmalarda IP-10 promoter bölge polimorfizmlerinden c.-135C>T'nin hepatit B ve C'de hastalık progresyonu ile ilişkisine bakılmıştır. Çalışmamızda bu polimorfizmin yanı sıra sekanslama yöntemi yardımıyla IP-10 promoter bölgesinde yer alan HBsAg klirensi ile ilişkili olabilecek diğer polimorfizmlerin bakılması da amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışmanın Tasarımı

Çalışma Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tarafından takip edilen hastalarda yürütülmüştür. Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Polikliniğine Temmuz 2005- Aralık 2022 tarihleri arasında başvuran 1950 kronik HBV hastası retrospektif olarak taranmıştır. Vaka grubu olarak kronik HBV ile takip edilen HBsAg kaybı olmuş 104 hastanın alınması planlanmıştır. Ancak 104 hastadan 2 hastada HCV koenfeksiyonu, 8 hastada karaciğer transplantasyonu sonrasında HBsAg kaybı gelişmesi, 2 hastada da tek HBsAg negatifliği olması nedeniyle çalışma dışı bırakılmıştır. 6 hastanın da exitus olduğu öğrenilmiştir. Kalan hastalardan ulaşılabilen ve çalışmayı kabul eden 60 hasta alınmıştır. Kontrol grubuna çalışmanın başladığı tarihten itibaren polikliniğe başvuran, HBsAg pozitifliği devam eden kronik HBV hastalarından HBsAg kaybı olmuş grup ile benzer yaş ve cinsiyette olan, çalışmayı kabul eden 60 hasta dahil edilmiştir. Sanger sekans sonuçları değerlendirmeye uygun olmadığı için vaka grubundan 2, sekans sonuçları veri analizi aşamasında analiz kriterlerini karşılamadığı için vaka grubundan 1, kontrol grubundan 2 hasta olmak üzere toplam 5 hastada polimorfizmler çalışılamamıştır. Bu hastalar polimorfizm dışındaki diğer analizlere dahil edilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alınmıştır. Tüm hastaların kanları gönüllülük esasına dayanarak etik kurallar çerçevesinde toplanmıştır. Hem hasta hem de kontrol grubundaki kişiler, çalışmaya katılmadan önce çalışmanın amacı, içeriği hakkında bilgilendirilmiş ve onamları alınmıştır.

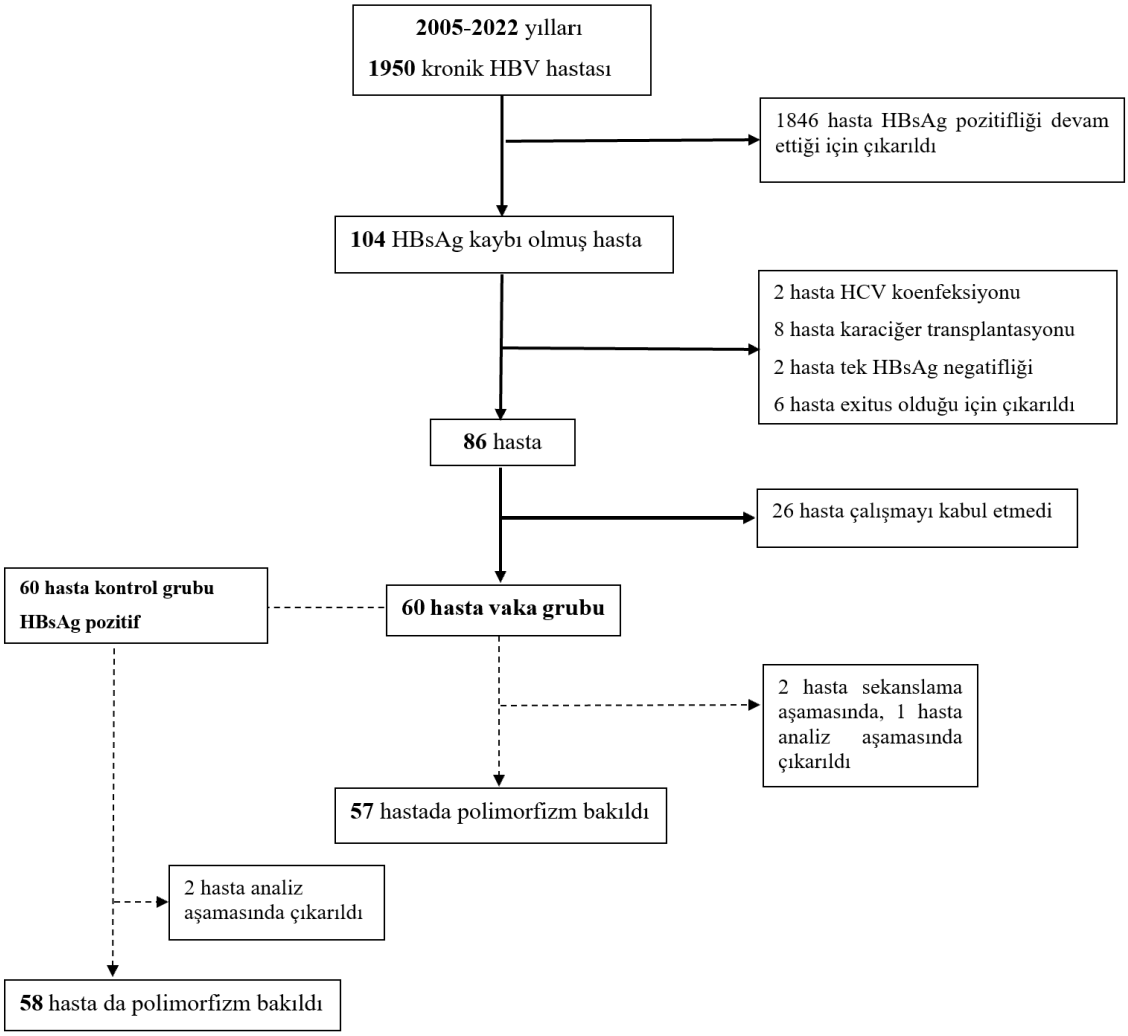
Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- 18 yaş üstü olmak
- En az 6 ay veya daha uzun süredir HBsAg pozitifliği ile kronik HBV enfeksiyonu tanısı almış olmak
- En az 1 yıl Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Polikliniğinde takip edilmiş olmak
- 6 ay ara ile bakılan en az 2 HBsAg negatifliğini görmek

- Kontrol grubu olarak çalışmanın başladığı tarihten itibaren polikliniğe başvuran, dahil edilme kriterlerine uyan, HBsAg kaybı olmuş grup ile benzer yaş ve cinsiyette olan, HBsAg pozitifliği devam eden kronik HBV hastalarından çalışmayı kabul edenler dahil edilmiştir.

Çalışmanın dışlama kriterleri:

- Akut HBV enfeksiyonu
- Hepatit C ve HIV koenfeksiyonu
- Siroz ve/veya HCC gelişmiş olması
-Karaciğer transplantasyonu olması



Şekil 5. Çalışma katılımcılarının belirlenmesi

Çalışma gözlemsel, tek merkezli, vaka-kontrol çalışması olarak dizayn edilmiştir. Çalışmaya katılmayı kabul eden ve dahil edilme kriterlerine uyan hastaların demografik, klinik ve laboratuvar verileri, veri toplama formu aracılığıyla toplanmıştır. Laboratuvar verilerine Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi'nde kullanılmakta olan otomasyon sistemi (MergenTech EBYS) kullanılarak ulaşılmıştır. Hastalardan alınan periferik kan örneği 0,5 molar (M) etilendiamintetraasetik asit di-potasyum (K2EDTA) (5.4 mg) içeren vakumlu tüplere (BD Vacutainer®, İngiltere) alınmış ve Biyoteknoloji Merkezi içerisinde yer alan Göğüs Hastalıkları Moleküler Araştırma Laboratuvarında çalışılmıştır.

Alınan periferik kanlar DNA izolasyonu yapılana kadar +4˚C'de saklanmıştır.

3.2. Materyal ve Metod

Çalışmamızda kullanılan hepatit markerleri, HBV DNA, ALT değerleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında aşağıda belirtilen tekniklerle çalışılmıştır:

HBV enfeksiyonu serolojisi: 2005-2012 yılları arasında Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) yöntemi ile Abbott sistemlerinde, 2012-2019 yılları arasında Electro Chemiluminescent Immunoassay (ECL) yöntemi ile Roche Cobas E601 Immunology Analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ile çalışılmıştır. Serum HBsAg ve HBeAg düzeyleri, yarı kantitatif test sonuçları S/CO (sample/cut-off) cinsinden ifade edilmiştir. 2019 Ağustos'tan itibaren ARCHITECT-i2000 HBsAg test CMIA kullanılmıştır. Örnekte HBsAg varlığı veya yokluğu, reaksiyondaki kemilüminesan sinyalin bir ARCHITECT-i2000 HBsAg kalibrasyonundan belirlenen cut- off sinyaliyle karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir.

HBV DNA: Real Time PCR yöntemi ile plazma örneklerinde HBV DNA'nın kantitatif ölçümü için 2005-2020 yılları arasında, COBAS Amplicor™ HBV Monitor Test (Amplicor test) ve COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan HBV Test (ROCHE) kitleri kullanılmıştır. COBAS AmpliPrep ile plazma örneklerinden otomatik olarak nükleik asit ektraksiyonu yapılmıştır. 2020-2022 yılları arasında, Qiagen Artus HBV QS-RGQ kitleri kullanılmıştır; kit, patojen tespiti için otomatik sistem olan QIAsymphony RGQ (Rotor-Gene Q cihazları) ile kullanılmaktadır. 2022 yılında Abbott *m*2000 RealTi*m*e Systemde, Abbott RealTime HBV assay kitleri kullanılmıştır.

ALT: Beckman Coulter AU5800 cihazında fotometrik yöntemle ölçülmüştür.

Kan örneklerinden gDNA (genomik DNA) izolasyonu:

Kan örneklerinden DNA izolasyonu, laboratuvarımızda ve literatürde optimize edilmiş yöntemlerle yapılmıştır (Psifidi A, 2014). İzolasyonlar için gDNA izolasyon kiti, kit protokolü uygulanarak çalışılmıştır. DNA izolasyon kiti olarak GeneAll® Exgene™ Blood SV mini kullanılmıştır. EDTA içeren tüpe alınan kan örnekleri santrifüj edilerek beyaz renkli lökosit içeren tabaka pipet yardımı ile çekilmiş ve temiz bir ependorfa aktarılmıştır. Ardından kitte bulunan lysis buffer ile hücreler parçalanmıştır. Yıkama solüsyonu ile DNA temizlendikten sonra kloroform ve isopropanol içeren kit solüsyonlarla DNA kolona presipite edilmiş ve en son kolona elute buffer eklenerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. DNA miktarı ve kalitesi nanodrop ile spektrometrik olarak ölçülmüştür.

Mutasyon analizleri:

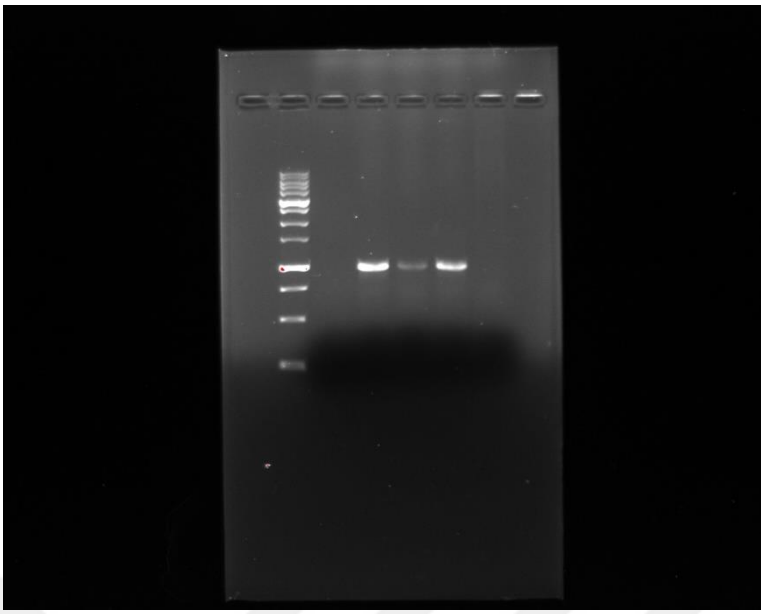
Elde edilen gDNA'dan IP-10 genindeki mutasyonların çalışılması için ilgili genin promoterine yönelik primerler NCBI-BLAST programı kullanılarak tasarlanmış ve ardından konvansiyonel PCR yöntemi ile ilgili bölge amplifiye edilmiştir. Forward primer baz dizisi 5'-GAGGAGCAGAGGGAAATTCCG-3' reverse primer baz dizisi 5'-CGTGGACAAAATTGGCTTGC-3' idi. Elde edilen amplikonlar agaroz jelde yürütülerek konfirme edildikten sonra Sanger sekanslama için hizmet alımı yapılmıştır.

Agaroz jel hazırlanması basamakları aşağıda belirtilmiştir:

- 1 gr agaroz 50 ml TBE (Buffer) (Borik asit 5.5 gr, Tris-Base 10,9 gr, EDTA 0,95 gr, ph 8-8,2) ile karıştırıldı ve ardından mikrodalgada 2 dk çözdürüldü.

- İlk sıcaklığı geçtiğinde elektroforez tankına aktarıldı.

- Jel Etidiyum bromürlü hazırlandı, 5ml DNA 15 ml Tracking buffer ile jele yüklendi.



Şekil 6. IP-10 promoter, exon 1, intron 1, exon 2 bölgesini içeren yaklaşık 1000 bazlık gen bölgesinin PCR reaksiyonu ile çoğaltılması ardından agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 7. Sanger sekanslamanın Geneious Prime Trial versiyonu programındaki kromatogram görünümü

Biyoinformatik analizler:

Sekanslama sonucunda promoter bölge yanında exon 1, intron 1, exon 2 bölgeleri de elde edilmiştir ve bu bölgeler de değerlendirmeye alınmıştır. Sekans analiz sonuçları şu şekilde yapılmıştır; önce sekanslanan IP-10 (GRCh38/hg38'e göre chr4:76,022,698-76,023,698 arasında kalan bölge) promoter, exon 1, intron 1 ve exon 2'yi içeren bölgede; GWAS veritabanı ve literatür taranarak 3 varyant belirlendi (c.-135C>T,

c.85C>T, c.83T>G). Elde edilen sekans dataları (ab1) CLC Genomic Workbench 24 programında analiz edildi. Data analizi esnasında primer bağlanma bölgeleri, ilk 20 ve son 30 dizi, phered kalite puanı 20'inin altındaki bölgeler, arka plan gürültüsü % 20'nin üstündeki sekanslar değerlendirme dışında bırakılmıştır. Bu kriterleri karşılamayan 3 hasta çalışma dışında bırakılmıştır.

Hasta sekans verileri ile birlikte programa referans sekans da yüklenmiştir. Yaklaşık 1000 nükleotid uzunluğundaki referans sekans aşağıdaki gibidir:

AACACGTGGACAAAATTGGCTTGCAGGAATAATTTCAAGTTTTTCTAAAGACCTTGGATTA
ACAGGTTGATTACTAATGCTGATGCAGGTACAGCGTACAGTTCTAGAGAGAGGTACTCCTG
TAGGAAAAGAGGAACAGCAGAGAAGGTTAGCACAGTGTTCATTTTAGGCATTTAATGTAGA
CTGGTGGTATTTAGCAGAACCTATATCCCCATATCAGCAAATAGTCACTTAATCTGAGGAG
GAATGGATCACATCATAACACAACTGTAAATGATTAAAGAGTTGATTATCTGGAAGAAAAG
AATTGCAGCTTGTTGATTATAAAGTCAAACCCTTAAGCACAGTTCATGTGGTTCATTGAGC
TTAGTTAGGTAAGGAAGTATCTGTATCTCATCTCTGTCCGCATTCCCTCACATTTTCTCTC
TCTATCCTCCCTCTTCCCCATCTCTTCTGTCCTCCTTCCctttttccttctctttctctta
ttctatttgtttctctCACTTCAATTCATATAAGTTTTATGATCTGAGGGAATCTCTATTT
ATTTCCCTCTTATTTATAAGCATGCAGTGAAACTTTTACAAATACATTATTTCTGTATTTT
TAGAATTTATACCTATTCCTATTTCTCATTTTACAAATTAAGTATCCTTTGATGTTCCTTA
CCTTGAATGCCACTTAGAGTCAGAAAGATAAGGCAGCAAATCAGAATGGCAGTTTGATTCA
TGGTGCTGAGACTGGAGGTTCCTCTGCTGTAGGCTCAGAATATGTCTAAGCAATTGAGGAA
TGTCTCAGAAAACGTGGGGCTAGTGTGCCATATTTATCTGCAAAGCCATTTTCCCTCCCTA
ATTCTGATTGGATAAGGGCATTACAGTTGACTTAGCAAAACCTGCTGGCTGTTCCTGGGGA
AGTCCCATGTTGCAGACTCGAAGGTATTATTTATTGTAGCCTCCAAGTTACGGAATTTCCC
TCTGCTCCTCTTTTTTTGGTAATA

3.3. İstatistiksel Yöntem ve Analizler

Verilerin istatistiksel analizinde Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 25.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümler ortalama ve standart sapma, gerekli yerlerde medyan (ortanca) ve 25-75'inci persentil olarak özetlendi. Kategorik ifadelerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. Çalışmada yer alan parametrelerin normal dağılım gösterip göstermediğini belirlemede Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren parametrelerde

Bağımsız student t-testi, normal dağılım göstermeyen ikili grup analizlerinde Mann Whitney U testi kullanıldı. Hastaların bazal HBsAg, bazal HBV DNA ve bazal ALT değerlerinin HBsAg negatifleştirme gücünü ifade eden eğri altında kalan alan orijinal adı ile Area Under the Curve (AUC) için alıcı işletim karakteristiği orijinal adıyla; Receiver Operating Characteristic (ROC) analizi kullanıldı. ROC analizi sonucunda her bir değişken için eşik değer belirlenerek söz konusu noktalardaki duyarlılık ve özgüllük değerleri hesaplandı. Tüm testlerde istatistiksel önemlilik düzeyi $p<0,05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Hastaların Özellikleri

Çalışmaya vaka grubu olarak HBsAg kaybı olan 60 hasta ile kontrol grubu olarak HBsAg pozitifliği devam eden 60 hasta olmak üzere toplam 120 hasta dahil edildi. 2005-2022 yılları arasındaki 1950 kronik HBV hastasından 104'ünde HBsAg kaybı olmuştu ve HBsAg kaybı oranı % 5,33'tü. Çalışmada yer alan hastaların 80 (% 66,7)'i erkek, 40 (% 33,3)'ı kadındı. Hastaların yaş ortalaması 58,0±10,6 yıl, VKİ (kg/m^2) değeri ortalaması ise 27,9±4,3 idi. Alkol kullanımına hastaların 11 (% 9,2)'inde, sigara kullanımına ise 45 (% 37,5)'inde rastlanıldı. Cinsiyet, yaş, alkol kullanımı, sigara kullanımı, VKİ açısından vaka ve kontrol grupları arasında farklılık yoktu (p>0,05). Tanı anındaki yaş ortalaması HBsAg kaybı olan grupta 38,1±12,0 yıl, HBsAg pozitif devam eden grupta 34,9±14,5 yıldı fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,105). HBsAg kaybı olduğundaki yaş ortalaması vaka grubunda 53,2±11,3 idi. Vaka grubundaki hastaların % 85'inde (51 hasta) 40 yaşından sonra HbsAg kaybı olmuştu. Demografik verilerin vaka ve kontrol gruplarındaki dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir.

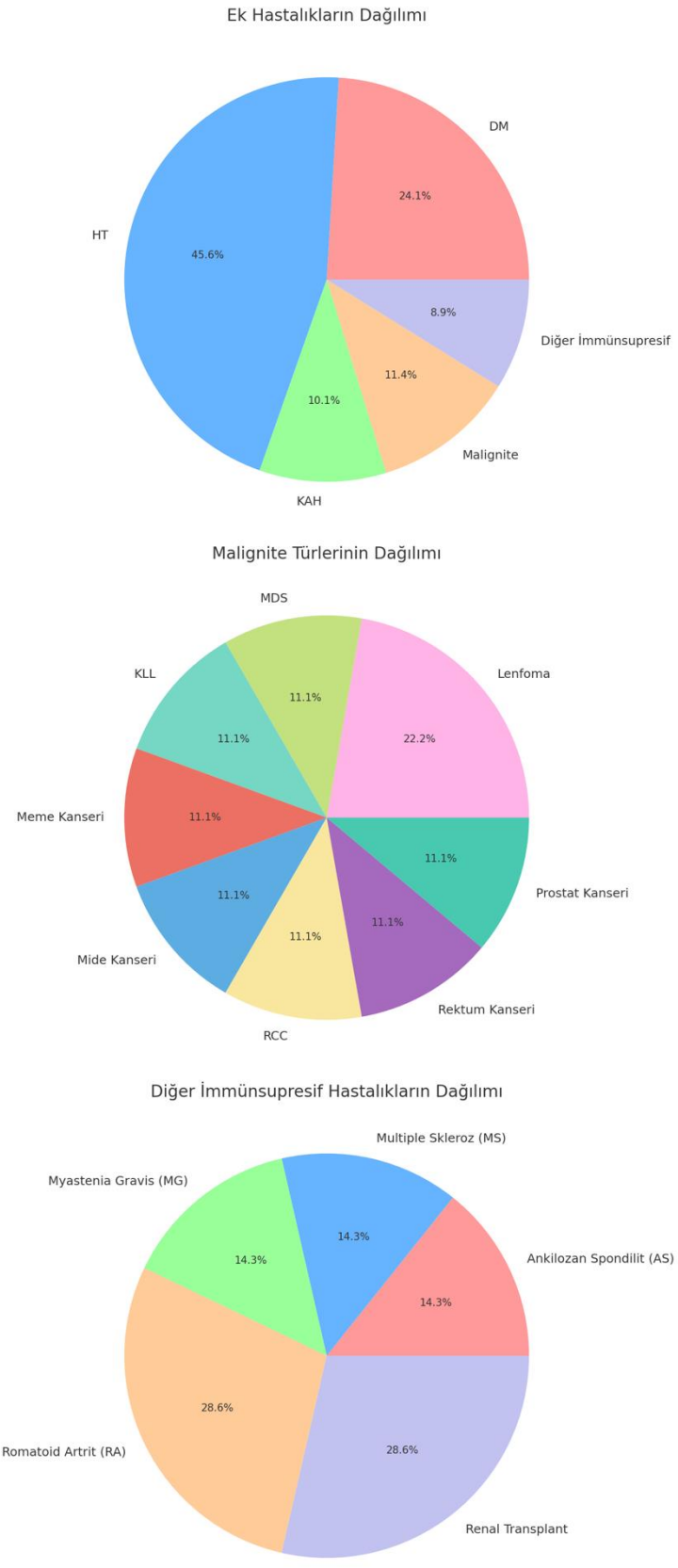
Tablo 2. Vaka ve kontrol grubu demografik verileri

	Vaka (n=60)	**Kontrol (n=60)**	**Toplam (n=120)**	**p†**
	n(%)	**n(%)**	**n(%)**	
Cinsiyet Erkek Kadın	 40 (66,7) 20 (33,3)	 40 (66,7) 20 (33,3)	 80 (66,7) 40 (33,3)	1,000
Alkol Sigara	4 (6,7) 24 (40)	7 (11,7) 21 (35)	11 (9,2) 45 (37,5)	0,343 0,572
Yaş (Ort±Ss)	58,6±10,5	57,4±10,8	58,0±10,6	0,522‡
Tanı anındaki yaş (Ort±Ss) Med(25-75th)	38,1±12,0 38 (28,3-46)	34,9±14,5 33,5 (24-46,75)	35,5±13,3 35 (25-46)	0,105↑
HBsAg kaybı yaşı (Ort±Ss) Med(25-75th)	53,2±11,3 53 (47-60,75)			
VKİ(Ort±Ss) Med(25-75th)	28,3±4,2 27,9 (25,5-30,9)	27,5±4,3 27,2 (24,8-28,4)	27,9±4,3 27,4 (25,1-29,9)	0,139↑

*p<0,05, **p<0,01, †: Ki-kare, ‡: Bağımsız student t-test, ↑: Mann Whitney U test, 25-75th persentil

Bulaş yolu hastaların 12 (% 10)'sinde vertikal iken, 108 (% 90)'inin bulaş yolu bilinmiyordu. Gruplar arasındaki dağılımın ise homojen olduğu gözlendi (p>0,05) (Tablo 3).

Hastaların 19 (% 15,8)'unda DM (diabetes mellitus), 36 (% 30)'sında HT (hipertansiyon), 8 (% 6,7)'inde KAH (koroner arter hastalığı), 9 (% 7,5)'unda Malignite, 7 (% 5,8)'inde ise diğer immünsupresif hastalıklara rastlanıldı. Malignite olan hastaların 2 (% 22,2)'sinde lenfoma, 1 (% 11,1)'inde MDS (myelodisplastik sendrom), 1 (% 11,1)'inde KLL (kronik lenfositik lösemi), 1 (% 11,1)'inde meme kanseri, 1 (% 11,1)'inde mide kanseri, 1 (% 11,1)'inde RCC (renal hücreli karsinom), 1 (% 11,1)'inde rektum kanseri, 1 (% 11,1)'inde prostat kanseri vardı. Diğer immünsupresif hastalık rastlanan 7 hastadan sırasıyla 1 (% 14,3)'inde AS (ankilozan spondilit), 1 (% 14,3)'inde MS (multiple skleroz), 1 (% 14,3)'inde MG (myastenia gravis), 2 (% 28,6)'sinde RA (romatoid artrit), 2 (% 28,6)'sinde ise renal transplantasyon tespit edildi. Ek hastalık bulguları ile gruplar arasında anlamlı bir farklılığa rastlanılmadı (p>0,05) (Tablo 3) (Şekil 8).



Şekil 8. Ek hastalıkların dağılımı

Tablo 3. Vaka ve kontrol gruplarında bulaş yolu ve komorbiditelerin dağılımı

	Vaka (n=60)	Kontrol (n=60)	Toplam (n=120)	p†
	n(%)	n(%)	n(%)	
Bulaş yolu				
Vertikal	6 (10)	6 (10)	12 (10)	1,000
Bilinmeyen	54 (90)	54 (90)	108 (90)	
DM	7 (11,7)	12 (20)	19 (15,8)	0,211
HT	19 (31,7)	17 (28,3)	36 (30)	0,690
KAH	6 (10)	2 (3,3)	8 (6,7)	0,143
Malignite	4 (6,7)	5 (8,3)	9 (7,5)	0,729
Diğer immünsüpresif hastalıklar	3 (5)	4 (6,7)	7 (5,8)	0,697
Diğer immünsupresif hastalıklar (n=7)				
AS	-	1 (25)	1 (14,3)	
MS	1 (33,3)	-	1 (14,3)	
MG	1 (33,3)	-	1 (14,3)	
RA	-	2 (50)	2 (28,6)	
Renal transplant	1 (33,3)	1 (25)	2 (28,6)	

*p<0,05, **p<0,01, †: Ki-kare

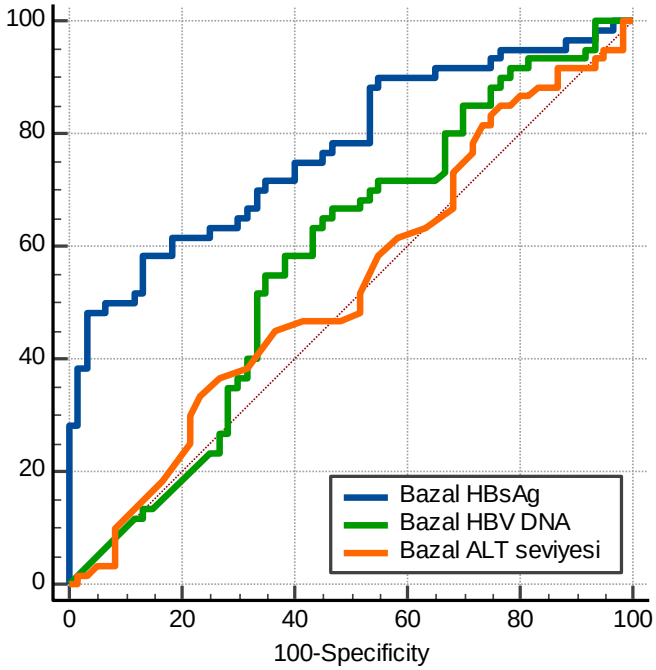
Tüm gruplar ele alındığında bazal HBsAg ortalaması 2977,1±2302,6 iken; vaka grubunun bazal HBsAg ortalamasının (1969,7±2083,6), kontrol grubunda yer alan hastalara (3984,6±2070,8) göre daha düşük olması istatistiksel açıdan anlamlı bulundu (**p<0,001**). Tüm gruplar dahil edildiğinde en yüksek HBsAg ortalaması 4117,8±2818,3 iken; vaka grubunun en yüksek HBsAg ortalamasının (2187,2±2336,9), kontrol grubunda yer alan hastalara (6048,4±1725,7) göre daha düşük olması istatistiksel açıdan anlamlı idi (**p<0,001**). Hastaların bazal ALT seviyesi ortalamasının 48,7±82,0; en düşük ALT ortalamasının 15,7±6,6; en yüksek ALT ortalamasının ise 75,8±102,2 olduğu saptandı. Hastaların bazal ALT seviyesi, en düşük ALT ve en yüksek ALT seviyesi ortalamalarının vaka ve kontrol grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı saptandı (p>0,05). Bazal HBV DNA ortalaması 4049462,8±21305752,9 iken; vaka grubunda, kontrol grubuna göre daha düşük bazal HBV DNA ortalaması olduğu gözlenmesine karşın, aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı (p>0,05). En yüksek HBV DNA ortalaması 15658563,7±95251416,7 iken; vaka grubunda yer alan hastaların, kontrol grubunda yer alan hastalara göre daha düşük ortalamaya sahip oldukları tespit edildi (**p=0,002**). Vaka grubunda yer alan hastalarda HBsAg negatifleşme süresi ortalamasının 15,0±7,3 yıl olduğu tespit edildi ve 39 hasta (% 65) 10. yıldan sonra negatifleşmişti. Vaka grubunda takip süresi ortalaması 19,5±7,5 yıl iken kontrol grubunda 21,6±8,8 yıldı ve benzerdi (p=0,199). Her 2 grupta da 1 (% 1,7)'er hastada antidelta pozitifliği saptandı (p=1,000). Bazal HBeAg pozitifliği tüm

hastalardan 9 (% 7,5)'unda gözlenirken, vaka grubunda kontrol grubunda yer alan hastalara göre bazal HBeAg pozitiflik oranı daha düşük bulundu (**p=0,015**). Takipte HBeAg kaybı 5 (% 55,5) hastada tespit edilirken; vaka grubunda 1 (% 100), kontrol grubunda 4 (% 50) hastada rastlanıldı. Takipte HBeAg seroreversiyonu hastalardan 1 (% 0,86)'inde rastlanırken, tespit edilen olgu kontrol grubunda idi (p=0,315) (Tablo 4).

Tablo 4. Vaka ve kontrol gruplarına göre laboratuvar bulguları dağılımı

	Vaka (n=60)	**Kontrol (n=60)**	**Toplam (n=120)**	**p‡**
	Ort±Ss Med (25-75th)	**Ort±Ss Med (25-75th)**	**Ort±Ss Med (25-75th)**	
Bazal HBsAg S/CO	1969,7±2083,6 1126 (161-3298,75)	3984,6±2070,8 3923,5 (1984,3-5771,8)	2977,1±2302,6 2511 (991,5-5227,5)	**<0,001****
En yüksek HBsAg S/CO	2187,2±2336,9 1294,5 (167,8-4126,8)	6048,4±1725,7 6327,5 (5317,8-7144)	4117,8±2818,3 5064,5 (1089,3-6684,5)	**<0,001****
Bazal ALT U/L	47,2±73,8 27 (17,3-37,5)	50,3±90,1 26 (20-43,3)	48,7±82,0 26,5 (18-39,8)	0,560
En düşük ALT U/L	16,1±7,1 15,5 (11,3-21,8)	15,4±6,1 14 (11-19)	15,7±6,6 14 (11-19,8)	0,695
En yüksek ALT U/L	68,0±89,0 38,5 (25,8-61,3)	83,6±114,0 43 (32,3-85,3)	75,8±102,2 41,5 (30-67)	0,163
Bazal HBV DNA IU/mL	730901,0±3708247,2 223 (25-3120,5)	7368024,5±29654913,9 1580 (20,25-16240)	4049462,8±21305752,9 525 (22-5552,5)	0,134
En yüksek HBV DNA IU/mL	736299±3707256,1 1260 (140-7315)	30580828,4±133539513,3 7335 (1100-230499,5)	15658563,7±95251416,7 2290 (213,3-21875)	**0,002****
HBsAg Negatifleşme süresi (Yıl)	15,0±7,3 15 (8-21)			
Ortalama takip süresi (Yıl)	19,5±7,5 19,5 (13-25)	21,6±8,8 23 (16-25)	20,5±8,2 22 (14-25)	0,199
	Vaka (n=60)	**Kontrol (n=60)**	**Toplam (n=120)**	**p†**
	n(%)	**n(%)**	**n(%)**	
Antidelta Negatif Pozitif	59 (98,3) 1 (1,7)	59 (98,3) 1 (1,7)	118 (98,3) 2 (1,7)	1,000
Bazal HBeAg Negatif Pozitif	59 (98,3) 1 (1,7)	52 (86,7) 8 (13,3)	111 (92,5) 9 (7,5)	**0,015***
	Vaka (n=1)	**Kontrol (n=8)**	**Toplam (n=9)**	
	n(%)	**n(%)**	**n(%)**	
Takipte HBeAg kaybı olanlar	1 (100)	4 (50)	5 (55,5)	-
	Vaka (n=60)	**Kontrol (n=56)**	**Toplam (n=116)**	
	n(%)	**n(%)**	**n(%)**	
Takipte HBeAg seroreversiyonu olanlar	-	1 (1,78)	1 (0,86)	0,315

*p<0,05, **p<0,01, †: Ki-kare, ‡: Mann Whitney U, 25-75th persentil



Şekil 9. Bazal laboratuvar değerlerinin HBsAg negatifleşmesini öngörebilmesinin Roc Curve testi ile incelenmesi

Hastaların bazal HBsAg, bazal HBV DNA ve bazal ALT değerleri ile HBsAg negatifleşmesini öngörebilmesi Roc Curve testi ile incelendi. Yapılan incelemeye göre cut-off değerleri sırasıyla; bazal HBsAg değerinde 1559 S/CO ve altında, bazal HBV DNA değerinde 336 ve altında, bazal ALT değeri ölçümünde ise 19 ve altında olduğu saptandı. Elde edilen cut-off değerlerinden bazal HBsAg değerinin %77,2 AUC, % 58,33 duyarlılık, % 86,67 özgüllük ile istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edildi (**p<0,001**) (Tablo 5).

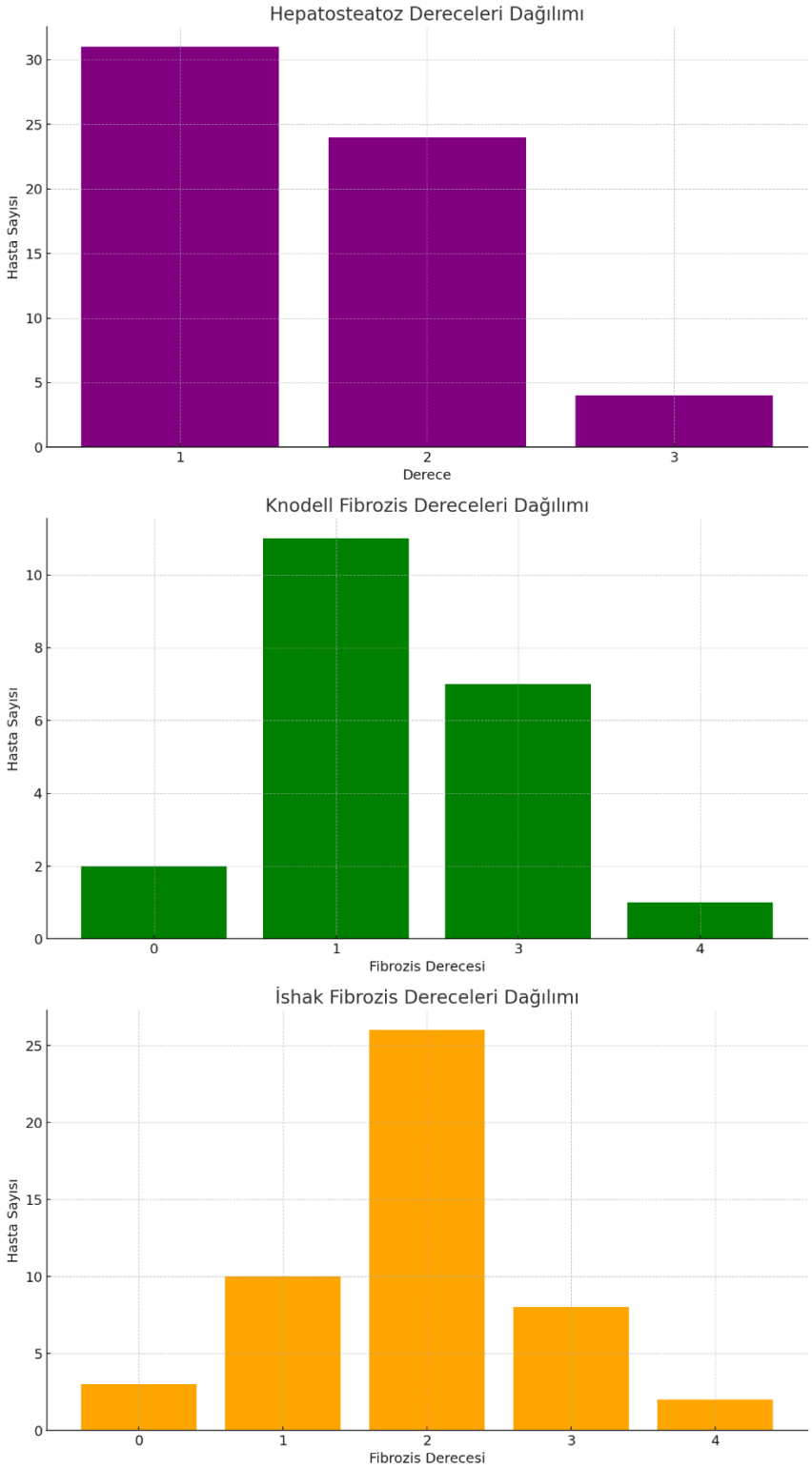
Tablo 5. Roc Curve testi ile bazal laboratuvar değerlerinin HBsAg negatifleşmesini öngörmesi

	Bazal HBsAg	**Bazal HBV DNA**	**Bazal ALT**
Cut-Off	≤1559	≤336	≤19
AUC (%95 CI)	0,772 (0,686-0,844)	0,579 (0,486-0,669)	0,531 (0,438-0,623)
Duyarlılık (%95 CI)	58,33 (44,9-70,9)	55 (41,6-67,9)	33,33 (21,7-46,7)
Özgüllük (%95 CI)	86,67 (75,4-94,1)	65 (51,6-76,9)	76,67 (64-86,6)
PPV (%95 CI)	81,4 (68,9-89,6)	61,1 (51-70,4)	58,8 (44,4-71,9)
NPV (%95 CI)	67,5 (60,3-74,0)	59,1 (50,8-66,9)	53,5 (47,8-59,1)
P	**<0,001****	0,135	0,562

** p<0,05, **p<0,001, ROC Curve*

Hepatosteatoz hastaların 61 (% 50,8)'inde tespit edilirken; dağılımın vaka ve kontrol grubunda benzer olduğu tespit edildi (p=0,855). Hepatosteatoz tespit edilen 61

hastadan 31 (% 50,8)'inde Grade 1, 24 (% 39,3)'ünde Grade 2, 4 (% 6,6)'ünde Grade 3 hepatosteatoz tespit edilirken, 2 (% 3,3)'sinde ise derece belirtilmediği tespit edildi. Vaka grubunda Grade 2, kontrol grubunda Grade 1 ve Grade 3 hepatosteatoz oranı anlamlı derecede daha yüksek bulundu (**p=0,021**). Knodell skorlamasına göre fibrozis derecesi 21 hastada tespit edildi. Hastaların 2 (% 9,5)'sinde 0, 11 (% 52,4)'inde 1, 7 (% 33,3)'sinde 3, 1 (% 4,8)'inde 4 iken, vaka ve kontrol gruplarındaki dağılım benzer bulundu (p=0,325). İshak skorlamasına göre fibrozis derecesi 49 hastada tespit edildi. Hastaların 3 (% 6,1)'ünde 0, 10 (% 20,4)'unda 1, 26 (% 53,1)'sında 2, 8 (% 16,3)'inde 3, 2 (% 4,1)'sinde 4 olduğu gözlenirken; vaka ve kontrol gruplarındaki dağılımın benzer olduğu görüldü (p=0,492). Knodell ve İshak skorlamasına göre HAI medyan değeri vaka ve kontrol gruplarında benzer bulundu (Tablo 6) (Şekil 10).



Şekil 10. Hepatosteatoz ve biyopsi bulgularının dağılımı

Tablo 6. Vaka ve kontrol grubunda hepatosteatoz ve biyopsi bulguları

	Vaka (n=60)	**Kontrol (n=60)**	**Toplam (n=120)**	**p†**
	n(%)	**n(%)**	**n(%)**	
Hepatosteatoz	31 (51,7)	30 (50)	61 (50,8)	0,855
Hepatosteatoz derecesi (n=61)				
Grade 1	11 (35,5)	20 (66,7)	31 (50,8)	**0,021***
Grade 2	17 (54,8)	7 (23,3)	24 (39,3)	
Grade 3	1 (3,2)	3 (10)	4 (6,6)	
Derece belirtmemiş	2 (6,5)	-	2 (3,3)	
Biyopsi	19 (31,7)	44 (73,3)	63 (52,5)	-
Biyopsi (n=63)				
Var	16 (84,2)	33 (75)	49 (77,8)	-
Var (sonucuna ulaşılamamış)	3 (15,8)	11 (25)	14 (22,2)	
Fibrozis derecesi (Knodel) (n=21)				
0	2 (14,3)	-	2 (9,5)	0,325
1	8 (57,1)	3 (42,9)	11 (52,4)	
3	3 (21,4)	4 (57,1)	7 (33,3)	
4	1 (7,1)	-	1 (4,8)	
Fibrozis derecesi (İshak) (n=49)				
0	2 (12,5)	1 (3)	3 (6,1)	0,492
1	3 (18,8)	7 (21,2)	10 (20,4)	
2	9 (56,3)	17 (51,5)	26 (53,1)	
3	1 (6,3)	7 (21,2)	8 (16,3)	
4	1 (6,3)	1 (3)	2 (4,1)	
	Med (25-75th)	**Med (25-75th)**	**Med (25-75th)**	**p‡**
HAI (Knodel) (n=21)	7 (4-9)	5 (4-7)	7 (4-9)	0,449
HAI (İshak) (n=49)	5 (3-7,75)	6 (4-8)	6 (4-8)	0,282

*p<0,05, **p<0,01, †: Ki-kare, ‡: Mann Whitney U

Hastaların 68 (% 56,7)'sinde antiviral tedavi kullanımı görülürken; bunların 19 (% 31,7)'u vaka grubunda, 49 (% 81,7)'u kontrol grubunda idi**.** IFN ve NA kullanımı toplamda 20 hastada gözlenirken; bunların 6 (% 10)'sı vaka, 14 (% 23,3)'ü kontrol grubunda yer alıyordu. Sadece NA kullanımı 47 (% 39,2) hastada saptanırken; bunların 13(% 21,7)'ü vaka, 34(% 56,7)'ü kontrol grubundaydı. Sadece IFN kullanımı 1 hastada gözlendi, bu hasta da kontrol grubunda yer alıyordu. Kontrol grubu hastalarda antiviral kullanımı (**p<0,001**), IFN ve NA kullanımı (**p=0,042**), sadece NA kullanımı (**p<0,001**) anlamlı derecede daha yüksek saptandı. IFN ve NA kullanımı süresi medyan değeri kontrol grubunda 16,8 (13,3-24,1) yıl, vaka grubunda 9,5 (6,25-12) yıldı (**p=0,011**). Sadece NA kullanımı medyan değeri ise kontrol grubunda 9 (6-15) yıl, vaka grubunda 5,5 (3,75-8) yıldı (**p=0,01**). İlaç kullanım süresindeki bu farklar istatistiksel olarak anlamlıydı ve kontrol grubunda daha yüksekti (Tablo 7).

Tablo 7. Vaka ve kontrol gruplarına göre tedavi kullanımı

	Vaka (n=60)	**Kontrol (n=60)**	**Toplam (n=120)**	**p†**
	n(%)	**n(%)**	**n(%)**	
Antiviral kullanımı	19 (31,7)	49 (81,7)	68 (56,7)	**<0,001****
IFN ve NA kullanımı	6 (10)	14 (23,3)	20 (16,7)	**0,042***
Sadece NA kullanımı	13 (21,7)	34 (56,7)	47 (39,2)	**<0,001****
Sadece IFN kullanımı	-	1 (1,7)	1 (0,8)	0,315
	Med (25-75th)	**Med (25-75th)**	**Med (25-75th)**	**p‡**
IFN ve NA kullanımı (yıl)	9,5 (6,25-12)	16,8 (13,3-24,1)	15 (10,5-21)	**0,011****
Sadece NA kullanımı (yıl)	5,5 (3,75-8)	9 (6-15)	7 (5-13,5)	**0,01***

*p<0,05, **p<0,01, †: Ki-kare, ‡: Mann Whitney U

4.2. IP-10 Polimorfizmlerinin Görülme Sıklığı

Çalışmamızda Sanger sekanslama ile promoter bölgede yer alan c.-135C>T polimorfizmi yanında exon 2 bölgesinde yer alan c.85C>T ve c.83T>G polimorfizmleri de saptanmıştır.

4.2.1. c.-135C>T Polimorfizmi Genotip ve Allel Sıklığı

HBsAg kaybı olmuş kronik HBV ile enfekte vaka grubu ile HBsAg pozitifliği devam eden kontrol grubu c.-135C>T polimorfizmi allel frekansı ve genotipler yönünden karşılaştırıldı. Vaka grubunda C alleli 55 (% 96,5), T alleli 20 (%35,1) saptanırken, kontrol grubunda C alleli 54 (% 93,1), T alleli 14 (% 24,1), A alleli 1 (% 1,7) saptandı. Genotiplere bakıldığında vaka grubunda CC genotipi 37 (% 61,7), CT genotipi 18 (% 30), TT genotipi 2 (% 3,3) hastada saptanmış iken, kontrol grubunda CC genotipi 41 (% 68,3), CT genotipi 12 (% 20), TT genotipi 4 (% 6,7), CA genotipi 1 (%1,7) hastada saptandı. Vaka ve kontrol grubu allel frekansı ve genotipler yönünden karşılaştırıldığında anlamlı farklılık olmadığı tespit edildi (p>0,05) (Tablo 8).

4.2.2. c.85C>T Polimorfizmi Genotip ve Allel Sıklığı

Vaka ve kontrol grubu c.85C>T polimorfizmi allel frekansları açısından karşılaştırıldığında vaka grubunda C alleli 56 (% 100), T alleli 1 (% 1,8) görülürken, kontrol grubunda C alleli 58 (% 100), T alleli 3 (% 5,2) görüldü. Genotiplere bakıldığında vaka grubunda CC genotipi 55 (% 91,7), CT genotipi 1 (% 1,7), kontrol grubunda CC genotipi 55 (% 91,7), CT genotipi 3 (% 5) hastada saptandı. Allel

frekansları ve genotipler açısından vaka ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık yoktu (p>0,05) (Tablo 8).

4.2.3. c.83T>G Polimorfizmi Genotip ve Allel Sıklığı

Gruplar c.83T>G polimorfizmi allel frekansı ve genotipler açısından karşılaştırıldı. Vaka grubunda T alleli 56 (% 100), G alleli 6 (% 10,7) iken kontrol grubunda T alleli 58 (% 100), G alleli 4 (% 6,9) idi. Genotiplere bakıldığında vaka grubunda TT genotipi 50 (% 83,3) hastada, TG genotipi 6 (% 10) hastada gözlenirken, kontrol grubunda TT genotipi 54 (% 90) hastada, TG genotipi 4 (% 6,7) hastada gözlendi. Gruplar arasında allel frekansları ve genotiplerin dağılımının farklı olmadığı tespit edildi (p>0,05) (Tablo 8).

Tablo 8. Vaka ve kontrol grubunun allel ve genotip dağılımı

	Vaka (n=60)	**Kontrol (n=60)**	**Toplam (n=120)**	**p†**
	n(%)	**n(%)**	**n(%)**	
c.-135C>T				
C alleli	55 (96,5)	54 (93,1)	109 (94,8)	0,414
T alleli	20 (35,1)	14 (24,1)	34 (29,6)	0,198
A alleli	-	1 (1,7)	1 (0,9)	0,319
c.85C>T				
C alleli	56 (100)	58 (100)	114 (100)	-
T alleli	1 (1,8)	3 (5,2)	4 (3,5)	0,326
c.83T>G				
T alleli	56 (100)	58 (100)	114 (100)	-
G alleli	6 (10,7)	4 (6,9)	10 (8,8)	0,471
c.-135C>T genotipi(CC/CT/TT)				
CC	37 (61,7)	41 (68,3)	78 (65)	0,513
CT	18 (30)	12 (20)	30 (25)	
TT	2 (3,3)	4 (6,7)	6 (5)	
CA	-	1 (1,7)	1 (0,8)	
Yok	3 (5)	2 (3,3)	5 (4,2)	
c.85C>T genotipi (CC/CT)				
CC	55 (91,7)	55 (91,7)	110 (91,7)	0,435
CT	1 (1,7)	3 (5)	4 (3,3)	
Yok	4 (6,7)	2 (3,3)	6 (5)	
c.83T>G genotipi (TT/TG)				
TT	50 (83,3)	54 (90)	104 (86,7)	0,543
TG	6 (10)	4 (6,7)	10 (8,3)	
Yok	4 (6,7)	2 (3,3)	6 (5)	

*p<0,05, **p<0,01, †: Ki-kare

5. TARTIŞMA

Kronik hepatit B, dünya çapında HCC, sirotik komplikasyonlar ve karaciğerle ilişkili ölümün önde gelen sebeplerinden biri olması nedeniyle hala önemini koruyan bir enfeksiyon hastalığıdır. Konağın immün sistemi, HBV enfeksiyonu takibinde persistans veya klirens gelişiminin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Proinflamatuvar yanıtta yer alan önemli kemokinlerden biri de IP-10 molekülüdür. Çalışmamızda kronik HBV ile takipli hastalarda HBsAg kaybı ile IP-10 molekülünün promoter, exon 1, intron 1, exon 2 bölgesindeki polimorfizmler arasındaki ilişkili araştırılmıştır. Bu amaçla HBsAg kaybına katkıda bulunabilecek tanı anındaki yaş, VKİ, bulaş yolu, komorbid hastalıklar, HBsAg düzeyi, HBV DNA düzeyi, ALT düzeyi, HBeAg serolojisi, hepatosteatoz, fibrozis, antiviral tedavi gibi faktörlere de bakılmıştır.

Spontan HBsAg klirens oranları, incelenen kohort grubuna ve dahil edilme kriterlerine bağlı olarak yılda % 0,5 ila % 2,26 arasında değişmektedir. Yüksek ve düşük prevalanslı bölgelerde sırasıyla % 0,1 ila % 0,8 ve % 0,4 ila % 2 oranında yıllık klirens oranları bildirilmiştir. Alaska'dan yapılan bir çalışma, yıllık spontan HBsAg klirens oranını % 0,5 bulmuştur. Sadece inaktif HBV taşıyıcılarını değerlendiren Tayvan'da yapılan bir çalışma, yıllık HBsAg serokonversiyon oranını % 1,15 olarak göstermiştir. Buna karşılık, daha yaşlı hastaları (ortalama yaş 50) içeren Güney Kore'den bir çalışmada yıllık HBsAg seroklirens oranı % 2,69 olarak bildirilmiştir. 184 hastadan oluşan bir grubun 66,2 ay boyunca takip edildiği Brezilya'dan bir çalışmada ise spontan HBsAg klirensinin yıllık oranı % 2,1 bulunmuştur.[50] 55 çalışmanın dahil edildiği 45 binden fazla hastanın değerlendirildiği Zhou ve ark. yaptığı meta-analizde birleştirilmiş yıllık spontan HBsAg klirens oranı % 1,13 bulunmuştur. Fakat bu meta-analize sadece tedavi naif hastaların olduğu çalışmalar dahil edilmemiş, aynı zamanda tedavi kullanım oranı % 10'un altında olan çalışmalar da alınmıştır (10 çalışmada antiviral kullanımı vardır, 17 çalışmada tedavi durumu net değildir).[68] 42588 kronik HBV hastasını içeren 34 çalışmanın meta-analizinin yapıldığı Yeo ve ark. çalışmasında yıllık HBsAg klirens oranının % 0,15 ile % 3,02 arasında değiştiği bulunmuştur. Birleştirilmiş yıllık klirens oranı da % 1,02'dir.[49] Bu meta-analizde hastaların tedavi geçmişine bakılmaksızın çalışmalar dahil edilmiştir. Araştırmamızda da bu çalışma ile benzer şekilde tedavi geçmişine bakılmaksızın hastalar alındı. Çalışmamızda yıllık HBsAg kaybı oranı veri

eksikliğinden dolayı hesaplanamadı ancak 2005-2022 yılları arasındaki genel HBsAg kaybı oranı % 5,33 olarak bulundu.

Chu ve ark. 2007'de Tayvan'daki 1965 inaktif HBsAg taşıyıcısı üzerinde yaptığı çalışma, HBsAg klirensi kümülatif olasılığının 10 yıl sonra % 8,1 olduğunu, ancak 20 ve 25 yıllık takipte orantısız bir şekilde sırasıyla %24,9 ve %44,7'ye yükseldiğini göstermiştir. Bu veriler HBsAg klirensinin daha uzun (>10 yıl) takip sonrasında hızlanabileceğini göstermektedir.[47] Buechter ve ark. 371 kronik HBV hastasında yaptıkları çalışmada tanıdan serokonversiyona kadar geçen ortalama zaman aralığını 146 ay olarak saptamışlardır.[69] Araştırmamızda ise vaka grubunda yer alan hastalarda HBsAg negatifleşme süresi 15,0±7,3 yıldı ve 39 hasta (% 65) 10 yıldan sonra klirens sağlamıştı. Bu bulgular bu 2 çalışmayı destekler nitelikteydi.

Önceki çalışmalarda ilerleyen yaşın spontan HBsAg klirensi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.[70] Ferreira ve ark. 548 kronik HBV hastasını dahil ettikleri araştırmalarında 40 yaş üzerini HBsAg kaybıyla ilişkilendirmişlerdir (HBsAg kaybı olan vakaların % 67,5'inde 40 yaşından sonra kayıp meydana gelmiş).[50] Çin'de yapılan Yuen ve ark. 1975 ve 2001 yılları arasında 3843 kronik HBV hastasını takip ettikleri araştırmada ortalama HBsAg seroklirens yaşı 48,8 (±13,81) yıl olarak bulunmuştur.[71] Simonetti ve ark. Alaska popülasyonunda kronik HBV enfeksiyonu olan 1271 hastada yürüttükleri, 19,6 yıl takip süresi olan ve HBsAg kaybı ile ilişkili faktörleri araştırdıkları prospektif çalışmada HBsAg'nin temizlenmesi ile ilerleyen yaşın ilişkili olduğunu bulmuşlardır.[72] Bu bulgular ile bizim bulgularımız paralel yönde olup çalışmamızda vaka grubunda HBsAg kaybı yaş ortalaması 53,2±11,3 idi ve 51 (%85) hastada 40 yaşın üzerindeyken HBsAg kaybı olmuştu. Manno ve ark. Kuzey İtalya bölgesinde, 296 kronik HBV taşıyıcısını dahil ettiği ve takip süresinin 30 yıl olduğu çalışmada tanı anındaki daha ileri yaşın HBsAg klirensiyle anlamlı şekilde ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada hastaların başlangıçtaki yaş ortalaması, HBsAg pozitif kalan hastalar ile HBsAg klirensi olan hastalar arasında anlamlı şekilde farklılık gösteren tek demografik özellikti (HBsAg negatifleşen grup, 38±8 yıl; HBsAg pozitif devam eden grup, 34±9 yıl).[73] Biz de tanı anındaki yaş ortalamasını vaka grubunda daha ileri bulduk (HBsAg negatifleşen grup, 38,1±12,0 yıl; HBsAg pozitif devam eden grup, 34,9±14,5 yıl), ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Ferreira ve ark. çalışmasında spontan HBsAg kaybı olmayan grupta, kayıp olan gruba göre vertikal bulaş daha fazla gözlenmişken aradaki fark istatistiksel anlamlı bulunmamıştır.[50] Bizim çalışmamızda da her 2 grupta vertikal bulaş yolu açısından farklılık gözlenmedi.

2385 Tayvan'lı erkek HBsAg pozitif hastanın dahil edildiği, 1992 ve 2019 yılları arasında takip edilen hastalardan oluşan çalışmada hepatosteatozun olması, VKİ ≥ 25 kg/m2 olması daha yüksek HBsAg klirensiyle ilişkili bulunmuştur.[74] Liu ve ark. yürüttüğü 3087 kronik HBV hastasının katıldığı prospektif bir çalışmada obezitenin (VKİ≥ 30kg/m2) HBsAg seroklirensinin anlamlı bir öngörücüsü olduğu bulunmuştur. Daha ileri analiz yapıldığında erkeklerde yaştan bağımsız olarak tek başına önemli bir öngörücü olduğu gösterilmiştir.[75] Chu ve ark. 155 hastanın bulunduğu çalışmada HBsAg taşıyıcılarında vücut kitle indeksinin artmasının ve hepatosteatozun HBsAg seroklirensini yaklaşık 5 yıl hızlandırabileceğini bulmuşlardır. Bu çalışmada hepatosteatozu olan hastalar arasında, HBsAg seroklirens yaşı şiddetli hepatosteatozu (grade 3) olan hastalarda, orta şiddette (grade 2) hepatosteatozu olanlara göre daha düşük olma eğilimindeydi, ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.[76] Li ve ark. 6786 yetişkin kronik HBV hastasını kapsayan retrospektif kohort çalışmasında hepatosteatozu daha yüksek HBsAg seroklirensi ile önemli ölçüde ilişkili bulmuşlardır.[77] Çalışmamızda VKİ, HBsAg kaybı olan ve olmayan grupta benzerdi ve HBsAg klirensi ile ilişkili bulunmadı. Hepatosteatoza baktığımızda ise hepatosteatoz vaka ve kontrol grubunda benzer sayıda hastada saptanmıştı. Hepatosteatoz derecesine göre değerlendirdiğimizde vaka grubunda grade 2 hepatosteatoz oranı daha yüksek iken grade 1 ve 3 hepatosteatoz oranı kontrol grubunda daha yüksekti ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu çelişkili sonucun hasta sayımızın özellikle grade 3 hepatosteatozu olan hasta sayımızın az olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Önceki çalışmalar bazal HBsAg seviyesinin düşük olmasının HBsAg klirensini öngördüğünü göstermiştir.[49] 844 kronik HBV hastasının alındığı, kesitsel, çok merkezli, retrospektif bir Kanada çalışmasında, HBsAg kaybı olan hastaların HBsAg klirensinden önceki 1 yıl içinde düşük seviyede kantitatif HBsAg (<100 IU/mL) değerine sahip olduğu gösterilmiştir.[78] Chien ve ark. 235 HBeAg negatif kronik HBV hastasını dahil ettikleri çalışmalarında HBsAg seroklirensini tahmin etmede en önemli faktörün bazal kantitatif HBsAg olduğunu bulmuşlardır.[79] 2020 yılında yayınlanan Wu ve ark. 14

serokonversiyon olmuş, 70 serokonversiyon olmamış kronik HBV hastasını dahil ettikleri vaka-kontrol çalışmasında kantitatif HBsAg titrelerinin HBsAg serokonversiyonunu tahmin edebileceği bulunmuştur. Bu çalışmaya göre serokonversiyonun en önemli öngörücüleri, HBsAg titresinin <1000 IU/mL olması ve düşük bazal ALT değeridir.[80] Çin'li kalıcı virolojik yanıta ulaşmış 272 kronik HBV hastası üzerinde yapılan, takip süresi 6 yıl olan Ruan ve ark. prospektif çalışmasında antiviral tedaviden sonra HBsAg seroklirensine ulaşma olasılığını en fazla arttıran faktörler şöyle bulunmuştur; düşük serum HBsAg düzeylerine, yüksek serum ALT düzeylerine ve düşük serum HBsAg/HBV DNA oranına sahip olunması. Bu araştırmada HBsAg seroklirensi olasılığını tahmin etmek için belirlenen HBsAg cut-off değeri 203,86 IU/ml'ydi. Serum ALT seviyesinin 80 U/l üzerinde olması HBsAg seroklirensi ile önemli ölçüde ilişkiliydi. Hastalar takipten önce tedavi naifti ve tümü takip sırasında antiviral tedavi almıştı. Bu çalışma ile Ruan ve ark. hızlı hücre çoğalma periyodu sırasında uygun antiviral tedavinin, HBsAg seroklirensine ulaşmada yardımcı olabileceği sonucuna ulaşmışlardır.[81] Tseng ve ark. takipte HBeAg serokonversiyonu olan HBeAg pozitif 390 Tayvan'lı hastada yaptıkları prospektif çalışmada erken HBeAg negatif fazda daha düşük HBsAg seviyesini daha yüksek oranda HBsAg kaybıyla ilişkili bulmuşlardır ve HBsAg kaybını öngören cut-off değerini 100 IU/ml altı olarak belirlemişlerdir. HBsAg seroklirensine ulaşan grup ile ulaşmayan grup arasında ALT düzeyleri arasında anlamlı farklılık bulamamışlardır.[82] Buechter ve ark. 371 kronik HBV hastasında yaptıkları retrospektif çalışmada serokonversiyon oranlarını, düşük HBV DNA ve düşük kantitatif HBsAg titreleri olan hastalarda daha yüksek izlemişlerdir. Serokonversiyon açısından en iyi cut-off değeri HBV DNA için 357 IU/mL ve HBsAg için 33,55 IU/mL idi. ALT düzeyi ise serokonversiyon ile ilişkili bulunmamıştı.[69] Bizim çalışmamızda ise literatürle uyumlu olarak kantitatif olmayan yöntem ile bakılan bazal ve takipteki en yüksek HBsAg değeri HBsAg kaybı olan grupta daha düşüktü ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Daha ileri analizlerde bazal HBsAg'nin HBsAg negatifleşmesini öngörebilmesi için cut-off değeri $\leq$1559 S/CO (%77,2 AUC, % 58,33 duyarlılık, % 86,67 özgüllük, p<0,001) olarak tespit edildi. Bu verilere dayanarak kantitatif yöntemle bakılmayan düşük bazal HBsAg değerinin de HBsAg kaybını öngörmede kullanılabilmesi düşünülebilir. Literatürde ALT düzeyi ile HBsAg klirensi arasındaki ilişki açısından çalışmalar arasında tutarlı sonuçlar

yoktu; bazı çalışmalarda düşük ALT, bazılarında yüksek ALT seviyesi HBsAg klirensi ile ilişkili bulunmuştu. Bazı çalışmalarda ise bizim çalışmamızla benzer şekilde ALT değerleri açısından fark saptanmamıştı.

Liu ve ark. Tayvan'da tedavi öyküsü olmayan 3087 kronik HBV hastasını dahil ettikleri ve ortalama 8 yıl takip yaptıkları çalışmada başlangıç ve takipteki HBV DNA düzeylerini seroklirensin en önemli öngörücüsü olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada daha yüksek HBV viral yükleri daha düşük HBsAg seroklirens oranlarına neden olmuştur. 10.000 kopya/mL ve üzeri bazal HBV DNA'ya sahip kronik taşıyıcılar için, takipteki viral yükte önemli bir azalma HBsAg seroklirens insidansında 4 kat artışla ilişkilendirilmiştir.[75] Kwak ve ark. Güney Kore popülasyonunda bazal HBeAg negatif 880 kronik HBV hastasında yaptıkları çalışmada bazal HBV DNA seviyesinin <2000 IU/ml olmasını HBsAg kaybı ile ilişkili bulmuşlardır.[83] Tayvan'da kronik HBV enfeksiyonunun progresyonundaki risk faktörlerini değerlendirmek için toplum tabanlı prospektif bir kohort çalışması yürütülmüştür. 1991-1992 yıllarında toplam 23820 katılımcı kaydedilmiştir. HBsAg için seropozitif ve anti-HCV için seronegatif olan 3653 katılımcıdan oluşan bir alt grup REVEAL-HBV çalışmasına dahil edilmiştir. Bu çalışmada HBsAg seroklirensi, düşük serum HBV DNA düzeyi (<100.000 ile ≥100.000 kopya/mL karşılaştırıldığında) ile önemli ölçüde ilişkili bulunmuştur.[33] Ülkemizde yapılan 1427 hastanın değerlendirildiği retrospektif bir çalışmada sürekli düşük HBV DNA düzeyinin spontan HBsAg seroklirensinin önemli bir öngörücüsü olduğu gösterilmiştir.[84] Çalışmamızda bazal HBV DNA ortalamasının vaka grubunda, kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gözlenmesine karşın, aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. Bu durum hasta sayımızın geniş çaplı çalışmalara göre daha az olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bununla beraber takipteki maksimum HBV DNA düzeyinin vaka grubunda istatistiksel olarak anlamlı sayılacak düzeyde daha düşük olması literatürdeki verilerle tutarlıydı.

Vertikal bulaşı olan Asya'lılarda yapılan çalışmalarda HBeAg negatifliği HBsAg klirensinin öngörücüsü olarak bulunmuştur. Bu çalışmalar nispeten kısa takip süresine (4-12 yıl) sahiptir. Horizontal geçişli kronik HBV enfeksiyonunun serolojik ve klinik sonuçlarının araştırıldığı bir Yeni Zelanda çalışmasında 572 hasta 28 yıl boyunca takip edilmiştir ve HBsAg kaybı artan yaş ve başlangıç HBeAg negatif durumla ilişkilendirilmiştir.[85] HBeAg serolojisinin daha ayrıntılı değerlendirildiği Habersetzer ve

ark. Fransa'da yaptıkları gerçek yaşam kohortunda bu çalışmadan farklı sonuçlar elde edilmiştir. Habersetzer ve ark. 315 kronik HBV hastasını 6 yıl takip etmiş ve inaktif HBsAg taşıyıcısı olmanın (HBeAg negatif, normal ALT, düşük HBV DNA seviyeleri) HBsAg temizlenmesi ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bazal HBeAg durumu ile ilişkili bulmamışlardır. Ancak subgrup analizinde bazal HBeAg pozitifliğinin kronik aktif hepatit (HBV DNA'sının >2000/20000 IU/ml ve/veya ALT seviyelerinin normalin üzerinde olması ve kronik hepatit belirtileri olarak tanımlanmıştır) grubunda HBsAg kaybını tahmin ettiğini bulmuşlardır. HBeAg pozitif kronik aktif hepatitli hastalar, tedavi edilmiş veya edilmemiş olsun, HBeAg negatif kronik aktif hepatitli hastalara göre daha yüksek HBsAg klirens oranlarına ulaşmıştır.[86] Zhou ve ark. yaptığı meta-analizde, yıllık HBsAg kaybı oranı HBeAg-negatif ve HBeAg-pozitif kohortlarda sırasıyla % 1,36'e karşı % 0,74 olarak bulunmuştur. Vertikal bulaşmanın baskın olduğu Doğu Asya'da, HBeAg serokonversiyonu genellikle 2. ila 3. dekatta meydana gelir ve HBsAg kaybı oranları 5. dekatta zirveye ulaşır, bu da genellikle kayıptan önce en az 10-20 yıllık hastalık inaktivitesinin olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, HBeAg negatif kohortlarla benzer HBsAg kaybı oranlarına ulaşması için HBeAg pozitif kohortlarda takip süresinin çok daha uzun olması gerekir.[68] Bu durum farklı çalışmalardaki farklı sonuçları açıklayabilir. Çalışmamızda da literatürdeki birçok çalışma ile benzer şekilde bazal HBeAg negatifliği HBsAg klirensi olan grupta daha yüksekti. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Başlangıçta HBeAg negatif olan 1 hastamızda takip sırasında HBeAg seroreversiyonu olmuştu. Bu hastanın sonuçları ayrıntılı olarak incelendiğinde immünsupresyon yaratacak bir durum olmadığı, entekavir tedavisi kesildikten sonra seroreversiyon gerçekleştiği görüldü.

HBsAg kaybı, Asya'lı hastalarda mevcut tedavilerle nadiren elde edilir. En yüksek HBsAg kaybı oranı, 1 yıl boyunca Peg-IFN alan HBeAg pozitif hastalarda görülür ve uzun yıllar NA ile tedavi edilen HBeAg negatif hastalarda daha düşük oranda görülür. Entekavir, TDF veya TAF (Tenofovir alafenamid fumarat) ile uzun süreli tedavi sırasında, HBeAg pozitif ve HBeAg negatif hastaların büyük çoğunluğunda HBV DNA tespit edilemez hale gelir. NA tedavisi sırasında HBeAg serokonversiyonu, 4-5 yıllık sürekli tedaviden sonra HBeAg pozitif hastaların % 40-50'sinde meydana gelir. Ancak, HBsAg ve cccDNA NA'lardan asgari düzeyde etkilenir. NA'larla yıllık HBsAg kaybı oranının % 1'in oldukça altında olduğu tahmin edilmektedir.[45] Kwak ve ark. Güney

Kore popülasyonunda bazal HBeAg negatif 880 kronik HBV hastası üzerinde yaptıkları çalışmada antiviral ajan kullanımının HBsAg seroklirensi üzerinde etkisi olup olmadığını da araştırmışlardır. Hem inaktif fazda olan hem de HBeAg negatif hepatit fazında olan hastalardan takip süresince antiviral kullanan ve tedavi naif grup arasında HBsAg kaybı açısından fark bulamamışlardır. Antiviral ajanların etkisinin olmamasının antiviral ajanların enfekte hepatositlerde HBV protein ekspresyonunu azaltması; bu nedenle sitotoksik T hücrelerinin virüsle enfekte hücreleri tanımaması, sonuç olarak HBV içeren hücrelerin sitolizinin azalması, bu nedenle cccDNA'nın enfekte hepatositlerde kalıcı olarak bulunması ve bunun da kalıcı HBsAg üretimini sağlamasından kaynaklanabileceğini düşünmüşlerdir.[83] Marcellin ve ark. yürüttüğü açık etiketli çok uluslu çalışmada kronik HBV'li 740 hasta rastgele 48 hafta boyunca TDF artı Peg-IFN (grup A), 16 hafta boyunca TDF artı Peg-IFN, ardından 32 hafta boyunca TDF (grup B), 120 hafta boyunca TDF (grup C) ve 48 hafta boyunca Peg-IFN (grup D) alanlar olarak gruplara ayrılmıştır. 48 hafta boyunca TDF artı Peg-IFN ile kombinasyon tedavisinin, her iki monoterapiden daha yüksek oranda HBsAg kaybını sağladığı gösterilmiştir.[87] Yang ve ark. 144 kronik HBV hastasını dahil ettikleri prospektif randomize kontrollü çalışmada entekavir monoterapisi ile entekavir üzerine 26 haftalık Peg-IFN ekledikleri grupları 2 yıllık tedaviden sonra tedavi etkinliği açısından karşılaştırmışlardır. Kombinasyon tedavisinin, sürekli virolojik baskılanma, HBsAg/HBeAg klirensi ve serokonversiyon açısından entekavir monoterapisinden daha iyi etkinliğe sahip olmadığını bulmuşlardır.[88] Yip ve ark. tarafından yapılan retrospektif kohort çalışması, 6 aydan uzun süre Entekavir ve/veya TDF ile tedavi edilen 20263 kronik HBV hastasında ortalama 4,8 yıllık bir takip sonrasında HBsAg temizleme oranını % 2,1 olarak bildirmiştir.[89] Hsu ve ark. 23 merkezden tedavi öyküsü olmayan 7697 hastayı dahil ettikleri ve entekavir veya TDF'in fonksiyonel küre etkisini araştırdıkları prospektif kohort çalışmasında entekavir ile TDF arasında HBsAg seroklirensi açısından anlamlı fark bulamamışlardır. Bu çalışmada 8 yıllık kümülatif HBsAg klirens insidansı entekavir ile %1,69 ve TDF ile %1,34 olarak tespit edilmiştir.[90] Hsu ve ark 4769 hastayı içeren Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'dan gerçek dünya verilerine sahip çok merkezli başka bir kohort çalışmasında, entekavir veya TDF tedavisi gören kronik HBV'li hastalarda HBsAg seroklirensinin yıllık insidansını % 0,22, 10 yıllık kümülatif insidansını % 2,11 bulmuşlardır.[91] Geniş çaplı çalışmalarda

bile günümüzde birinci sıra tedaviler olan entekavir ve TDF tedavisiyle oluşan HBsAg klirensinin spontan HBsAg klirensi ile benzer veya daha düşük oranlarda geliştiğini görmekteyiz. Bizim çalışmamızda da HBsAg klirensi olan gruptaki hastaların çoğu (%68,3) tedavi naif hastalardı. HBsAg klirensi olmayan grupta tedavi kullanma oranı klirens olan gruba göre daha yüksekti ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı. İlaçların ayrıntılı değerlendirilmesinde ise vaka grubunda IFN ve NA, sadece NA kullanımı daha az oranda görüldü. Ayrıca IFN ve NA kullanım süresi, sadece NA kullanım süresi de vaka grubunda istatistiksel anlamlı sayılacak şekilde daha düşüktü. Çalışmamızda literatürle benzer olarak antiviral ilaç kullanımı HBsAg kaybı ile ilişkili bulunmamıştır hatta antiviral kullanan grupta seroklirens daha az gözlenmiştir. Bu durum, mevcut antiviraller özellikle NA'lar ile tedavinin, viral yükü baskılayıp virüse karşı immün sistem cevabını azaltarak enfekte hücrelerin yok edilememesine ve sonuç olarak HBsAg üretiminin devam etmesine bağlanabilir.

IP-10 geninin promoter bölgesinde -135G/A dahil olmak üzere çeşitli polimorfizmler rapor edilmiştir. Bazı veriler, bu bölgedeki SNP'lerin, serebral sıtma (Wilson ve ark. 2013), akciğer tüberkülozu (Taheri ve ark. 2013) ve tüberküloz plörezinin (Sheikh ve ark. 2013) neden olduğu çeşitli bulaşıcı hastalıkların şiddeti ile ilişkili olduğu hipotezini desteklemektedir. Birçok bağımsız çalışma, yüksek IP-10 serum seviyelerinin, kronik HCV enfeksiyonu olan ve tedaviye zayıf yanıt veren hastalarda karaciğerdeki histopatolojik tutulumun ciddiyetini öngördüğünü göstermiştir. IP-10'un promotör bölgesindeki dizi varyasyonları, nükleer proteinin bağlanma afinitesini etkileyebilir, dolayısıyla IP-10 ekspresyonunu değiştirebilir ve viral enfeksiyonu olan hastalarda karaciğer hasarını ve hastalığın ilerlemesini etkileyebilir. Talaat ve ark. Mısır'lı 175 kronik HCV hastasını dahil ettikleri çalışmada IP-10 (−135G/A, −1447A/G) polimorfizmlerinin hastalık progresyonu ile ilişkili olmadığını bulmuşlardır.[59] Buna karşın Thanapirom ve ark. 602 Tayland'lı kronik HCV hastasında yaptığı çalışmada IP-10'un -135G/A polimorfizminin Peg-IFN-α tedavisine verilen kalıcı virolojik yanıtta önemli bir rol oynadığını bildirmiştir.[92] 2009 yılında yayınlanan Çin'de yapılan bir çalışmada -135G/A polimorfizminin tüberküloz hastalığı için potansiyel koruyucu bir polimorfizm olduğu gösterilmiştir.[93]

Deng ve ark. Çin'li 2400 kronik HBV hastası üzerinde yaptıkları ve IP-10 genindeki polimorfizmlerin kronik HBV enfeksiyonunda karaciğer hasarını ve hastalık

ilerlemesini etkileyip etkilemediğini araştırdıkları çalışmada, IP-10 geninin promotör bölgesinde bulunan G-201A polimorfizminin -201A alel taşıyıcılarının (-201G/A ve -201A/A genotipleri) erkek HBV taşıyıcılarında hastalık ilerlemesine yatkınlıkla ilişkili olduğunu bulmuşlardır. G-201A polimorfizminin nükleer proteinin bağlanma afinitesini değiştirip IP-10 ekspresyonunu düzenlediğini göstermişlerdir. Ayrıca hastalığa duyarlı genotiplerin yani -201G/A ve -201A/A'nın, -201G/G genotipine kıyasla IFN-γ ile uyarılmış periferik kan mononükleer hücrelerinde ve karaciğer dokularında daha yüksek IP-10 seviyelerine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.[94] Limothai ve ark. Tayland'lı 107 HBeAg pozitif kronik HBV'li hastada IP-10 polimorfizmleri ile Peg-IFN tedavisine yanıt arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmada G-201A polimorfizmini Peg-IFN'ye verilen virolojik yanıt ve HBsAg düşüşü ile ilişkili bulmuşlardır. GG genotipli hastalar, GG olmayan (GA, AA) genotipli hastalara kıyasla daha yüksek virolojik yanıt oranlarına ve daha fazla düşük HBsAg (<100 IU/ml) düzeyine ulaşmışlardır. Ancak GG ve GG olmayan genotiplere sahip hastalar arasında HBsAg klirens oranında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca GG genotip grubunun ortalama bazal serum IP-10 seviyesi, GG olmayan genotip grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı sayılacak düzeyde daha yüksek bulunmuştur.[62] Xu ve ark. Çin'li 577 kronik HBV hastası ve 275 sağlıklı kontrolden oluşan çalışmada IP-10 geninin promotör bölgesindeki G-201A polimorfizminin, IP-10 ekspresyonunu yukarı düzenleyerek HBV enfeksiyonlu hastalarda karaciğer hastalığının ilerlemesiyle ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada A allel sıklığı şiddetli hastalığı olanlarda daha yüksekti ve AA genotipinde GG genotipine göre periferik kan mononükleer hücrelerinde IP-10 transkripsiyonu daha yüksekti.[95] Önceki birkaç çalışmada c.-135C>T polimorfizminin HCV'de hastalık progresyonu, HBV'de hastalık progresyonu ve HBsAg düşüşü üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Ancak direkt HBsAg klirensi ile ilişkisini değerlendiren çalışmaya rastlanmamıştır. Sadece bir çalışmada bu polimorfizmin Peg-IFN tedavisi sırasında HBsAg kaybı üzerindeki etkisi araştırılmış ve ilişkili bulunmamıştır. Çalışmamızda ise bu polimorfizmin doğrudan HBsAg kaybı ile ilişkisi araştırılmış ve vaka-kontrol grupları arasında c.-135C>T polimorfizmi allel sıklığı ve genotipleri açısından fark bulunmamıştır, HBsAg kaybı ile ilişkilendirilmemiştir. Ayrıca kontrol grubunda bir hastada ilginç olarak CA genotipi gözlenmiştir ve bu genotip daha önce hiç bildirilmemiştir.

Literatüre bakıldığında IP-10 genindeki c.85C>T polimorfizmine, kanser ve inflamasyonun olduğu durumlarda, protein biyobelirteçlerin dolaşımdaki seviyeleri üzerine genetik, klinik ve yaşam tarzı faktörlerinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada rastlanmıştır.[96] Çalışmamızda c.85C>T ve c.83T>G polimorfizmleri HBsAg kaybı açısından anlamlı bulunmamıştır. Daha önce literatürde c.83T>G polimorfizmi ile ilgili çalışma yayınlanmamıştır, klinik önemi bilinmemektedir. Araştırmamızın HBV enfeksiyonu olan hastalarda c.85C>T ve c.83T>G polimorfizmlerini inceleyen ilk çalışma olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamız kronik hepatit B enfeksiyonunda IP-10 promoter bölge polimorfizmleri ile viral klirens ilişkisini araştıran gözlemsel, tek merkezli bir vaka-kontrol çalışmasıdır. Sanger sekanslama ile promoter bölgede yer alan c.-135C>T polimorfizmi yanında exon 2 bölgesinde yer alan c.85C>T ve c.83T>G polimorfizmleri de saptanmıştır. Bu polimorfizmlerin genotip ve allel sıklığı ile HBsAg klirensi arasında ilişki saptanmamıştır. Bunun dışında vaka ve kontrol grupları tanı anındaki yaş, VKİ, bulaş yolu, komorbid hastalıklar, HBsAg düzeyi, HBV DNA düzeyi, ALT düzeyi, HBeAg, hepatosteatoz, fibrozis, antiviral tedavi açısından da karşılaştırılmıştır. Bazal ve takipteki maksimum HBsAg seviyesinin düşük olmasının, takipteki maksimum HBV DNA'nın düşük olmasının, bazal HBeAg seronegatifliğinin, grade 2 hepatosteatozun ve antiviral tedavi kullanmamanın HBsAg kaybını öngörebileceği bulunmuştur. Bunların yanında HBsAg kaybını öngörebilecek bazal HBsAg cut-off değeri belirlenmiştir ($\leq$1559 S/CO).

Kronik hepatit B hastalarında HBsAg kaybı ile c.-135C>T, c.85C>T ve c.83T>G polimorfizmlerinin ilişkisini araştıran ilk çalışma olması, her 2 hasta grubunun benzer demografik özellikler, bulaş yolu, kronik hastalıklar göstermesi çalışmanın şüphesiz güçlü yanlarıdır. Hasta laboratuvar sonuçları, biyopsi sonuçları, radyolojik sonuçlarının retrospektif elde edilmesi nedeniyle veri kayıplarının olması, tanımlanan tarih aralığındaki HBsAg kaybı olan tüm hastalara ulaşılamaması ve hastaların ilaç kullanımına göre sınıflandırılmadan çalışmaya dahil edilmesi yanlılığı arttırabileceğinden bu çalışmanın zayıf yönleridir.

IP-10 promoter bölge polimorfizmlerinden bazılarının HBV ve HCV enfeksiyonu progresyonu ile ilişkisini açıklayan sınırlı sayıda çalışma olmasına rağmen doğrudan HBsAg kaybıyla ilişkisini araştıran çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız IP-10 promoter bölgesinde yer alan c.-135C>T polimorfizmininin HBsAg kaybı ile ilişkisini araştırması nedeniyle önemli bir çalışmadır. Ayrıca exon 2 bölgesinde yer alan c.85C>T polimorfizmi daha önce hepatit B'de çalışılmamış olması, c.83T>G polimorfizmi ise daha önce yayınlanmış çalışmasının olmaması açısından önem taşımaktadır. IP-10 promoter bölge polimorfizmleri ile IP-10 seviyelerinin HBsAg klirensi üzerindeki

etkisini beraber açıklayacak veya bu polimorfizmlerin tedavi yanıtları üzerindeki etkisini araştıracak geniş çaplı yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. **WHO.** Geneva, Hepatitis B. **2024,** https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b, Erişim tarihi: 13.06.2024

2. **Demirtürk N, Köse A, Ural O, et al.** Management of chronic hepatitis B infection: A consensus report of the Study Group for Viral Hepatitis of the Turkish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases-2023 Update. *Klimik Derg.* **2023;** 36(1):1-22.

3. **Trépo C, Chan HL, Lok A.** Hepatitis B virus infection. *Lancet*. **2014;** 384(9959):2053-2063.

4. **Zhu L, Zhai X, Wang Q, et al.** Incidence and determinants of spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance and seroconversion in hepatitis B e antigen-negative chronic infection patients: A population-based prospective cohort. *J Viral Hepat*. **2018;** 25(12):1588-1598.

5. **Seto WK, Wong DK, Kopaniszen M, et al.** HLA-DP and IL28B polymorphisms: influence of host genome on hepatitis B surface antigen seroclearance in chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis*. **2013;** 56(12):1695-1703.

6. **Zhong S, Zhang T, Tang L, Li Y.** Cytokines and Chemokines in HBV Infection. *Front Mol Biosci*. **2021;** 8:805625.

7. **Zeng F.** Epidemiology of hepatitis B virus infection: results from a community-based study of 0.15 million residents in South China. *Scientific reports*. **2016;** 6:36186.

8. **Belopolskaya M.** Chronic hepatitis B in pregnant women: Current trends and approaches. *World J Gastroenterol*. **2021;** 27(23):3279-3289.

9. **Akyıldız M.** Regional Epidemiology, Burden, and Management of Hepatitis B Virus in the Middle East. *Clinical liver disease.* **2020;** 14(6):212-214.

10. **Özkan H.** Epidemiology of Chronic Hepatitis B in Turkey. *Euroasian J Hepatogastroenterol*. **2018;** 8(1):73-74.

11. **Yamazhan T.** HBV Enfeksiyonunun Epidemiyolojisi. Kandemir Ö,Danalıoğlu A. Hepatit B'den D'ye Hep Güncel Klinik El Kitabı. İstanbul: Content Ed Net Türkiye, **2015:**19-20.

12. **Herrscher C.** Hepatitis B Virus Entry into Cells. *Cells*. **2020;** 9(6):1486.

13. **Tütüncü E.** Hepatit B Virüsünün Moleküler Virolojisi. Kandemir Ö, Danalıoğlu A. Hepatit B'den D'ye Hep Güncel Klinik El Kitabı. İstanbul: Content Ed Net, **2015:** 3-5.

14. **Tsai KN.** Mechanisms of Hepatitis B Virus Persistence. *Trends Microbiol*. **2018;** 26(1):33-42.

15. **Valaydon ZS, Locarnini SA.** The virological aspects of hepatitis B. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. **2017;** 31(3):257-264.

16. **Karayiannis P.** Hepatitis B virus: virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread. *Hepatol Int*. **2017;** 11(6):500-508.

17. **Beck J, Nassal M.** Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol*. **2007;** 13(1):48-64.

18. **Lok AS.** Hepatitis B infection: pathogenesis and management. *J Hepatol*. **2000;** 32(1):89-97.

19. **Wu J, Han M, Li J, Yang X, Yang D.** Immunopathogenesis of HBV Infection. *Adv Exp Med Biol*. **2020;** 1179:71-107.

20. **Golsaz-Shirazi F, Shokri F.** Hepatitis B immunopathogenesis and immunotherapy. *Immunotherapy*. **2016;** 8(4):461-477.

21. **Saraceni C, Birk J.** A Review of Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Immunopathogenesis. *J Clin Transl Hepatol*. **2021;** 9(3):409-418.

22. **Chang JJ, Lewin SR.** Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol*. **2007;** 85(1):16-23.

23. **You CR, Lee SW, Jang JW, Yoon SK.** Update on hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. **2014;** 20(37):13293-13305.

24. **Tseng TC, Huang LR.** Immunopathogenesis of Hepatitis B Virus. *J Infect Dis*. **2017;** 216(8):765-770.

25. **Zhong B, Huang MP, Yin GQ, Gao X.** Effects of costimulation on intrahepatic immunopathogenesis in patients with chronic HBV infection. *Inflamm Res*. **2014;** 63(3):217-229.

26. Shimizu Y. T cell immunopathogenesis and immunotherapeutic strategies for chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. **2012;** 18(20):2443-2451.

27. Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney AK, McLachlan A. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero?. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1990;** 87(17):6599-6603.

28. Dandri M, Petersen J. Mechanism of Hepatitis B Virus Persistence in Hepatocytes and Its Carcinogenic Potential. *Clin Infect Dis*. **2016;** 62(4):281-288.

29. Zhao F, Xie X, Tan X, et al. The Functions of Hepatitis B Virus Encoding Proteins: Viral Persistence and Liver Pathogenesis. *Front Immunol*. **2021;** 12:691766.

30. Shi Y, Zheng M. Hepatitis B virus persistence and reactivation. *BMJ*. **2020;** 370:2200.

31. Campos-Valdez M. Molecular Mechanisms during Hepatitis B Infection and the Effects of the Virus Variability. *Viruses*. **2021;** 13(6):1167.

32. European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. **2017;** 67(2):370-398.

33. Chen CJ, Yang HI. Natural history of chronic hepatitis B REVEALed. *J Gastroenterol Hepatol*. **2011;** 26(4):628-638.

34. Su TH, Kao JH. Improving clinical outcomes of chronic hepatitis B virus infection. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. **2015;** 9(2):141-154.

35. Mallet V, Hamed K, Schwarzinger M. Prognosis of patients with chronic hepatitis B in France (2008-2013): A nationwide, observational and hospital-based study, *J Hepatol*. **2017;** 66(3):514-520.

36. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol*. **2008;** 48(2):335-352.

37. Song JE, Kim DY. Diagnosis of hepatitis B. *Ann Transl Med*. **2016;** 4(18):338.

38. Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. *J Hepatol*. **2006;** 44(1):71-76.

39. **Guvenir M, Arikan A.** Hepatitis B Virus: From Diagnosis to Treatment. *Pol J Microbiol*. **2020;** 69(4):391-399.

40. **Song A, Lin X, Chen X.** Functional cure for chronic hepatitis B: accessibility, durability, and prognosis. *Virol J*. **2021;** 18(1):114.

41. **Wong GLH, Gane E, Lok ASF.** How to achieve functional cure of HBV: Stopping NUCs, adding interferon or new drug development?. *J Hepatol*. **2022;** 76(6):1249-1262.

42. **Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, et al.** Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology*. **2018;** 67(4):1560-1599.

43. **Walsh R, Hammond R, Yuen L, et al.** Predicting HBsAg clearance in genotype A chronic hepatitis B using HBsAg epitope profiling: A biomarker for functional cure. *Liver Int*. **2019;** 39(11):2066-2076.

44. **Vaillant A.** HBsAg, Subviral Particles, and Their Clearance in Establishing a Functional Cure of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *ACS Infect Dis*. **2021;** 7(6):1351-1368.

45. **Moini M, Fung S.** HBsAg Loss as a Treatment Endpoint for Chronic HBV Infection: HBV Cure. *Viruses*. **2022;** 14(4):657.

46. **Harkisoen S, Arends JE, van den Hoek A, van Erpecum KJ, Boland GJ, Hoepelman AI.** Low serum hyaluronic acid levels associated with spontaneous HBsAg clearance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **2015;** 34(11):2183-2189.

47. **Chu CM, Liaw YF.** Hepatitis B surface antigen seroclearance during chronic HBV infection. *Antivir Ther*. **2010;** 15(2):133-143.

48. **Liang LY, Wong GL.** Unmet need in chronic hepatitis B management. *Clin Mol Hepatol*. **2019;** 25(2):172-180.

49. **Yeo YH, Ho HJ, Yang HI, et al.** Factors Associated With Rates of HBsAg Seroclearance in Adults With Chronic HBV Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*. **2019;** 156(3):635-646.

50. **Ferreira SC, Chachá SG, Souza FF, et al.** Factors associated with spontaneous HBsAg clearance in chronic hepatitis B patients followed at a university hospital. *Ann Hepatol*. **2014;** 13(6):762-770.

51. Chu CM, Lin DY, Liaw YF. Does increased body mass index with hepatic steatosis contribute to seroclearance of hepatitis B virus (HBV) surface antigen in chronic HBV infection?. *Int J Obes (Lond)*. **2007;** 31(5):871-875.

52. Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodés J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology*. **2002;** 123(6):1848-1856.

53. McMahon BJ, Holck P, Bulkow L, Snowball M. Serologic and clinical outcomes of 1536 Alaska Natives chronically infected with hepatitis B virus. *Ann Intern Med*. **2001;** 135(9):759-768.

54. Martinot-Peignoux M, Lapalus M, Asselah T, Marcellin P. HBsAg quantification: useful for monitoring natural history and treatment outcome. *Liver Int*. **2014;** 34(1):97-107.

55. Yeo YH, Tseng TC, Hosaka T, et al. Incidence, Factors, and Patient-Level Data for Spontaneous HBsAg Seroclearance: A Cohort Study of 11,264 Patients. *Clin Transl Gastroenterol*. **2020;** 11(9):196.

56. Chu CM, Liaw YF. HBsAg seroclearance in asymptomatic carriers of high endemic areas: appreciably high rates during a long-term follow-up. *Hepatology*. **2007;** 45(5):1187-1192.

57. Wang ZL, Zheng JR, Yang RF, Huang LX, Chen HS, Feng B. An Ideal Hallmark Closest to Complete Cure of Chronic Hepatitis B Patients: High-sensitivity Quantitative HBsAg Loss. *J Clin Transl Hepatol*. **2023;** 11(1):197-206.

58. Su Z, Chen J, Zhang J, et al. Circulating IL-1*β*, IL-17, and IP-10 as Potential Predictors of Hepatitis B Virus Infection Prognosis. *J Immunol Res*. **2022;** 520-2898.

59. Talaat RM, Elsharnoby S, Abdelkhalek MS, El-Shenawy SZ, Elmasry S. The Impact of Interferon-γ (IFN-γ) and IFN-γ-Inducible Protein 10 (IP-10) Genes' Polymorphism on Risk of Hepatitis C Virus-Related Liver Cirrhosis. *Immunol Invest*. **2022;** 51(3):688-704.

60. Antonelli A, Ferrari SM, Giuggioli D, Ferrannini E, Ferri C, Fallahi P. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. **2014;** 13(3):272-280.

61. Lei J, Yin X, Shang H, Jiang Y. IP-10 is highly involved in HIV infection. *Cytokine*. **2019;** 115:97-103.

62. **Limothai U, Chuaypen N, Khlaiphuengsin A, et al.** Association of interferon-gamma inducible protein 10 polymorphism with treatment response to pegylated interferon in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Antivir Ther*. **2016;** 21(2):97-106.

63. **Cornberg M, Wiegand SB.** ImPortance of IP-10 in hepatitis B. *Antivir Ther*. **2016;** 21(2):93-96.

64. **Wong GL, Chan HL, Chan HY, et al.** Serum interferon-inducible protein 10 levels predict hepatitis B s antigen seroclearance in patients with chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther*. **2016;** 43(1):145-153.

65. **Papatheodoridis G, Triantos C, Hadziyannis E, et al.** Serum HBsAg kinetics and usefulness of interferon-inducible protein 10 serum in HBeAg-negative chronic hepatitis B patients treated with tenofovir disoproxil fumarate. *J Viral Hepat*. **2015;** 22(12):1079-1087.

66. **Papatheodoridis G, Goulis J, Manolakopoulos S, et al.** Changes of HBsAg and interferon-inducible protein 10 serum levels in naive HBeAg-negative chronic hepatitis B patients under 4-year entecavir therapy. *J Hepatol*. **2014;** 60(1):62-68.

67. **Xu Z, Liu Y, Liu L, et al.** Association of interferon-gamma induced protein 10 promoter polymorphisms with the disease progression of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *PLoS One*. **2013;** 8(9):72799.

68. **Zhou K, Contag C, Whitaker E, Terrault N.** Spontaneous loss of surface antigen among adults living with chronic hepatitis B virus infection: a systematic review and pooled meta-analyses. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. **2019;** 4(3):227-238.

69. **Buechter M, Günther AM, Manka P, Gerken G, Kahraman A.** Factors Positively Correlated with Hepatitis B Surface Antigen Seroconversion in Chronic Hepatitis B. *J Pers Med*. **2024;** 14(4):390.

70. **Hu H, Shen Y, Hu M, Zheng Y, Xu K, Li L.** Incidence and Influencing Factors of New Hepatitis B Infections and Spontaneous Clearance: A Large-Scale, Community-Based Study in China. *Front Med (Lausanne)*. **2021;** 8:717667.

71. **Yuen MF, Wong DK, Sablon E, et al.** HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects [published correction appears in Hepatology. **2004;** 40(3):767.

72. **Simonetti J, Bulkow L, McMahon BJ, et al.** Clearance of hepatitis B surface antigen and risk of hepatocellular carcinoma in a cohort chronically infected with hepatitis B virüs, *published correction appears in Hepatology.* **2015;** 62(4):1330.

73. **Manno M, Cammà C, Schepis F, et al.** Natural history of chronic HBV carriers in northern Italy: morbidity and mortality after 30 years. *Gastroenterology*. **2004;** 127(3):756-763.

74. **Hsueh RC, Wu WJ, Lin CL, et al.** Impact of PNPLA3 p.I148M and Hepatic Steatosis on Long-Term Outcomes for Hepatocellular Carcinoma and HBsAg Seroclearance in Chronic Hepatitis B. *J Hepatocell Carcinoma*. **2022;** 9:301-313.

75. **Liu J, Yang HI, Lee MH, et al.** Incidence and determinants of spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance: a community-based follow-up study. *Gastroenterology*. **2010;** 139(2):474-482.

76. **Chu CM, Lin DY, Liaw YF.** Clinical and virological characteristics post HBsAg seroclearance in hepatitis B virus carriers with hepatic steatosis versus those without. *Dig Dis Sci*. **2013;** 58(1):275-281

77. **Li J, Yang HI, Yeh ML, et al.** Association Between Fatty Liver and Cirrhosis, Hepatocellular Carcinoma, and Hepatitis B Surface Antigen Seroclearance in Chronic Hepatitis B. *J Infect Dis*. **2021;** 224(2):294-302.

78. **Coffin CS, Haylock-Jacobs S, Doucette K, et al.** Clinical Outcomes and Quantitative HBV Surface Antigen Levels in Diverse Chronic Hepatitis B Patients in Canada: A Retrospective Real-World Study of CHB in Canada (REVEAL-CANADA). *Viruses*. **2022;** 14(12):2668.

79. **Chien TL, Wang JH, Kee KM, Chen CH, Hung CH, Lu SN.** Factors Predicting HBsAg Seroclearance and Alanine Transaminase Elevation in HBeAg-Negative Hepatitis B Virus-Infected Patients with Persistently Normal Liver Function. *PLoS One*. **2016;** 11(12):166543.

80. **Wu CF, Fong TM, Wu SS, Saab S.** Hepatitis B Surface Antigen Levels Are Related to Spontaneous Hepatitis B Surface Antigen Seroconversion in Inactive Hepatitis B Carriers. *J Clin Gastroenterol*. **2020;** 54(6):573-576.

81. **Ruan P, Xu SY, Zhou BP, Huang J, Gong ZJ.** Hepatitis B surface antigen seroclearance in patients with chronic hepatitis B infection: a clinical study. *J Int Med Res*. **2013;** 41(5):1732-1739.

82. **Tseng TC, Liu CJ, Su TH, et al.** Serum hepatitis B surface antigen levels predict surface antigen loss in hepatitis B e antigen seroconverters. *Gastroenterology*. **2011;** 141(2):517-525.

83. **Kwak MS, Cho EJ, Jang ES, et al.** Predictors of HBsAg seroclearance in HBeAg-negative chronic hepatitis B patients. *Digestion*. **2011;** 84(1):23-28.

84. **Ari A, Çalik Ş, Tosun S, Özsu Yilmaz S.** A persistently low HBV DNA level is a predictor of spontaneous HBsAg clearance in patients with chronic hepatitis B. *Turk J Med Sci*. **2016;** 46(1):48-52.

85. **Lim TH, Gane E, Moyes C, Borman B, Cunningham C.** Serological and clinical outcomes of horizontally transmitted chronic hepatitis B infection in New Zealand Māori: results from a 28-year follow-up study. *Gut*. **2015;** 64(6):966-972.

86. **Habersetzer F, Moenne-Loccoz R, Meyer N, et al.** Loss of hepatitis B surface antigen in a real-life clinical cohort of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Liver Int*. **2015;** 35(1):130-139.

87. **Marcellin P, Ahn SH, Ma X, et al.** Combination of Tenofovir Disoproxil Fumarate and Peginterferon α-2a Increases Loss of Hepatitis B Surface Antigen in Patients With Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology*. **2016;** 150(1):134-144.

88. **Yang JM, Chen LP, Wang YJ, et al.** Entecavir add-on Peg-interferon therapy plays a positive role in reversing hepatic fibrosis in treatment-naïve chronic hepatitis B patients: a prospective and randomized controlled trial. *Chin Med J (Engl)*. **2020;** 133(14):1639-1648.

89. **Yip TC, Wong GL, Chan HL, et al.** HBsAg seroclearance further reduces hepatocellular carcinoma risk after complete viral suppression with nucleos(t)ide analogues. *J Hepatol*. **2019;** 70(3):361-370.

90. **Hsu YC, Jun DW, Peng CY, et al.** Effectiveness of entecavir vs tenofovir disoproxil fumarate for functional cure of chronic hepatitis B in an international cohort. *Hepatol Int*. **2022;** 16(6):1297-1307.

91. **Hsu YC, Yeh ML, Wong GL, et al.** Incidences and Determinants of Functional Cure During Entecavir or Tenofovir Disoproxil Fumarate for Chronic Hepatitis B. *J Infect Dis*. **2021;** 224(11):1890-1899.

92. **Thanapirom K, Suksawatamnuay S, Sukeepaisarnjaroen W, et al.** Association between CXCL10 and DPP4 Gene Polymorphisms and a Complementary Role for Unfavorable IL28B Genotype in Prediction of Treatment Response in Thai Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *PLoS One*. **2015;** 10(9):137365.

93. **Tang NL, Fan HP, Chang KC, et al.** Genetic association between a chemokine gene CXCL-10 (IP-10, interferon gamma inducible protein 10) and susceptibility to tuberculosis. *Clin Chim Acta*. **2009;** 406(1-2):98-102.

94. **Deng G, Zhou G, Zhang R, et al.** Regulatory polymorphisms in the promoter of CXCL10 gene and disease progression in male hepatitis B virus carriers, *Gastroenterology.* **2008;** 135(2):713.

95. Xu Z, Liu Y, Liu L, et al. Association of interferon-gamma induced protein 10 promoter polymorphisms with the disease progression of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *PLoS One*. **2013;** 8(9):72799.

96. Enroth S, Johansson A, Enroth SB, Gyllensten U. Strong effects of genetic and lifestyle factors on biomarker variation and use of personalized cutoffs. *Nat Commun*. **2014;** 5:4684.

