

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**IRAK AL-MUTHANNA İLİNDE HEPATİT-B VİRÜSÜNÜN MOLEKÜLER VE
İMMÜNOLOJİK ARAŞTIRILMASI**

Mudhafar Saud Dakhil ALSHAHER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2023**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mudhafar Saud Dakhil ALSHAHER tarafından hazırlanan “**Irak Al-Muthanna İlinde Hepatit-B Virüsünün Moleküler Ve İmmünolojik Araştırılması**” adlı tez çalışması 17/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN

Eş Danışman : Doç. Dr. Taisir Abdulelah KADHIM

Jüri Üyeleri :

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Serhat SĞREKBASAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Nesliha TEKİN KARACAER
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Aksaray Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “**Irak Al-Muthanna İlinde Hepatit-B Virüsünün Moleküler Ve İmmünolojik Araştırılması**” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (17/07/2023).

Mudhafar Saud Dakhil ALSHAHER

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

IRAK, AL-MUTHANNA EYALETİNDE HEPATİT B VİRÜSÜNÜN MOLEKÜLER VE İMMÜNOLOJİK ARAŞTIRILMASI

Mudhafar Saud Dakhil ALSHAHER

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN
Eş Danışman: Doç. Dr. Taisir Abdulalah KADHIM

Hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu Irak'ta önemli bir halk sağlığı sorunudur. Kronik HBV enfeksiyonu, karaciğer sirozu (LC) ve hepatoselüler karsinom (HCC) için bir risk faktörüdür, ancak HBV ile ilişkili hastalıkların ilerlemesinde yer alan mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir. Konak immün yanıtının, HBV enfeksiyonu olan hastaların klinik sonuçları ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Sitokinler gibi immünomodülatör faktörler, HBV ile ilişkili hastalıkların ilerlemesinde ve tedavisinde rol oynarlar. İnterlökin-35 (IL-35) yeni tanımlanmış bir inhibitör sitokindir. IL-35'in enflamasyonu kontrol edebileceği ve böylece HBV karaciğer hasarını sınırlayabileceği vurgulanıyor. Bu nedenle IL-35'in hepatit B hastalığına yönelik yeni tedaviler için bir hedef olma olasılığını artırmaktadır. Çalışmaya Al-Muthanna Eyaletinde HBV enfeksiyonu olan 120 hasta (84 kronik hepatit ve 36 akut hepatit) ile 30 sağlıklı kontrol grubu dahil edilmiştir. Bu gruplarda IL-35 serum seviyeleri ölçülmüş ve viral DNA amplifikasyonu yapılmıştır. Bulgulara göre, HBV hastalarında IL-35 seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı şekilde azaldığı bulunmuştur. HBV enfeksiyonu olan hastaların serum örneklerinden 10 viral DNA ekstrakte edilmiştir. HBV genomundan polimeraz geninin amplifikasyonu ve genin Sanger dizilimi için bir PCR protokolü tasarlanmıştır. Diziler, filogenetik analiz ve genetik çeşitliliğin karakterizasyonu için HBV referans dizileriyle hizalanmıştır. Popülasyonlar, HBV genotip frekans dağılımlarında heterojenlik göstermektedir. Altı HBV genotipi tanımlanmıştır (A, B, C, D, E ve H). En sık rastlanan genotip D (%47) olurken, C genotipi sıklık oranı (%4 ile) en az gözlenen genotip olmuştur. Ek olarak, hastaların çoğunluğu farklı genotipik kombinasyonlarla karışık HBV genotipleri (iki, üç, dört veya beş) göstermiştir. Sonuç olarak, HBV genotiplerinden D'nin, Al-Muthanna Eyaletinden Iraklı HBV hastalar arasında en yaygın genotip olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, bu çalışma HBV enfeksiyonunun halk sağlığı üzerindeki etkisini ve bu enfeksiyonun mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik yapılan bir çalışmanın temel bulgularını içermektedir.

2023, 51 sayfa

ANAHTAR KELİMELELER: Hepatit B virüsü, İnterlökin-35, HBV genotip

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR AND IMMUNOLOGICAL INVESTIGATION OF HEPATITIS B VIRUS IN AL-MUTHANNA PROVINCE, IRAQ

Mudhafar Saud Dakhil ALSHAHER

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Asst. Prof. Dr. Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN
Co-Advisor: Assoc. Prof. Dr. Taisir Abdulalah KADHIM

Hepatitis B virus (HBV) infection is an important public health problem in Iraq. Chronic HBV infection is a risk factor for liver cirrhosis (LC) and hepatocellular carcinoma (HCC), but little is known about the mechanisms involved in the progression of HBV-related diseases. It is known that the host immune response is associated with the clinical outcomes of patients with HBV infection. Immunomodulatory factors such as cytokines play a role in the progression and treatment of HBV-related diseases. Interleukin-35 (IL-35) is a newly identified inhibitory cytokine. It is emphasized that IL-35 can control inflammation and thus limit HBV liver damage. Therefore, it raises the possibility of IL-35 to be a target for new treatments for hepatitis B disease. 120 patients with HBV infection (84 chronic hepatitis and 36 acute hepatitis) and 30 healthy control groups in Al-Muthanna State were included in the study. Serum levels of IL-35 were measured in these groups and viral DNA amplification was performed. According to the findings, IL-35 levels were found to be significantly lower in HBV patients compared to healthy controls. 10 viral DNAs were extracted from serum samples of patients with HBV infection. A PCR protocol has been designed for amplification of the polymerase gene from the HBV genome and Sanger sequencing of the gene. Sequences were aligned with HBV reference sequences for phylogenetic analysis and characterization of genetic diversity. Populations show heterogeneity in HBV genotype frequency distributions. Six HBV genotypes have been identified (A, B, C, D, E, and H). The most common genotype was D (47%), while the frequency rate of C genotype was the least observed genotype (4%). In addition, the majority of patients showed mixed HBV genotypes (two, three, four or five) with different genotypic combinations. As a result, HBV genotype D was found to be the most common genotype among Iraqi HBV patients from Al-Muthanna Province. In conclusion, this study includes the impact of HBV infection on public health and the main findings of a study to understand the mechanisms of this infection.

2023, 51 pages

Keywords: Hepatitis B virus, Interleukin-35, HBV genotype

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Danışmanlarım Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN ve eş danışman Doç. Dr. Taisir Abdulelah KADHİM'e bana bu projede çalışma fırsatı sağladıkları, çeşitli analiz aşamalarındaki yardımları ve yazma süreci boyunca tüm geri bildirimleri için teşekkür ederim. Ayrıca Al-Muthanna Üniversitesi Fen Fakültesi dekanlığına ve biyoloji bölüm başkanına teşekkürlerimi ve takdirlerimi sunarım. Ayrıca, tezi tamamlamam için bana gereken tüm kolaylıkları sağladığı için Irak Sağlık Bakanlığı'na da müteşekkirim.

Laboratuvar çalışmalarında rehberlik ve yardımlarından dolayı arkadaşım Suhair Mehdi Hanım'a da minnettarım.

Destekçim, gittiğim yolda önderim olan babam; dünyanın ilk hanımı annem... Yolumu aydınlatan ışık olduğunuz için teşekkür ederim.

Destekleri ve cesaretlendirmeleri için aileme derin bir şükran duygusu hissediyorum.

Son olarak, bu tezin gerçekleştirilmesinde bana yardımcı olan herkese teşekkür ederim.

Mudhafar Saud Dakhil ALSHAHER

Çankırı, Temmuz 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Çalışmanın Amacı.....	2
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 HBV Genomunun Yapısı.....	3
2.2 Gen Ürünlerinin İşlevi.....	4
2.2.1 Yüzey proteini	4
2.2.2 Çekirdek proteini.....	5
2.2.3 Polimeraz (P) proteini	5
2.2.4 X proteini.....	5
2.3 Viral Hepatitin Klinik Özellikleri.....	6
2.4 HBV Enfeksiyonunun İmmünopatogenezi	7
2.5 HBV'nin Epidemiyolojisi	8
2.6 Hepatit B Genotipleri	8
2.7 İnterlökin (IL-35)	9
2.8 IL-35'in Biyolojik Özellikleri.....	9
3. MATERYAL VE METOT	11
3.1 Malzemeler	11
3.1.1 Ekipmanlar.....	11
3.1.2 Kitler ve reaktifler	11
3.1.3 Kimyasallar	12
3.1.4 Primer tasarımı.....	12
3.1.5 Deney tasarımı	13

3.2 Yöntemler	14
3.2.1 Tamponların ve reaktiflerin hazırlanması	14
3.2.2 DNA ekstraksiyonun sterilizasyonu	16
3.3 Örneklem	16
3.3.1 Örnek koleksiyon	16
3.3.2 Veri toplama	17
3.4 Serum IL-35 Düzeylerinin Ölçümü	17
3.4.1 IL-35 ELISA kitinin test prensibi	17
3.5 Serum Örneklerinden Viral DNA Ekstraksiyonu	18
3.6 PCR amplifikasyonu	19
3.6.1 Konvansiyonel PCR ürün analizi	20
3.6.2 PCR ürünlerinin jel elektroforezi	21
3.7 Sıralama	22
3.8 Biyoinformatik	22
3.8.1 Çoklu sekans hizalama	22
3.8.2 Filogenetik ağaç analizi	22
3.9 İstatistiksel Analiz	23
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	24
4.1 Hastalar	24
4.2 IL-35 Sonuçları	25
4.3 HBV'nin Moleküler Çalışması	26
4.3.1 Serum örneğinin viral DNA ekstraksiyonu	26
4.3.2 HBV'nin DNA polimeraz genlerinin PCR amplifikasyonu	27
4.4 Iraklı Hastalarda HBV Genotiplerinin Belirlenmesi	28
4.5 Filogenetik Analiz	30
4.6 Tartışma	32
4.6.1 Demografik özellikler	32
4.6.2 IL-35	35
4.6.3 Iraklı hastalarda HBV genotipleri	37
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
5.1 Sonuçlar	40
5.2 Öneriler	40

KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ.....	51



SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre



KISALTMALAR DİZİNİ

Orfs	Açık okuma çerçeveleri ORF'ler
LHB	Büyük hepatit B (Yüzey pProteinleri)
C	Çekirdek proteini
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
Breg	Düzenleyici B hücresi
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent testi
EBI3	Epstein-barr virüsü kaynaklı gen 3
HBcAg	Hepatit B çekirdek antijeni
HBeAg	Hepatit B e antijeni
HBV	Hepatit B virüsü
Hbx	Hepatit B X protien
Hbs Ag	Hepatit B yüzey antijeni
HCC	Hepatosellüler kanser
Igg	İmmüoglobulin G
Igm	İmmüoglobulin M
IFN-G	İnterferon gama
IL-12	İnterlökin- 12
IL-35	İnterlökin-35
Kb	Kilo baz çiftleri
cccDNA	Kovalent olarak kapalı dairesel deoksiribonükleik asit
SHB	Küçük hepatit B (Yüzey proteinleri)
MHB	Orta Hepatit B (Yüzey proteinleri)
Pbmcs	Periferik kan mononükleer hücreleri
P	Polimeraz
CTL	Sitotoksik T lenfosit
Treg	Treg düzenleyici T hücresi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	HBV'nin genomu	4
Şekil 2.2	IL-12 ailesi sitokini.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 3.1	Hepatit B virüsü DNA POL/RT uzunluğunun polimeraz zincir reaksiyonu amplifikasyonu için primerlerin yeri	13
Şekil 3.2	Araştırmanın Deneysel Deseni	14
Şekil 3.3	Jel Elektroforezi.....	14
Şekil 3.4	IL-35 ELISA kiti	14
Şekil 3.5	Viral DNA Ekstraksiyonu işlemi.....	20
Şekil 3.6	PCR amplifikasyonu.....	22
Şekil 4.1	Cinsiyete göre HBV hastaları	24
Şekil 4.2	Akut ve sağlıklı kontrol ile karşılaştırıldığında kronik HBV hasta grubunda IL-35 serum düzeylerinin kutu grafiği.....	26
Şekil 4.3	Serum örneklerinden viral DNA izolasyonu %1 agaroz jelde 100 voltta 15 dakika elektroforez ile yapılmıştır.....	27
Şekil 4.4	PCR ürünleri %1'lik agaroz jel üzerinde 100 voltta 15 dk ayrıldı ve daha sonra 40 dk 50 volta düşürülmüştür.	27
Şekil 4.5	HBV genotip analizi	29
Şekil 4.6	Hastalarda HBV genotipinin dağılımı	30
Şekil 4.7	Hepatit B virüsü polimeraz gen dizisi yerel Hepatit B virüsü klonlarının (No.1-No.10) ve NCBI-Genbank Hepatit B virüsü klonlarının çoklu dizi hizalama analizi (MEGA 6.0, çoklu hizalama analiz aracı) kullanılarak ClustalW hizalama analizi. Polimeraz nükleotid dizilerindeki çoklu hizalama analizi benzerliği (*).....	31
Şekil 4.8	Kısmi Hepatit B polimeraz genine dayalı filogenetik ağaç analizi	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Ekipman ve aletler	11
Çizelge 3.2	Ticari Kitler ve Reaktifler	12
Çizelge 3.3	Bu çalışmada kullanılan kimyasallar	12
Çizelge 3.4	PCR ve dizileme primer seti	13
Çizelge 3.5	PCR reaksiyonunun bileşenleri.....	20
Çizelge 3.6	PCR programı reaksiyonu.....	21
Çizelge 4.1	HBV ile enfekte çalışma hastalarının klinik özellikleri.....	24
Çizelge 4.2	HBV hastalarıyla ilişkili klinik faktörlerin ki-kare analizi	25
Çizelge 4.3	Kronik HBV hastalarında, akut ve sağlıklı kontrolde serum IL-35 düzeyi için ANOVA test sonuçları.....	26
Çizelge 4.4	Iraklı hastalarda HBV genotipinin dağılımı.....	30

1. GİRİŞ

Hepatit B, insanlarda görülen en yaygın viral enfeksiyonlardan birisidir ve önemli bir küresel halk sağlığı sorunudur. Hepatit B virüsü (HBV), dünya çapında 257 milyon kronik enfeksiyon ve çoğu siroz ve hepatoselüler karsinomdan (HCC) kaynaklanan, yılda 880.000'den fazla ölümle küresel nüfusun üçte birini enfekte eden bir hastalıktır (DSÖ, 2020). Hepatit B virüsü, Hepadnaviridae ailesinin prototip üyesi olan bir DNA genomunu (~3.2 kb) içeren kısmen çift sarmallı gevşek dairesel bir kodlama organizasyonuna sahip virüstür. Bu kodlama organizasyonu dört açık okuma çerçevesini kısmen veya tamamen içermektedir (Seeger *et al.* 2013). Hepatit B virüsü, tam genom dizisinin %8'den fazla farklılık göstermesine dayanarak A'dan J'ye kadar 10 farklı genotipe sınıflandırılmıştır (Kurbanov *et al.* 2010). Spesifik HBV genotipleri içindeki önemli çeşitlilik, çok sayıda alt genotipe daha fazla sınıflandırma yapılmasına yol açmıştır (Kramvis 2014).

HBV varyantlarının, karaciğer hastalığının şiddeti üzerindeki etkisi öncelikle A-D genotipleri için araştırılmıştır (McMahon 2009; Kao *et al.* 2010; Levrero ve Zucman-Rossi 2016). Genotip C, genotip A, B ve D'den daha onkogenik olarak kabul edilmektedir (Chan *et al.* 2004; Wong *et al.* 2013). Benzer şekilde, bazal çekirdek promotördeki (BCP) mutasyonlar, HBeAg ekspresyonunun azalmasına neden olur, ancak Pre-S bölgesindeki artmış viral replikasyon ve silmeler, artan HCC riski ile ilişkilidir (Liu *et al.* 2009).

Hepatit B'nin genetik varyasyonlarının geniş dağılımı, klinik etkileri açısından büyük bir zorluk oluşturarak mevcut tanı testlerinin ve tedavi stratejilerinin tasarımını zorlaştırmakta ve uzun vadeli tedavi programların başarısını tehdit etmektedir (Lazarevic 2014; Yan *et al.* 2017). Son zamanlarda, başka bir sitokinin (IL-35) viral kalıcılığın korunmasında rol oynadığı öne sürülmüştür.

IL-35, antiinflamatuvar ve immünosupresif özelliklere sahip olduğu kabul edilen IL-12 ailesinin en son üyesidir (Su *et al.* 2018). İki alt birimden oluşan heterodimerik bir sitokindir; IL-12 α zinciri p35 (IL-12p35) ve IL-27 β zinciri Epstein-Barr virüsü kaynaklı 3 (EBI3) (Song ve Ma, 2016). Uyarılmış doğal T düzenleyici (Treg) hücreler, IL-35

üreten düzenleyici B hücresi (i35-Breg) ve uyarılmış pan T hücreleri (Xue *et al.* 2019) dahil olmak üzere birkaç hücrenin IL-35 ürettiği bildirilmiştir. İki farklı immünolojik fonksiyon, IL-35'e bağlıdır; T hücrelerinin çoğalmasının baskılanması ve bu hücrelerin Treg hücrelerine dönüşmesi (Collison *et al.* 2010). Bu işlevler nedeniyle, IL-35'in anormal regülasyonunun, bağışıklıkla ilişkili hastalıklarda belirgin bir role sahip olduğu ileri sürülmüştür. Örneğin, otoimmün hastalıklar, kanser, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar (Zhang *et al.* 2019). HBV üzerine yapılan son çalışmalar, IL-35'in kronik enfeksiyonların bağışıklık kaynaklı hastalıklardaki rolünde kritik bir rol oynadığını göstermektedir (Shi *et al.* 2015; Shao *et al.* 2017).

1.1 Çalışmanın Amacı

1- Irak'ın Al-Muthanna Vilayeti'nde yaşayan farklı yaş grupları ve farklı risk grupları arasında HBV enfeksiyonlarına ilişkin prevalansın, bazı moleküler ve immünolojik parametrelerin belirlenmesi.

2- Iraklı Hastalarda HBV genotiplerinin belirlenmesi.

3- IL-35 ile HBV enfeksiyonu arasındaki ilişkinin araştırılması.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 HBV Genomunun Yapısı

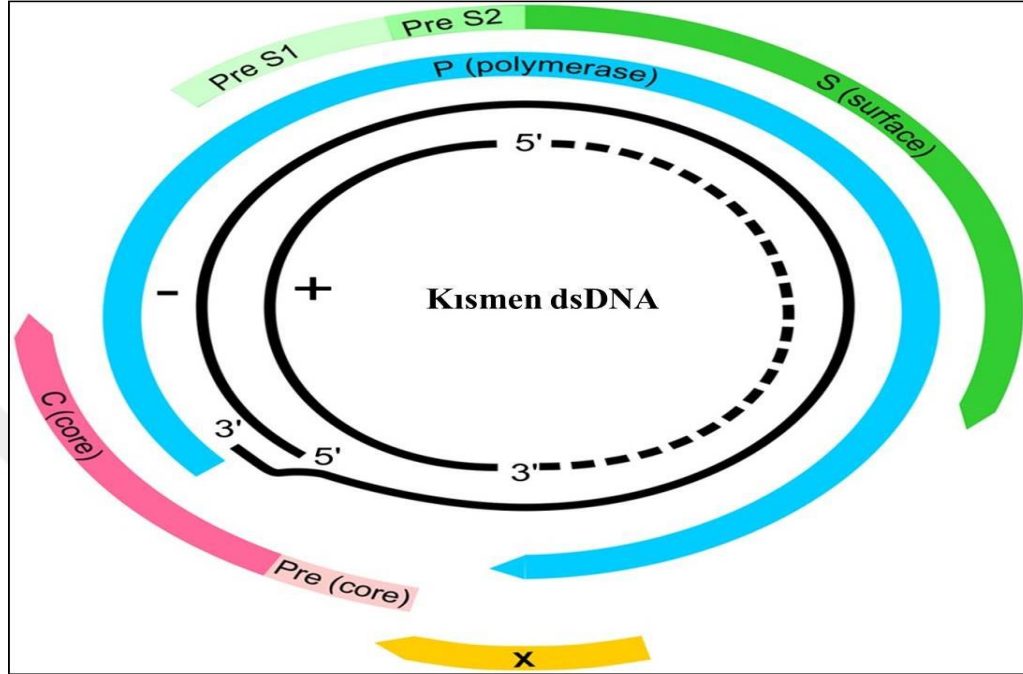
Hepadnaviridae ailesinin bir üyesi olan HBV, retrovirüslere benzer özelliklere sahip küçük bir DNA virüsüdür (Ganem 2001). En yüksek virüs konsantrasyonları kanda bulunsa da, meni ve tükürük gibi diğer vücut sıvılarının da HBV içerdiği gösterilmiştir (Gurung *et al.* 2018)

HBV genomu, kısmen çift sarmallı, yaklaşık 3.2 kilobaz (kb) uzunluğunda, küresel yapıdan oluşmaktadır. DNA ipliklerin 5' ucu ile viral polimeraz arasında kovalent bağlar vardır (Gerlich ve Robinson 1980). HBV genomunun küçük kovalent olarak kapalı dairesel DNA'sından (cccDNA) kopyalanan dört transkript bilinmektedir. Bu transkriptlerin boyutları sırasıyla 3.5 kb, 2.4 kb, 2.1 kb ve 0.7 kb'dır. Bu transkriptler, HBV yaşam döngüsü ve karaciğer hasarında tanımlanmış rolleri olan polimeraz, HBcAg, HBsAg, HBsAg (L, M, S yüzey proteinleri) ve HBx üretmek üzere kodlanmaktadır (Liang 2009).

Nükleokapsid, viral genom DNA'sının tek kopyasına ve negatif zincirin 5' ucuna kovalent olarak bağlı viral polimeraz enzimine sahiptir ve 27 nm çapında 240 viral kapsid proteininin ikosahedral bir yapıda düzenlenmesi ile oluşur (Liang 2009; Blok *et al.* 2007). Protein kinazlar da dahil olmak üzere bazı hücre proteinleri de nükleokapsid yapısında paketlenmektedir (Block *et al.* 2007). HBV genomu asimetrik yapıda olup iki zincirlidir. Negatif zincir genom uzunluğuna sahiptir, tamamlayıcı pozitif zincir farklı uzunluklarda olabilir (Doo ve Ghany 2010).

Genom, çekirdek, yüzey, polimeraz, kor ve X proteinlerini ifade eden dört açık okuma çerçevesinden (ORF) oluşmaktadır (Şekil 2.1). Her bir ORF en az bir diğer ORF ile örtüşür, polimeraz ORF diğerlerinin hepsiyle örtüşür ve her nükleotit en az bir ORF'nin parçasıdır. S, preSI ve pre SII ORF'lerin çevirisi, sırasıyla yüzey proteinleri olan SHB, MHB ve LHB'nin ifadesine yol açmaktadır (Li *et al.* 2017). Dört promotör (S, preS1,

preC/C, ve X) ve iki güçlendirici (EnhI ve EnhII) ORF'lerle örtüşmektedir (Bömmel *et al.* 2015).



Şekil 2.1 HBV'nin genomu

Tam eksi (–) sarmallı ve tamamlanmamış (+) sarmallı kısmen çift sarmallı DNA (dsDNA). Dört açık okuma çerçevesi (ORF) gösterilmektedir: e antijeni (HBeAg) ve çekirdek proteini (HBcAg) kodlayan ön çekirdek/çekirdek (ön C/C); Polimeraz için P (ters transkriptaz), yüzey proteinleri için PreS1/PreS2/S (üç HBsAg formu, küçük (S), orta (M) ve büyük (L)) ve bir transkripsiyonel trans-aktivatör protein için X (Hu ve Seeger 2015).

2.2 Gen Ürünlerinin İşlevi

2.2.1 Yüzey proteini

HBV yüzey proteini; küçük (SHB), orta (MHB) ve büyük (LHB) hücresel lipid materyali ile birlikte viral zarfı oluşturmaktadır (Yan ve diğerleri 2012). Hepatit B yüzey antijeninin

(HBs Ag) %85'ini oluşturan SHB antijeni, oldukça immünojeniktir ve konakçının HBV'ye karşı bağışıklık tepkisini tetiklemektedir. Alt viral partiküllerde dolaşan fazla yüzey proteininin, konakçının virüse karşı immünolojik tepkisini seyrelttiği düşünülmektedir. MHB nin aksine LHB, enfeksiyon ve viral morfogenez için gereklidir. Filamentlerin ve virionların HbsAg 'sinin %10-30 'unu temsil etmektedir. LHB, hepatositlere viral girişte rol oynar, ancak bu süreçte birçok SHB'ye de ihtiyaç duyulmaktadır (Ezzikouri *et al.* 2014).

2.2.2 Çekirdek proteini

Çekirdek proteini (C), nükleokapsidin ana yapısal bileşenidir. Ön C /C ORF, bir ön çekirdek/çekirdek füzyon proteinine kopyalanır. Endoplasmik retikuluma giriş sırasında, 19 amino asit Golgi bölmesine taşınırken ön çekirdek proteininin N-terminal ucundan bir sinyal peptidaz tarafından ayrılır, ek amino asitler Golgi içi proteazlar tarafından C-terminal ucundan çıkarılır ve HBe antijeni oluşturulur. Bu antijen seruma salgılanır. HBe'nin biyolojik işlevi henüz çözülmemiştir (Cheng *et al.* 2017).

2.2.3 Polimeraz (P) proteini

Polimeraz (P) dört alana sahiptir; görünür işlevi olmayan bir ayırıcı bölge, ters transkripsiyon aktivitesine sahip olan polimeraz alanı; pregenomik viral RNA'nın ters transkripsiyonu için bir protein primeri olarak hizmet eden bir terminal alanı ve ters transkripsiyon sırasında RNA şablonunun bozulmasından sorumlu olan RNase H alanı (Ezzikouri *et al.* 2014).

2.2.4 X proteini

X proteininin (HBX) viral replikasyon için gerekli olan rastgele bir transkripsiyon düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir. Kendisini DNA'ya bağlamasa da HBV güçlendiriciler/promotörlerden ve onkogenler, sitokinler, büyüme faktörleri ve hücre döngüsü kontrolü ve ilerlemesi, DNA onarımı, apoptotik hücre ölümü ile ilgili çeşitli

genler dahil olmak üzere hücresel genlerin promotörlerinden gelen transkripsiyonu düzenler. HBX ayrıca birkaç sinyal transdüksiyon proteini ve hücre büyümesi ve hayatta kalma düzenleyicileri ile kompleksler oluşturur. HBV regülasyonu ve patogeneğinde merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (Liu *et al.* 2017).

2.3 Viral Hepatit Klinik Özellikleri

Viral hepatit klinik özellikleri, mide bulantısı, kusma, iştahsızlık, koyu renkli idrar ve bazen karın sağ üst kadranda ağrısının eşlik ettiği geniş bir semptom yelpazesine sahiptir. Ateş, miyalji, baş ağrısı ve artraljiyi genellikle hastalığın başlangıcını gösteren semptomlardır. Epidemiyolojide kanıtlar bulunsada klinik olarak etiyojik faktörü belirlemek mümkün değildir (Kudesia and Wreghitt 2009).

Hepatit B ve Hepatit C enfeksiyonlarının benzer belirtilere sahip olduğu ve genel olarak çocukluk ve ergenlik döneminde belirti göstermediği bilinmektedir (Karnsakul ve Schwarz 2017). Hepatit B ve C virüs enfeksiyonuna sahip yetişkinlerin yaklaşık olarak %50 ila %70'i semptomsuz bir enfeksiyon geçirebilir. Asemptomatik enfeksiyon gösteren kişilerde (Kudesia ve Wreghitt 2009) serum aminotransferazlarında yükselmeye görülürken, karaciğer histopatolojisinde minimal değişiklikler görülür. İltihaplanma ve fibroz, siroz riskini artırmaktadır (Karnsakul and Schwarz 2017).

Hepatit B'nin kuluçka süresi 3-4 ay arasında değişir ve bu hastaların çoğunda HBsAg 6 ay içinde kaybolur, karaciğer fonksiyonlarında düzelme meydana gelir (Kwon *et al.* 2016).

Hepatit B'nin klinik seyri, viral replikasyon ile hastanın bağışıklık sistemi arasındaki ilişki tarafından kontrol edilir; burada doğuştan gelen ve kazanılmış bir bağışıklık sistemi tarafından üretilen antiviral sitokinler aracılığıyla HBV DNA klirensi vardır (Ozaras ve Tahan 2018).

2.4 HBV Enfeksiyonunun İmmünopatogenezi

Genel olarak, viral enfeksiyona karşı bağışıklık yanıtları doğuştan gelen bağışıklık (fagositlerin, tamamlayıcı ve doğal öldürücü hücrelerin aracılık ettiği) ve kazanılmış bağışıklık (antijenlerin özelliklerini, özgüllüğünü ve çeşitliliğini gösteren) olmak üzere ikiye ayrılır (Rosenberg 1999).

Bağışıklık sistemi, oldukça replikatif olan HBV ile enfeksiyonu başlangıçta tanıyamaz. Hücresel immün yanıt, viral replikasyonu baskılamak ve hepatositlerde bulunan ve akut hepatite neden olan HBV'yi uzaklaştırmak için daha sonra aktive olmaktadır (Gerlich 2013).

Akut HBV enfeksiyonunun inkübasyon süresi; viral inokulum boyutuna, bağışıklık yanıtının gücüne ve virüsün konakçı reseptörlere bağlanma yeteneğine bağlı olarak 2-24 hafta arasında değişmektedir. Akut hepatit B virüsü enfeksiyonunun klinik semptomları, enfekte hastalar arasında; virüsün suşu, viral inokulum, konağın bağışıklık durumu ve yaşına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Ozaras and Tahan 2019).

HBsAg, serumda akut HBV'de 1 ile 10 hafta içinde ortaya çıkan ilk serolojik belirteçtir (Song ve Kim 2016) ve HBsAg, akut viral hepatit B olgularında 2-6 ay içinde kaybolurken (Ozaras ve Tahan, 2019), bu belirtecin 6 aydan fazla devam etmesi kronik HBV olduğunu göstermektedir (Kao *et al.* 2002). IgM anti-hepatit B çekirdeği (anti-HBc) HBsAg'den 1-2 hafta sonra ortaya çıkar (Ozaras ve Tahan, 2019), bu durumda 400 ng/mL'yi aşan hepatoselüler karsinom için bir belirteç olarak Alfa-fetoprotein (AFP) kullanılır (Liang 2009). Kronik HBV enfeksiyonu olan hastaların üçte birinde siroz veya hepatoselüler karsinom gelişebilmektedir. Oluşan kronik hepatit B'nin belirleyicileri virüse (HBV genotipi, HBV DNA seviyeleri, bazı HBV mutasyon paternleri) ve konakçıya özgüdür (cinsiyet, genetik yapı, yaş, bağışıklık durumu) (Liang 2009).

2.5 HBV'nin Epidemiyolojisi

HBV, dünyada özellikle gelişmekte olan ÷lkelerde kronik hepatit hastalıklarının en sık nedenidir. HBV enfeksiyonunun prevalansı bir ÷lkeden diğetine değışmektedir (Shepard *et al.* 2006).

HBV enfeksiyonu akut ve kronik inflamasyona ve karaciğeri kanserine yol açabilir (Schädler ve Hildt 2009). Dünyada yaklaşık 350-400 milyon kişinin, kronik HBV taşıyıcısı olduğı tahmin edilmektedir (Kao *et al.* 2002) ve her yıl 620.000'den fazla kiři, komplikasyonlar nedeniyle ölmektedir (Gerlich 2013).

HBV bulaşması başlıca, asemptomatik taşıyıcıların kanı ile doğrudan temas, intravenöz ilaçların alımında ortak enjektör kullanımı, kan transfüzyonu ve cinsel ilişki yoluyla gerçekteşir (Tarky *et al.* 2013). Beş yaşından küçük çocukların %30 ila %90'ında HBV'ye maruz kaldıktan sonra kronik enfeksiyon gözlenmiştir. Öte yandan, HBV'ye maruz kalan yetişkinlerde, vakaların yalnızca %2 ila %5 oranında kronik HBV taşıyıcısı oldukları gözlenmiştir (Lee *et al.* 2006). Dünya Sağık Örgütü tarafından HBV ÷lkeler için düşük endemik <%2, orta endemik %2-8 veya yüksek endemik>%8 olarak sınıflandırılır (DSÖ 2004).

Irak'ta HBV prevalansı %1 civarındadır (Hussein, 2015; Hussein *et al.* 2017). řu anda 400 milyon kişinin virüsle enfekte olduğı tahmin edilmektedir. Çoğı asemptomatiktir ve kişiler hastalıklarının farkında değıldirler (Shepard *et al.* 2006). Bu, Irak gibi gelişmekte olan ÷lkelerde gelişen sağık sistemlerine ekstra yük getirmektedir.

2.6 Hepatit B Genotipleri

HBV genom nükleotit çeşitliliğı, antivirüs tedavisine yanıtta bir farklılığı neden olur. HBV, tam genom dizisinin %8'den fazlasındaki farka dayalı olarak 8 genotipe (A'dan H'ye) sınıflandırılır (Guirgis *et al.* 2010). Bu genotipler farklı coğrafi dağılıma sahiptir. A ve D genotipleri Avrupa, Rusya, Hindistan ve Kuzey Asya'da daha yaygındır; B ve C

genotipleri Doğu Asya ve Avustralya'da daha yaygındır; H, F ve G genotipleri ise daha çok Orta ve Güney Amerika'da dağılmıştır (Guirgis *et al.* 2010).

HBV genotipi, tedavi yanıtı, hastalık prognozu ve karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinom gelişimi ile ilişkili olduğundan önemli bir gen tipi olarak kabul edilmektedir (Liu ve Kao 2006; Sen ve diğerleri 2008; Toan ve diğerleri 2006; Huang ve diğerleri 2008). Irak'ta yapılan çalışmalarda akut ve kronik HBV enfeksiyonlarında genotip D'nin baskın genotip olduğu olduğu bildirilmiştir (Dawood *et al.* 2019; Abdulrazaq and AL-Azaawie 2017).

2.7 İnterlökin (IL-35)

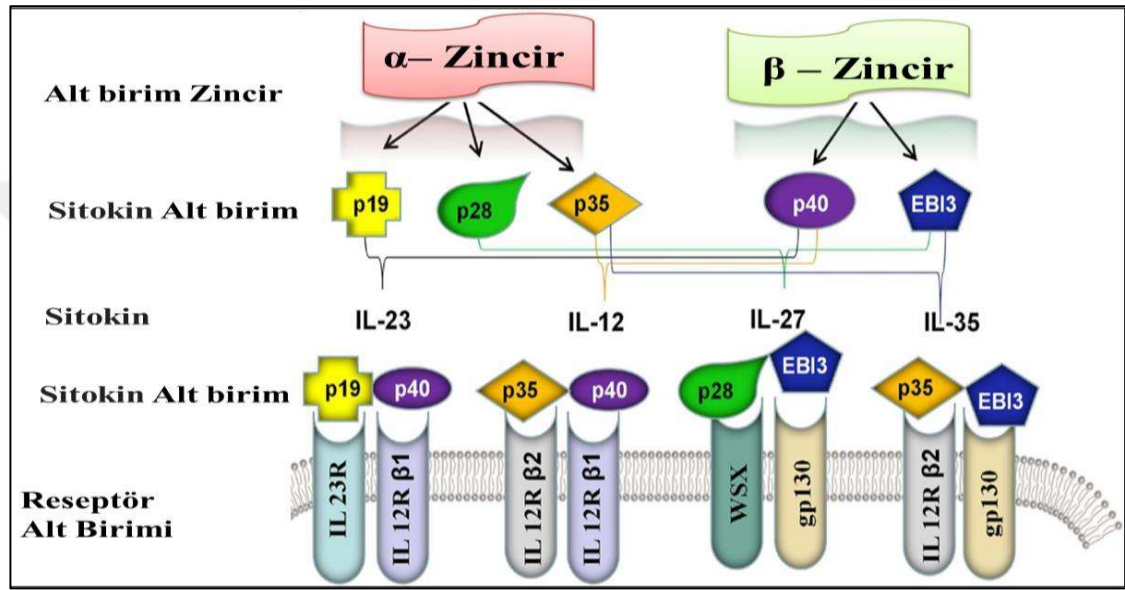
IL-35, IL-12 ailesine ait yeni tanımlanmış bir sitokindir ve düzenleyici T (Treg) hücreleri ve düzenleyici B (Breg) hücreleri tarafından salgılanan güçlü bir immünsüpresif sitokindir (Xiang and Xie 2015).

IL-35'in proinflamatuvar sitokinler üzerindeki etkisinin HBV'nin patogenezinde yer aldığı bildirilmiştir. Çalışmalarda IL-35 stimülasyonunun, PBMC'ler (periferik kan mononükleer hücreler) tarafından üretilen interferon gama (IFN-g), IL-1b, IL-6 ve IL-8 konsantrasyonlarını önemli ölçüde azalttığı ve IL-35'in HBV'ye karşı sitokinlerin neden olduğu antiviral bağışıklığı inhibe ettiği gösterilmiştir (Shao *et al.* 2017).

Ayrıca çalışmalarda, IL-35'in, HBV klirensini etkileyen ve HCC'nin patogenezinin modüle eden HBV'ye özgü CTL (sitotoksik T lenfosit) yanıtı üzerinde inhibe edici etkiler gösterdiğini gösterilmiştir (Li *et al.* 2015; Xiang and Xie 2015; Xue *et al.* 2019).

2.8 IL-35'in Biyolojik Özellikleri

IL-12, ortak alt birimler ve reseptörler içeren α zincirinden (p35) ve p40 ve Epstein-Barr virüsü kaynaklı gen 3'ü (EBI3) içeren β zincirinden oluşan heterodimerik bir sitokindir (Şekil 2.2) (Bastian *et al.* 2019). IL-12 ailesi üyeleri benzer alt birim yapılarını paylaşırlar da önemli ölçüde farklı biyolojik özelliklere sahiptirler. IL-12 ailesinin diğer üyelerinden farklı olarak, IL-35 güçlü immünosüpresif özellikler göstermektedir (Collison *et al.* 2007; Niedbala *et al.* 2007).



Şekil 2.2 IL-12 ailesi sitokini

IL-12 ailesi sitokin alt birimlerinin bilinen beş üyesi ve bunlara karşılık gelen reseptör alt birimleri. IL-12 ailesi, p19, p28 ve p35'ten oluşan bir α zincirinin ve p40 ve EBI3'ten oluşan β zincirinin farklı montajı ile karakterize edildi.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Malzemeler

3.1.1 Ekipmanlar

Bu çalışmada kullanılan ekipman ve aletler Çizelge. 3-1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Ekipman ve aletler

No.	Ürün Adı	Model	Şirket	Menşei
1	ELISA	EL 800	Biotek	Amerika Birleşik Devletleri
2	Hassas terazi	ABS/ABJ	Kern	Almanya
3	Otoklav	DE-23	Systec	Almanya
4	Otomatik su distile cihazı	Zd-1	K & K Scientific	Güney Kore
5	Santrifüj	CL008	Cypress Diagnostics	Belçika
6	UV Transilluminator sistemi	PTRQ		Tayvan
7	Yatay elektroforez sistemi	Mupid-One	Mupid	Japonya
8	Biyogüvenlik kabini	Bc-11b	Magnehelic	Amerika Birleşik Devletleri
9	Etüv	LEO-080F	DAIHAN Lab Tech	Kore
10	Mikrodalga fırın	LMH2235ST	LG	Kore
11	Mikrosantrifüj	Mikro 120	Hettich	Almanya
12	Mikropipet	100-1000 µl, 50-200 µl, 0.5-10 µl	Nanolytik	Almanya
13	Termo döngüleyici	TC-3000	Labnet	Japonya
14	Dikey dondurucu	Serie 4	Bosch	Birleşik Krallık
15	PCR için UV Sterilizasyon Kabini	GLE-UVSC	SCI-PLAs	Birleşik Krallık
16	Vorteks	LVM-202	LabTech	Kore
17	Su banyosu	LWB-111D	LabTech	Kore

3.1.2 Kitler ve reaktifler

Bu çalışmada kullanılan ticari kitler ve reaktifler Çizelge 3.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.2 Ticari Kitler ve Reaktifler

No.	Ürün Adı	Kit kodu	Şirket	Menşei
1	IL-35 ELISA kiti	E0042Hu	BT Lab	Çin
2	Nükleik Asit izolasyon kiti	FAVNK 001-1	Favorgen	Tayvan
3	Q5® Yüksek Doğrulukta 2X Ana Karışım	M0492S	BioLabs	İngiltere
4	100bp DNA merdiveni	N3231S	BioLabs	İngiltere

3.1.3 Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 3.3'te listelenmiştir. Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasal ürünler, tehlikelere maruz kalmayı kontrol etmek için MSD (malzeme güvenlik verileri) sayfasındaki veya kaplardaki kimyasal güvenlik talimatlarına göre kullanılmıştır.

Çizelge 3.3 Kullanılan kimyasallar

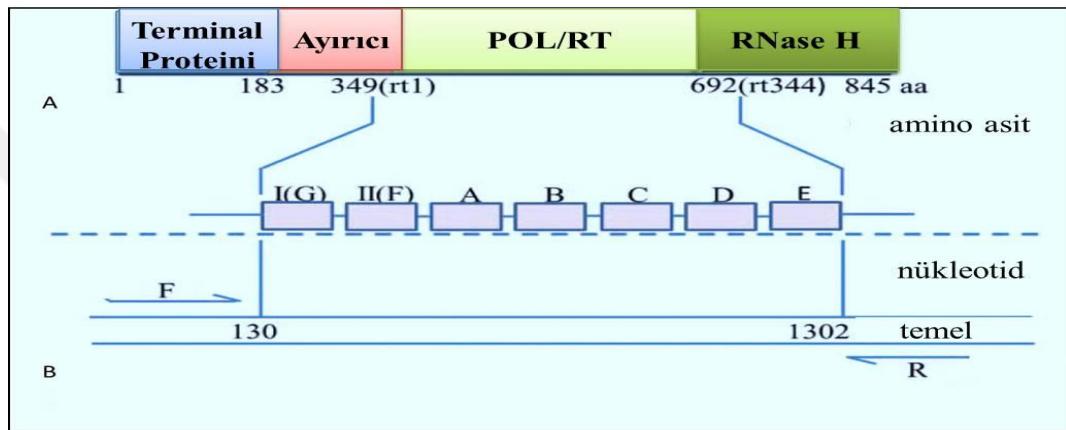
No.	Ürün Adı	Şirket	Menşei
1	Agarose	US biological	Amerika Birleşik Devletleri
2	DNA/RNA dekontaminasyon Spreyi	Bio-world	Amerika Birleşik Devletleri
3	Etanol %70	AMRESCO	Amerika Birleşik Devletleri
4	Etanol %100	Scharlab S.L.	İspanya
5	Etidyum bromür	Bio-world	Amerika Birleşik Devletleri
6	Nükleaz içermeyen su	Bio-world	Amerika Birleşik Devletleri
7	TBE (Tris-borat-EDTA) tampon	Dongsheng biotech	Çin
8	DNA yükleme boyası	Dongsheng biotech	Çin

3.1.4 Primer tasarımı

HBV'nin DNA polimeraz-ters transkriptazı (polimeraz (P), DNA sentezine başlangıç yapmak için terminal protein (TP), bir ara bölge, ters transkriptaz (RT) ve ribonükleaz H (RNaseH) olmak üzere dört bölümden oluşur. Bir dizi primer çifti, RT'nin uzunluk dizilerinin DNA fragmanını çoğaltmak için tasarlanmıştır (Yongqing *et al.* 2016) (Şekil 3.1). PCR şu şekilde yapılmıştır: 94°C, 3 dakika: 94°C 30 saniye :56°C, 50 saniye: 72°C,

50 saniye, 35 saniye: 72 °C 10 dakika. Tüm PCR primerleri, Çizelge 3.4'te gösterildiği gibi amplifikasyon ve DNA dizilimi için tasarlanmıştır. Her primer, 100 pmol/ul'lık bir stok konsantrasyonuna seyreltildi ve bir sonraki adım için -20°C'de tutuldu.

PCR, üreticinin tavsiyelerine göre Q5® Yüksek Doğrulukta 2X Ana Karışım (BioLabs, İngiltere) ile gerçekleştirildi. Primer çiftleri ile çoğaltılan PCR ürünleri, jel saflaştırması için %1.2 agaroz jel üzerinde elektroforeze tabi tutuldu ve -70°C'de saklandı.



Şekil 3.1 Hepatit B virüsü DNA POL/RT uzunluğunun polimeraz zincir reaksiyonu amplifikasyonu için primerlerin yeri

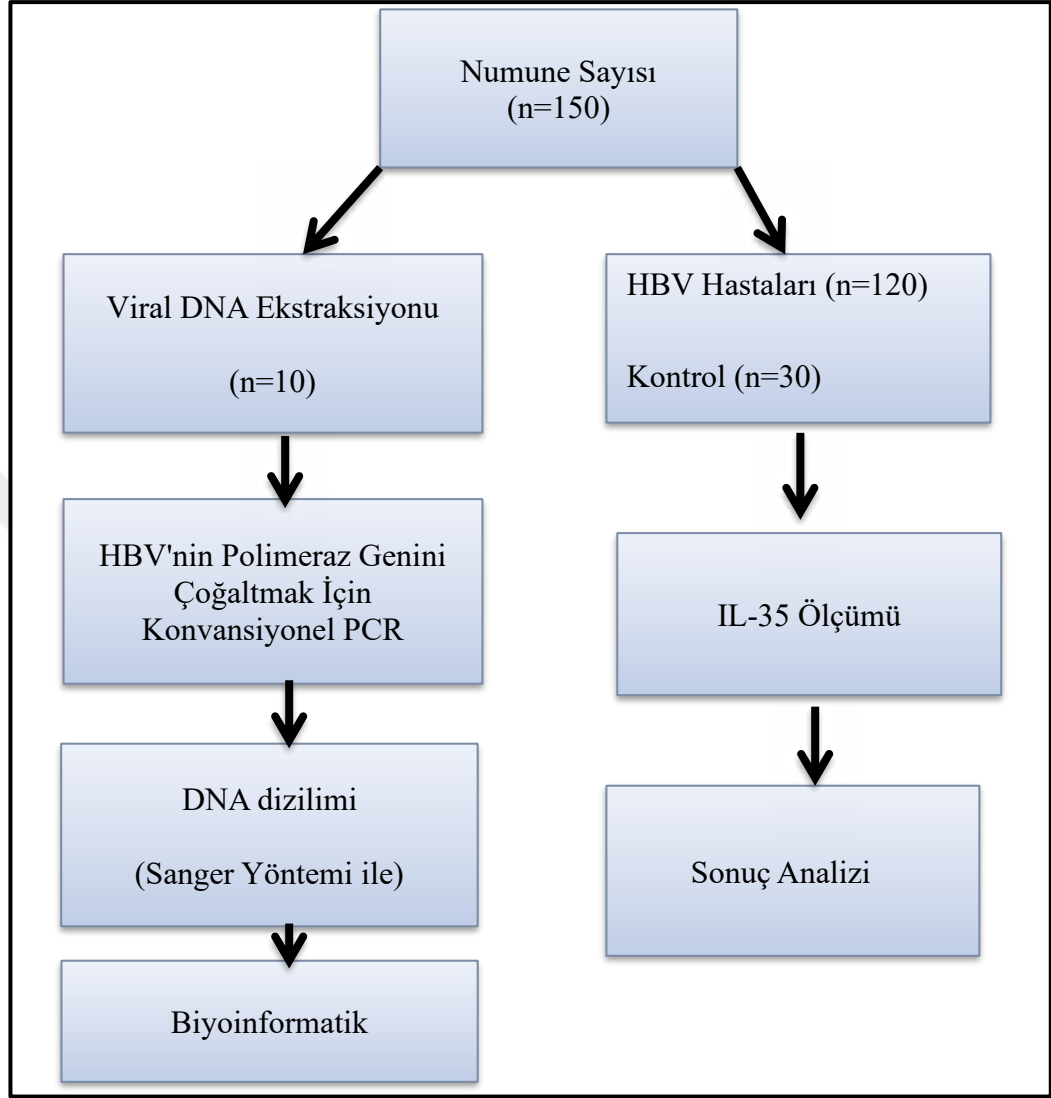
(A) 7 alan bölgesi içeren polimerazın RT bölgesinin şematik yapısı. (B) Tasarlanan astarların yeri. RT bölgesinin 130 ila 1302 baz çifti için nükleotid dizisi, NCBI Referans Dizisinden (Erişim No. NC_003977) çıkarılır.

Çizelge 3.4 PCR ve dizileme primer seti

Astar	Nükleotid Dizisi	
PCR Primer	F	5-CTGCTGGTGGCTCCAGTT-3
	R	5- GCTAGGAGTTCCGCAGTATGG-3
Sıralama Primer	F	5-CTGCTGGTGGCTCCAGTT-3
	R	5- GCTAGGAGTTCCGCAGTATGG-3

3.1.5 Deney tasarımı

Çalışmanın deneysel modeli şekil 3.2’de özetlenmiştir.



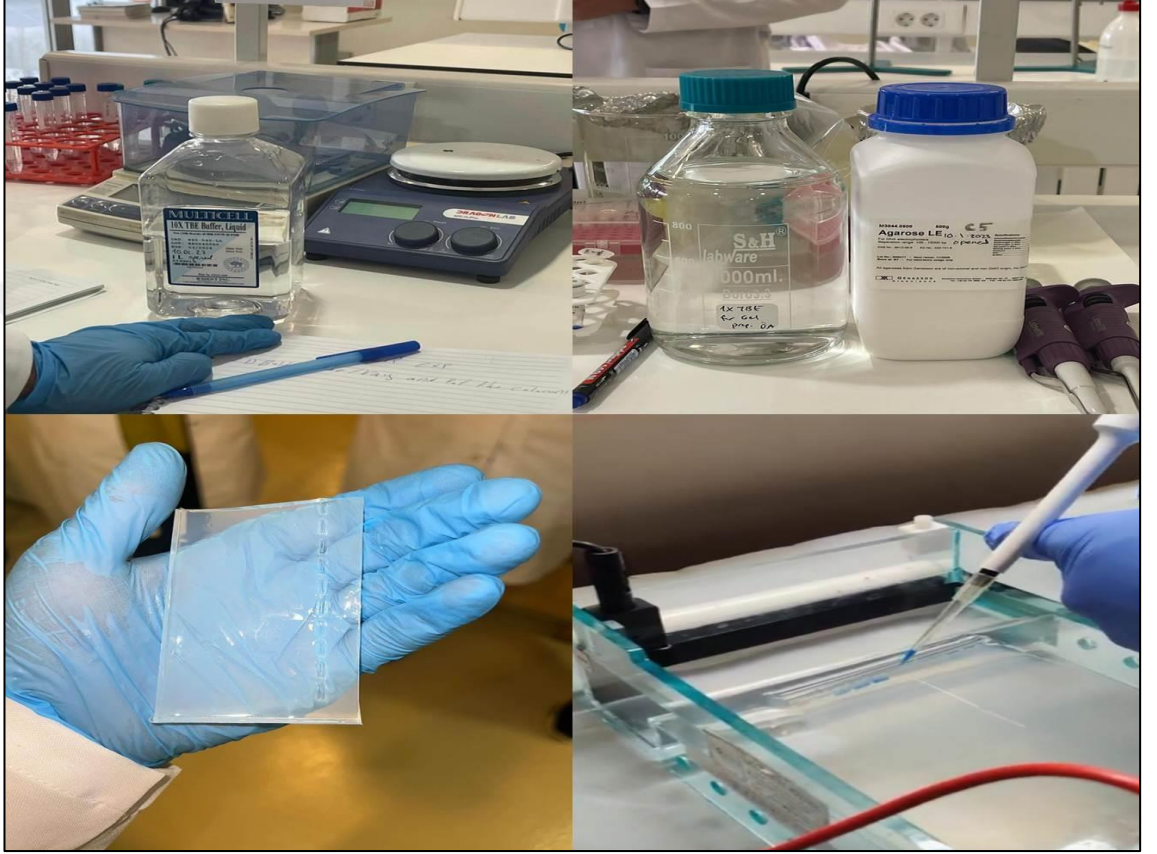
Şekil 3.2 Araştırmanın deneysel modeli

3.2 Yöntemler

3.2.1 Tamponların ve reaktiflerin hazırlanması

3.2.1.1 Tris- borat- EDTA (TBE) tamponu

TBE tamponu (10X), (Dongsheng, Chinna) tarafından sağlanmıştır. Bu çözelti, verilen TBE-10x tamponunun 100 ml'si alınacak, 900 ml distile su ile iki dakika karıştırılarak homojen bir TBE (1X) tamponu elde edilerek hazırlandı ve agaroz jel elektroforezi için kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında saklandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Jel Elektroforezi

3.2.1.2 %1 Agaroz jel hazırlanması

100 mL 1X TBE içeren bir behere bir gram agaroz eklendi. Karışım mikrodalga fırında çözünene kadar ısıtıldı. Daha sonra beher çıkartıldı ve agaroz karışımı karıştırıldı. Beher tekrar mikrodalga fırına koyuldu ve kaynama sağlandı, hiç kabarcık oluşmadığında fırından çıkarıldı. Agaroz yaklaşık 50°C'ye kadar soğuması için bekletildi ve ardından her 100 mL agaroz jeli için 2.5 mikrolitre TBE X10 çözeltisinden etidyum bromid eklendi (Sambrook ve Russell 2001).

3.2.1.3 PCR primerleri

1. Liyofilize primer tüpleri, peletlenmiş oligonükleotidin kaybolmasını önlemek için açılmadan önce döndürüldü, ardından her bir PCR primeri için 100 µM (mikromolar) stok primer çözeltisi nihai konsantrasyonuna ulaşana kadar nükleaz içermeyen su ilave edilerek primerler yeniden süspanse edildi.
2. Her PCR prime için etiketli ayrı, yeni, steril ve nükleaz içermeyen, 1 ml'lik mikrosantrafütü tüpü, 10µM çalışma solüsyonu oluşturmak üzere her bir primer stoğu için 10 µl'ye 90 µl (mikrolitre) nükleaz içermeyen su eklenerek seyreltilti.
3. Her bir primerden eşit miktarda etiketli mikrosantrifütü tüpüne eklenerek karışım primerini hazırlandı, tüm hacim yukarı ve aşağı 10 kez pipetleyerek iyice karıştırıldı ve saklama için -20 C°'de tutuldu.

3.2.2 DNA ekstraksiyonun sterilizasyonu

Steril durumda olması gereken tüm plastik eşyalar, cam eşyalar ve aletler 20 psi'de 15 dakika otoklavlandı. Pipet uçları ve mikrosantrifütü tüpleri otoklavda 1,5 atmosfer basınçda 15 dakika sterilize edildi. Kabin %70 etanol ile silindi ve ardından çalışma yüzeyinin nükleaz aktivitesini temizlemesine ve uzaklaştırmasına izin vermek için çalışmaya başlamadan önce nükleaz dekontaminasyon spreyi uygulandı.

3.3 Örnekleme

3.3.1 Örnek koleksiyon

Çalışmaya dahil edilen kişiler Mayıs-Eylül 2022 tarihleri arasında Al-Muthanaa Eyaletindeki halk sağlığı laboratuvarı, diyaliz merkezi, talasemi merkezi, kan bankası ve

Al-Hussain Eğitim Hastanesi'ne gelen hastalardan seçildi. 5 cc'lik şırınga ve iğne kullanılarak hastalardan 5 mL kan alındı. Tam kan örnekleri (n=150), HBV'li 120 hasta (67 erkek ve 53 kadın) ile farklı yaş gruplarında (20-75 yaş) 30 sağlıklı kontrol (18 erkek ve 12 kadın) grubu olarak ayrıldı. Hepatit B virüsü, qPCR tekniği ile ölçülmüş pozitif ve negatif numuneler tespit edilmiştir. Hasta grup, hastane klinik testlerine göre kronik ve akut olarak sınıflandırıldı.

Serumları ayırmak için kan örnekleri 1500 devirde 3 dakika santrifüj edildi. Örneklerin serum IL-35 seviyeleri IL-35 ELISA kiti kullanılarak ölçüldü. Viral DNA, PCR ve sekanslama teknikleri ile belirlenen serum örneklerinden ve genotiplerden izole edildi.

3.3.2 Veri toplama

Her hasta tarafından bir veri koleksiyonu hazırlandı ve kullanıldı. Yaş, medeni durum, kan transfüzyonu öyküsü, diş prosedürleri öyküsü, cerrahi operasyon öyküsü, dövme geçmişi dahil olmak üzere veriler yüz yüze görüşmeler yoluyla toplandı.

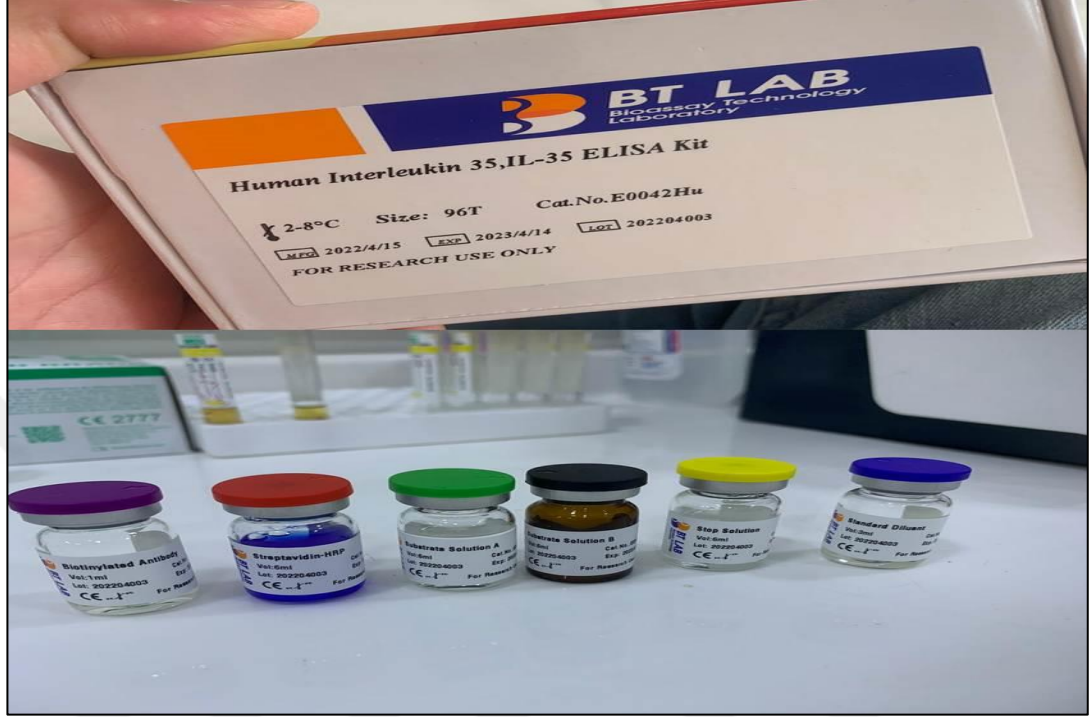
3.4 Serum IL-35 Düzeylerinin Ölçümü

Örneklerin serum IL-35 seviyeleri, IL-35 ELISA kiti ((BT Lab Bio assay Technology Laboratory (Shanghai, China) cat no. E0042Hu) kullanılarak kit protokollerine göre kullanılarak ölçüldü. IL-35 seviyeleri, standart bir eğriye dayalı olarak hesaplandı.

3.4.1 IL-35 ELISA kitinin test prensibi

Bu kit bir Enzime Bağlı İmmünosorbent testidir (ELISA) (Şekil 3.4). Plaka, insan IL-35 antikoruna ile önceden kaplanmış. IL-35 eklendi ve kuyucuklarda kaplanmış antikorlara bağlandı. Daha sonra biyotinlenmiş insan IL-35 antikoruna eklendi ve numunedeki IL-35'e bağlanmaktadır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklendi ve biyotinlenmiş IL-35 antikoruna bağlandı. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış Streptavidin-HRP bir yıkama aşaması sırasında yıkandı. Daha sonra substrat solüsyonu eklendi ve insan IL-35 miktarı

ile orantılı olarak renk gelişti. Reaksiyon, asidik stop solüsyonu eklenerek sonlandırıldı ve absorbans 450 nm'de ölçüldü.



Şekil 3.4 IL-35 ELISA kiti

3.5 Serum Örneklerinden Viral DNA Ekstraksiyonu

FavorPrep™ M Viral Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti I (Favorgen Biotech (Tayvan) kat no. FAVNK 001-1) (Şekil 3.5) kullanılarak aşağıdaki adımlar izlenerek viral DNA ekstrakte edildi:

1. 140 µl numune (serum) bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
2. Örneğe 570 µl VNE Buffer eklendi, vorteksleyerek iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
3. 570 µl etanol (%96~100) numune karışımına ilave edildi, vorteksleme ile iyice karıştırıldı.

4. Bir VNE kolonu, bir toplama tüpü ile birleştirildi. 700 µl numune karışımı (etanol eklendi) VNE Kolonuna aktarıldı, 8.000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi ve ardından akış atıldı.
5. Numune karışımının geri kalanı (etanol eklendi), VNE Kolonuna aktarıldı, 8,000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi, VNE Sütunu, yeni bir toplama tüpü ile birleştirildi.
6. VNE Kolonuna 500 µl yıkama tamponu 1 (etanol eklendi) eklendi, 8.000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi ve ardından akış atıldı.
7. VNE Kolonuna 750 µl yıkama tamponu 2 (etanol eklendi) eklendi, 8.000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi ve ardından akış atıldı.
8. Yedinci basamak tekrar edildi. VNE sütununa 750 µl yıkama tamponu 2 (etanol eklendi) eklendi, 8.000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi ve ardından akış atıldı. VNE Kolonu, kullanılmış toplama tüpü ile birleştirildi.
9. VNE kolonunu kurutmak için 3 dakika daha tam hızda (~18.000 X g) santrifüjlendi.
10. VNE Kolonu, bir elüsyon tüpü ile birleştirildi. VNE Kolonunun membran merkezine 50 µl önceden ısıtılmış RNaz içermeyen su ilave edildi. VNE Sütunu 2 dakika bekletildi.
11. Nükleik asidi ayrıştırmak için 2 dakika santrifüjlendi.
12. Nükleik asit -70 °C'de saklandı.

Şekil 3.5 Viral DNA Ekstraksiyonu işlemi

3.6 PCR amplifikasyonu

Ekstre edilen DNA, primerler ve PCR ön karışımı vortekslendi ve santrifüjlendi. PCR karışımı, toplamda 50 µL hacimde, 25 µL PCR premiksi içeren bir şekilde hazırlandı. Her bir primerden 2,5 µL ve şablon DNA'dan 5 µL kullanıldı. Hacim, nükleaz içermeyen su eklenerek 50 µL'ye tamamlandı. Çizelge 3.5'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.5 PCR reaksiyonunun bileşenleri

Bileşenler	Reaksiyon Hacmi	Nihai Konsantrasyon
Q5 Yüksek Doğrulukta 2X Ana Karışım	25 µL	1X
10 µM İleri Primer	2.5 µL	0.5 µM
10 µM Ters Primer	2.5 µL	0.5 µM
Şablon DNA'sı	değişken	< 1,000 ng
Nükleazsız Su	50 µL'ye kadar	–

Tüpler PCR'a koyuldu. Kapağı kapatıldı ve PCR koşullarını gösteren Çizelge 3.6'yı takip eden amplifikasyon programı çalıştırıldı.

Çizelge 3.6 PCR programı reaksiyonu

PCR adımı	Sıcaklık	Zaman	Döngü numarası
İlk Denatürasyon	98°C	30 saniye	
Denatürasyon	98°C	10 saniye	
Eşleştirme	67°C	30 saniye	35
Eklenti	72°C	30 saniye	
Son Uzatma	72°C	2 dakika	
Tutmak	4-10°C	–	–

Tutmak :Soğutma Amplifikasyon döngüleri tamamlandıktan sonra, termal döngüleyiciden çıkarılmadan önce reaksiyonu stabilize etmek için daha düşük bir sıcaklıkta (örn. 4-10°C) bir soğutma veya bekletme adımının olması yaygın bir durumdur. Bu, amplifiye edilmiş DNA ürünlerinin herhangi bir olası bozulmasını önlemeye yardımcı olabilir.

3.6.1 Konvansiyonel PCR ürün analizi

PCR ürünü, aşağıdaki adımlara göre agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi:

1. Agaroz jel %1, 1X TBE (100 µl) kullanılarak ve (1 g) içinde çözülerek hazırlandı, ardından 2 dakika mikrodalgaya konuldu. Daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.
2. Agaroz jel solüsyonuna 2.5 µl Ethidium bromide boyası eklendi.
3. Sabit taraftaki uygun konuma sabitlenmiş tarak sonra agaroz jel çözeltisi tepsiye döküldü, ardından oda sıcaklığında 15 dakika katılaşmaya bırakıldı. Daha sonra tarak nazikçe tepside çıkarıldı ve her bir tarak yuvasına 5 µl PCR ürünü eklenirken bir yuvaya 3.5 µl (100bp Merdiven) eklenmiştir.
4. Jel tepsi elektroforez haznesine sabitlendi ve 1X TBE tamponu ile dolduruldu. Daha sonra 100 voltta 15 dakika voltaj uygulandı, ardından 40 dakika 50 volta düşürüldü.
5. Konvansiyonel PCR ürünü 1230 bp, UV transillüminatör sistemi kullanılarak görüntülendi.

3.6.2 PCR ürünlerinin jel elektroforezi

PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Küçük hacimlerde (5-10 µl) PCR ürünleri, 1 gm agaroz 100 ml TBE tamponu içeren %1 (w/v) agaroz jelleri kullanılarak ayrıldı. PCR ürünleri 6x yükleme boyası ile karıştırıldı. 100 bp'lik bir DNA merdiveni (BioLabs) (3,5 µl merdiven, numunelerin göçünü izlemek ve PCR ürünlerinin boyutunu belirlemek için) bir moleküler işaretleyici olarak kullanıldı. Jeller 100V'ta 15 dakika çalıştırıldı, ardından 40 dakika 50V'a düşürüldü. Bantlar daha sonra bir UV transillüminatör sistemi kullanılarak görselleştirildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 PCR amplifikasyonu

3.7 Sıralama

DNA polimeraz gen dizilemesi için 10 adet konvansiyonel PCR ürünü örneği, genetik analizör üzerinde ileri ve ters primerler kullanılarak ve Sanger dizileme yöntemi kullanılarak hizmet alımı ile yapıldı.

3.8 Biyoinformatik

3.8.1 Çoklu sekans hizalama

Yerel Hepatit B virüsü klonlarında (No.1-No.10) ve NCBI-Genbank Hepatit B virüsü klonlarında kısmi Hepatit B virüsü polimeraz dizisinin çoklu dizi hizalama analizi (MEGA 6.0, çoklu hizalama analiz aracı), ve ClustalW hizalama analizi kullanıldı (Alestig et al. 2001).

3.8.2 Filogenetik ağaç analizi

Yerel Hepatit B virüsü klonları ve NCBI-BLAST Hepatit B virüsü klonları arasındaki genetik ilişkinin incelenmesi için kullanılan Hepatit B polimeraz geni kısmi dizisine

dayanan filogenetik ağaç analizidir. Filogenetik ağaç, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA ağacı) kullanılarak (MEGA 6.0 sürümünde) oluşturuldu (Yu et al. 2010).

3.9 İstatistiksel Analiz

Tüm sonuçların analizinde MiniTab18 yazılımı ve Microsoft Excel kullanılmıştır. ANOVA test, gruplar arası farklılıkları test etmek için kullanılmıştır. Karşılaştırmalı analizler Ki kare testi kullanılarak yapılmıştır. 0.05'ten küçük p değeri anlamlı kabul edilmiştir.



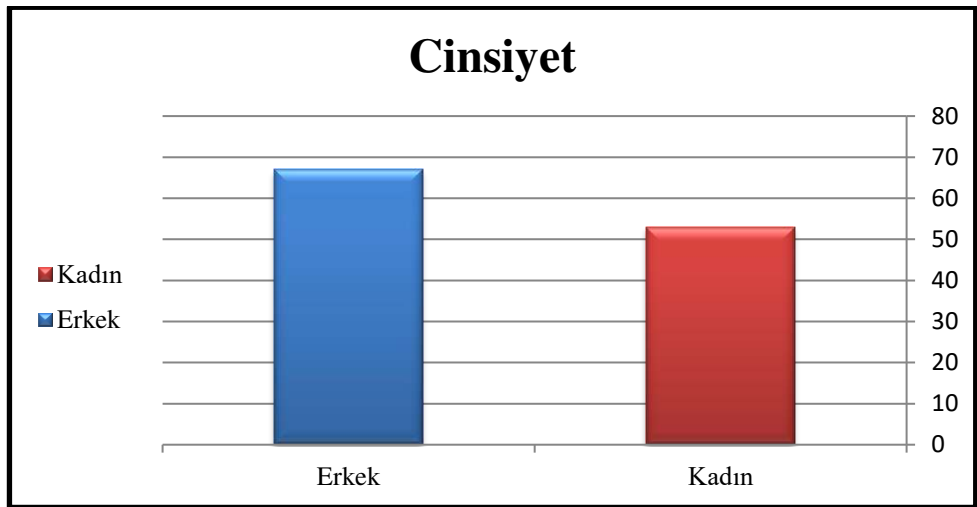
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Hastalar

Toplam 150 hastadan toplanan serum örneklerinden HVB grubunu oluşturan 120 hasta için HBV pozitifliği test edildi. HBV ile enfekte çalışma hastalarının klinik özellikleri Çizelge.4.1 'de verilmektedir.

Çizelge 4.1 HBV ile enfekte çalışma hastalarının klinik özellikleri

Değişkenler		Sayı	Yüzde %
Hastalık durumu	Akut	36	30
	Kronik	84	70
Cinsiyet	Erkek	67	56
	Kadın	53	44
Medeni durum	Evli	102	85
	Bekar	18	15
Kan nakli	Yes	10	8
	Hayır	110	92
Cerrahi operasyon	Evet	20	17
	Hayır	100	83
Dış prosedürleri	Evet	33	27.5
	Hayır	87	72.5
Dövme	Evet	14	12
	Hayır	106	88



Şekil 4.1 Cinsiyete göre HBV hastaları

Çizelge 4.2 HBV hastalarıyla ilişkili klinik faktörlerin ki-kare analizi

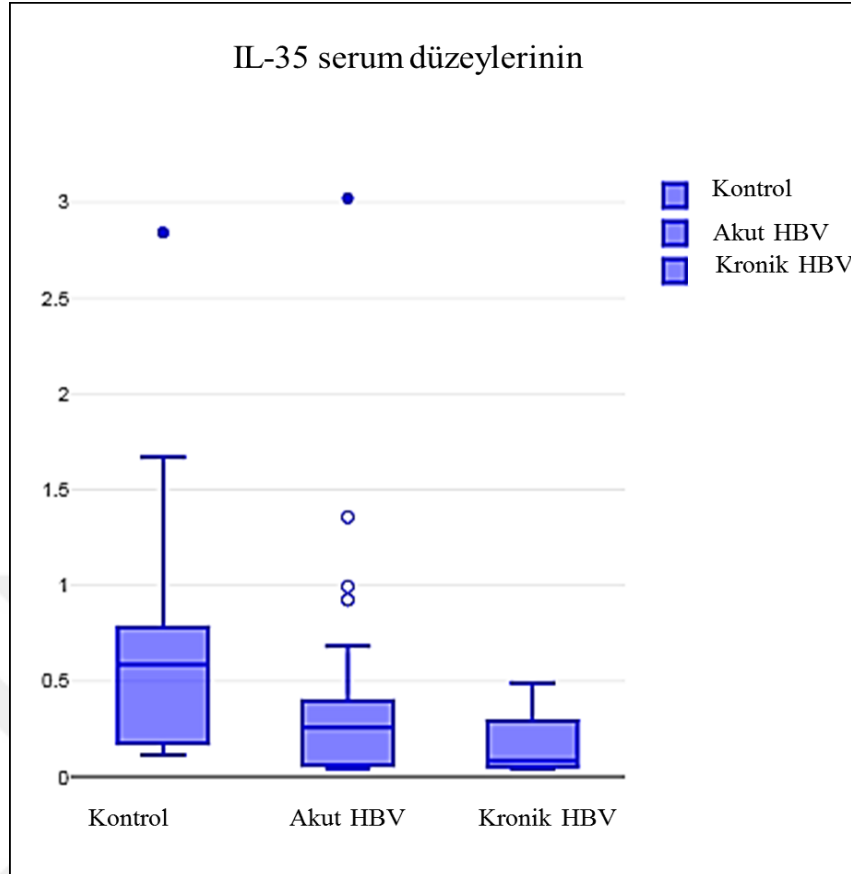
Değişken		Grup						Sig.	
		Hasta		Kontrol		Toplam		χ^2	p-değeri
Cinsiyet		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	0.1697	0.680393
	Erkek	67	56	18	60	85	56.7		
	Kadın	53	44	12	40	65	43.3		
	Toplam	120	100	30	100	150	100		
Yaş	20Y	24	20	7	23.3	31	23.3	0.2665	0.875264
	30-40Y	66	55	15	50	81	27.1		
	≥50 Y	30	25	8	26.6	38	25.3		
	Toplam	120	100	30	100	150	100		

4.2 IL-35 Sonuçları

IL-35 konsantrasyonu, ticari IL-35 ELISA kitleri (BT Lab Bio assay Technology Laboratory (Shanghai, China) ile ölçüldü.

IL-35'in HBV enfeksiyonu sürecinde bir rol oynayıp oynamadığını araştırmak için önce HBV hastalarında IL-35'in serum konsantrasyonlarını belirledik. HBV hasta grubundaki serum IL-35'in kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olması, IL-35 ile HBV enfeksiyonu arasındaki potansiyel ilişkiyi düşündürmektedir.

Ayrıca IL-35'in serum seviyesi kronik HBV hastalarında sırasıyla akut ve sağlıklı kontrol ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 4.2: Çizelge 4.3).



Şekil 4.2 Akut ve sağlıklı kontrol ile karşılaştırıldığında kronik HBV hasta grubunda IL-35 serum düzeylerinin kutu grafiği

Çizelge 4.3 Kronik HBV hastalarında, akut ve sağlıklı kontrolde serum IL-35 düzeyi için ANOVA test sonuçları

Kaynak	SS	df	MS	
Gruplar arasında	5.034	2	2.517	$F = 17.45443$
Tek grup içinde	21.198	147	0.1442	
Toplam	26.232	149		

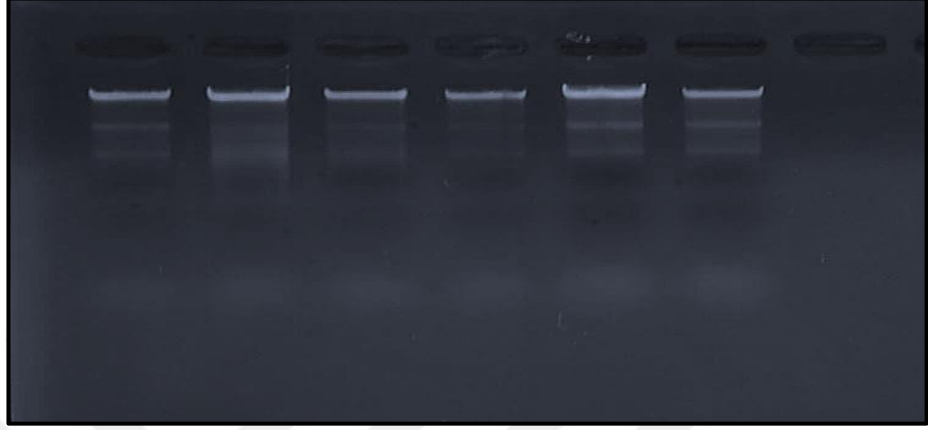
* f oranı değeri 17,45443'tür. p değeri < .00001'dir. Sonuç, $p < .05$ 'te anlamlıdır. (ss-kare toplamı, df-derece serbestlik, ms- ortalama kare).

4.3 HBV'nin Moleküler Çalışması

4.3.1 Serum örneğinin viral DNA ekstraksiyonu

Viral Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti kullanılarak yapıldı. Şekil 4.3'te gösterildiği gibi agaroz jel elektroforezi üzerinde migrasyon yoluyla viral DNA verim değerlendirmesi

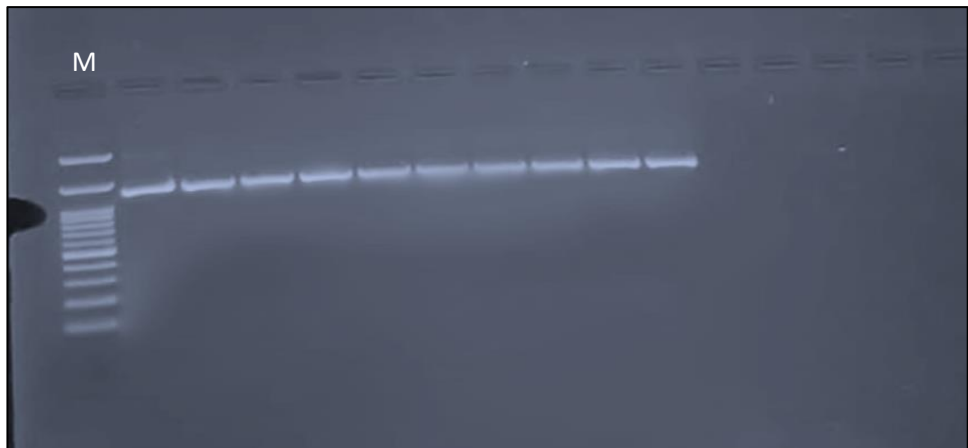
için HBV hastasının serum örneklerinden (n=10) viral DNA ekstrakte edilmiştir. Serum örneklerinden viral DNA izolasyonu %1 agaroz jelde 100 voltta 15 dakika elektroforez ile yapıldı.



Şekil 4.3 Agaroz jel üzerinde Viral DNA izolasyonu

4.3.2 HBV'nin DNA polimeraz genlerinin PCR amplifikasyonu

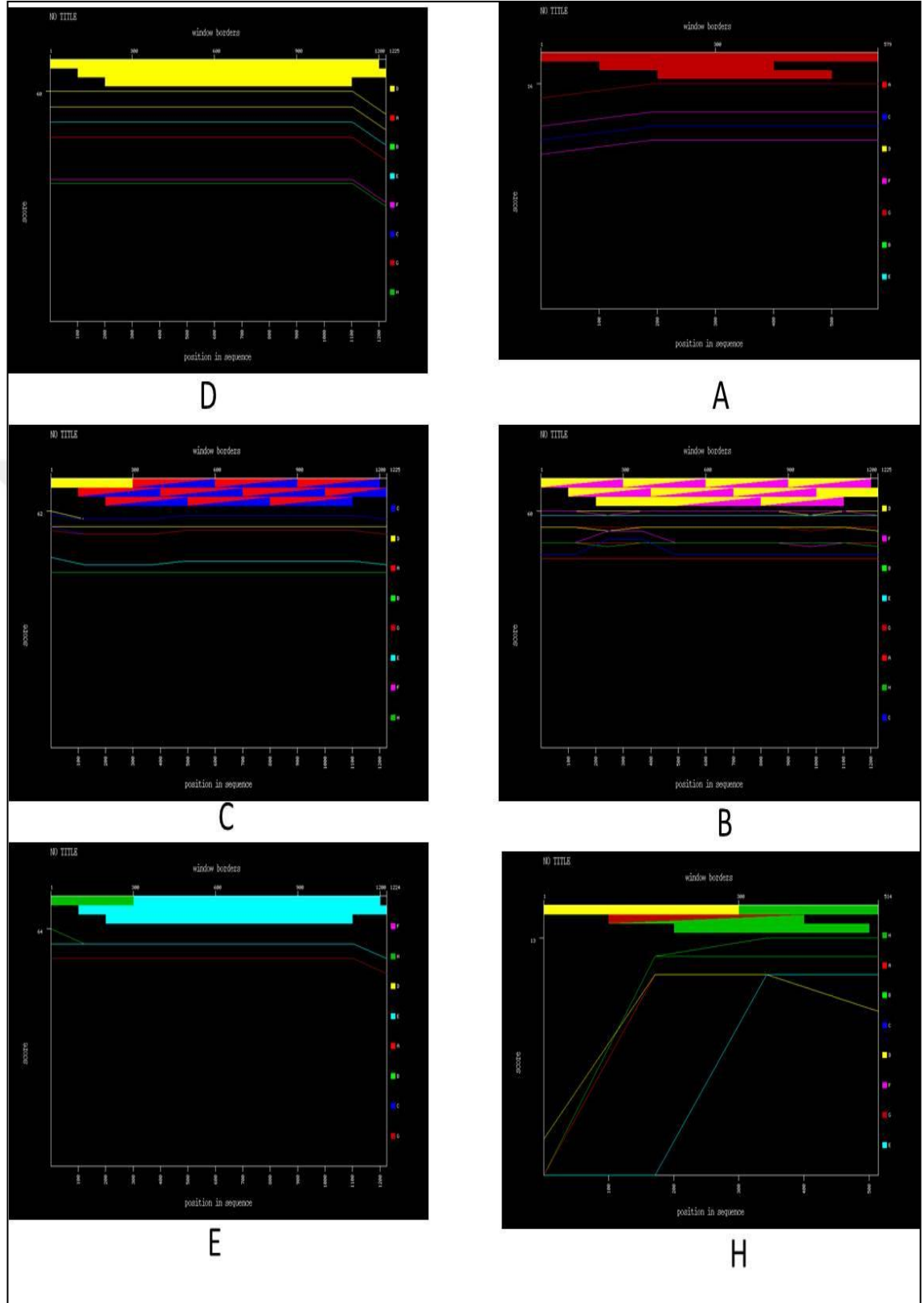
HBV'nin DNA polimeraz genleri spesifik forward ve reverse primerler kullanılarak amplifiye edildi. PCR ürününün moleküler ağırlığı agaroz jel üzerinde ayrıldı (Şekil 4.4). PCR ürünleri %1'lik agaroz jel üzerinde 100 voltta 15 dk ayrıldı ve daha sonra 40 dk 50 volta düşürüldü.



Şekil 4.4 PCR ürünleri %1'lik agaroz jel üzerinde

4.4 Iraklı Hastalarda HBV Genotiplerinin Belirlenmesi

Hepatit B virüsü, tam genom dizisinin % 8'den fazlasındaki farka dayalı olarak 8 genotipe (A'dan H'ye) sınıflandırılır (Guirgis, B.S. *et al.* 2010). Genotipler, Alt Tip A dahil olmak üzere 8 HBV alt tipi için 23 HBV genomik DNA referans sekansı içeren NCBI veritabanında (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping) bulunan HBV sekansları kullanılarak analiz edildi (Erişim No. X02763, X51970, AF090842), Alt Tip B (Erişim No. D00329, AF100309, AB033554), Alt Tip C (Erişim No. X04615, M12906, AB014381), Alt Tip D (Erişim No. X65259, M32138, X85254), Alt Tip E (Erişim No. X75657, AB032431), Alt Tip F (Erişim No. X69798, AB036910, AF223965), Alt Tip G (Erişim No. AF160501, AB064310, AF405706) ve Alt Tip H (Erişim No. AY090454, AY090457, AY090460). (Şekil 4.5)

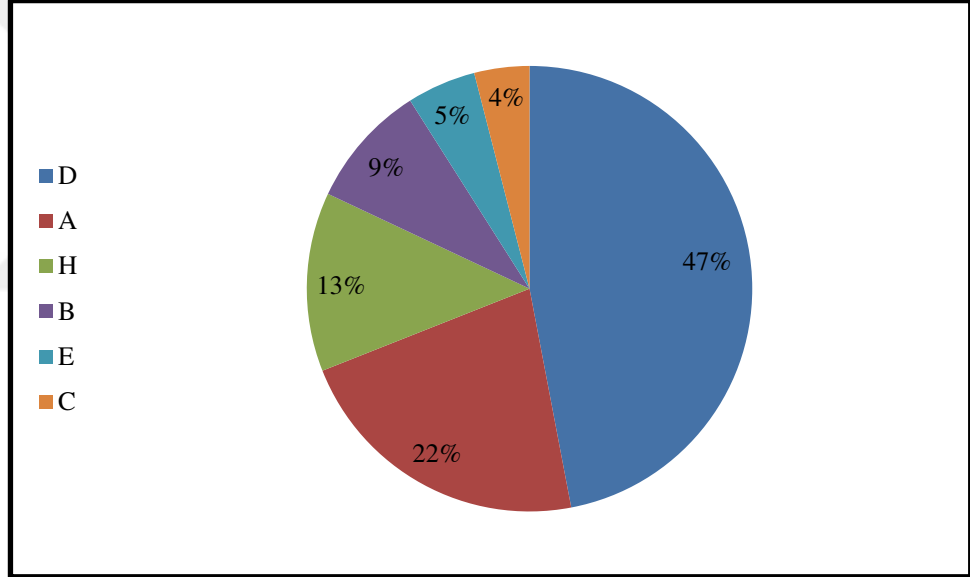


Şekil 4.5 HBV genotip analizi

DNA polimeraz genlerinin PCR ürünleri kullanılarak yapılan genotipleme, Al-Muthanaa, Irak'tan 10 vakada genotiplerin (A, B, C, D, E ve H) mevcut olduğunu ortaya çıkarmıştır. Genotip D'nin baskın genotip olduğu gösterilmiştir. (Şekil 4.5, Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Iraklı hastalarda HBV genotipinin dağılımı

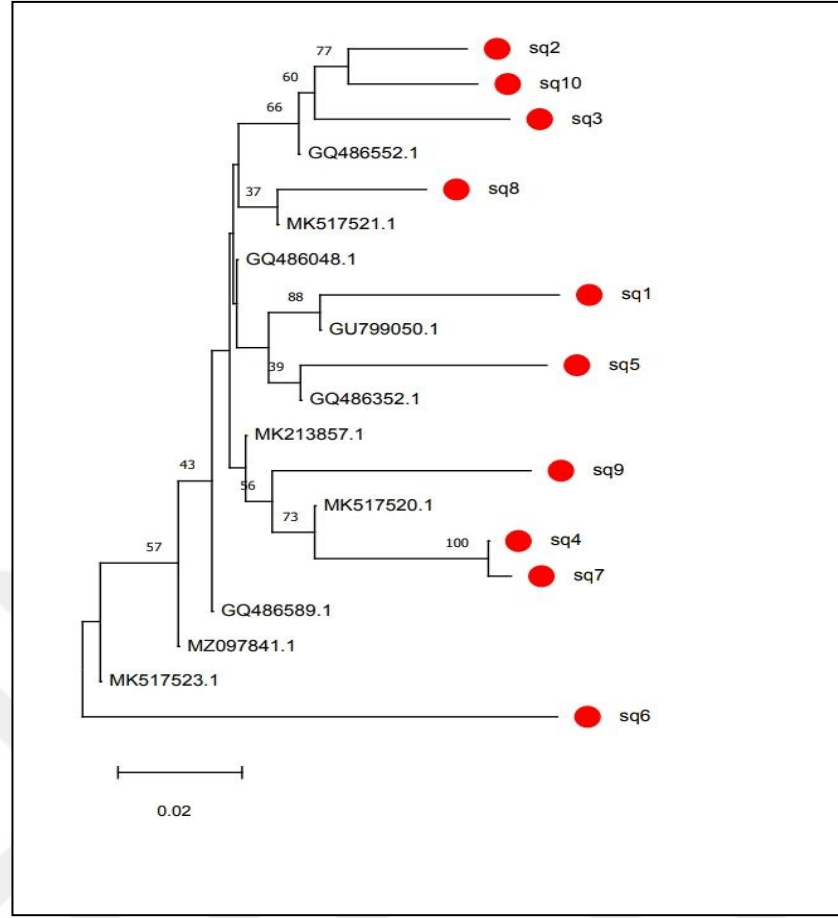
Genotip	Yüzde
D (Saf + Karışık)	47%
A (Saf + Karışık)	22%
H (Karışık)	13%
B (Saf + Karışık)	9%
E (Saf + Karışık)	5%
C (Karışık)	4%



Şekil 4.6 Hastalarda HBV genotipinin dağılımı

4.5 Filogenetik Analiz

Deoksiribonükleik asit (DNA) dizileme analizi sonuçları, filogenetik ağaç analizine dayalı Hepatit B virüs klonlarını ve yerel Hepatit B virüs klonları ile NCBI-Blast Hepatit B virüsü arasında (MEGA 6.0) kullanılarak Clustal W hizalama analizini içermektedir. Lokal Hepatit B virüsü klonlarında (No.1-No.10) ve NCBI-Genbank Hepatit B virüsü klonlarında (No.11-No.20) kısmi Hepatit B virüsü polimeraz dizisinin ClustalW



Şekil 4.8 Kısmi Hepatit B polimeraz genine dayalı filogenetik ağaç analizi

Yerel Hepatit B virüsü klonları ve NCBI-BLAST Hepatit B virüsü klonları arasındaki genetik ilişkinin incelenmesi için kullanılan dizi, filogenetik ağaç, (MEGA 6.0 versiyonunda) aritmetik ortalama (UPGMA ağacı) ile ağırlıksız çift grup yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Yerel Hepatit B virüsü klonları virüsü (MK517520.1, GU799050.1, MK517523.1, GQ486552.1, MK517521.1, GQ486352.1, MZ097841.1, GQ486048.1, MK213857.1 GQ486589.1) arasında değişmektedir.

4.6 Tartışma

4.6.1 Demografik özellikler

HBV enfeksiyonları, dünya genelinde insanlar arasında en yaygın bulaşıcı hastalıklardan biridir. Enfeksiyonlar, akut hepatitiden klinik olarak asemptomatik kronik enfeksiyona

kadar geniş bir klinik özelliğe sahiptir ve bazen kronik hepatit ve karaciğer sirozuyla ilerleyebilir (Dasarathy ve diğerleri 1992). HBV enfeksiyonunun yaygınlığı, genetik çevresel ve konak faktörlerin yapısında bağlı olarak ülkeden ülkeye değişmektedir.

Farklı popülasyonlarda HBs antijeni (HBsAg) pozitifliği yaygınlığı %0.5'ten %20'ye kadar değişmektedir. Yapılan bir çalışmada, yerel doktorlarda %6.42 taşıyıcılık bildirilmiştir (Ameen ve diğerleri 2005). Delhi'de yapılan başka bir çalışmada, kardiyak cerrahi için kan transfüzyonu alan hastalarda %6.9 transfüzyonla ilişkili hepatit (TAH) rapor edilmiştir; toplam TAH vakalarının %20'si HBV ile ilişkilidir (Tarky ve diğerleri 2013).

Hepatit B virüsünün yayılması dünya genelinde endişe verici bir hızda devam etmektedir ve bu birçok ülke üzerinde etki yaratmaktadır. Pakistan'da HBV'ye maruz kalma oranı tam olarak onaylanmamış olsa da (Idrees ve diğerleri 2010), farklı hepatit B belirteçlerinin ~%38 yaygınlığı, %4 HBsAg taşıyıcı oranı ve doğal dönüşümle anti-HBV yüzey antikorları (Anti HBs Ab) ile %32 olarak bildirilmiştir (Idrees ve diğerleri 2010). Düşük ekonomik statüye sahip coğrafi bölgelerde yüksek HBV yaygınlığı gözlenmiştir, bu da bu hastalığın kontrol edilmesinin önemini vurgulamaktadır (Akbar ve diğerleri 1997; Tarky ve diğerleri 2013).

HBV, doğum sırasında anneden yeni doğan bebeğe bulaşabilir. Bunun yanı sıra, cinsel yolla, kan ve kan ürünleri transfüzyonu ve iğneler aracılığıyla kontamine kanla temas yoluyla bulaşabilir (Papastergiou ve diğerleri 2015). Virüsün bir topluluktan diğerine bulaşma şekli, normlara, geleneklere ve sosyal faktörlere göre değişiklik gösterir. Çin'de yapılan 8000'den fazla katılımcıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, erkek cinsiyetin, ileri yaşın ve cerrahi operasyon öyküsünün HBV pozitifliği yönünden yüksek riskle ilişkili olduğu bulunmuştur (Li ve diğerleri 2012).

Türkiye'de, diyaliz, HBV aile öyküsü ve HBV pozitif kişilerle cinsel temas, HBV enfeksiyonunu edinme risk faktörleri olarak bulunmuştur (Ozer ve diğerleri 2011). Irak'ta HBV enfeksiyonu risk faktörünü belirlemek için yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Yatılı bakım merkezleri (Mcintosh ve Bek 1997), dövme salonları (Jafari et al. 2012) ve berber dükkanları (Candan ve diğerleri 2002) gibi yerlerde de bulaşma gerçekleşebilir. Kreşlerde, okullarda, evlerde, kapalı kurumlarda veya yüksek riskli temas/çarpmışma sporlarında meydana gelen küçük kesikler veya ufak yaralar HBV bulaşmasına neden olabilir. Kronik HBV enfeksiyonu olan kişiler açık yaralardan virüsü çevresel yüzeylere yayarak açık lezyonlara sahip kişileri enfekte edebilirler (Nelson ve diğerleri 2016).

Yapılan çalışmada genç çocukların tükürük ve gözyaşı örneklerinde çok yüksek HBV DNA düzeyleri tespit edilmiş ve evde ve okullarda çocuklar arasında artan bir bulaşma hızına neden olmuştur (Komatsu ve diğerleri 2012). Evlerde, spor salonlarında, okullarda veya kapalı kurumlarda kronik hepatit B taşıyıcılarından bulaşma, küçük yaraların veya kesiklerin gazlı bezler veya bandajlarla kapatılmasıyla önlenir. Tıraş bıçakları, tırnak makasları, mutfak bıçakları, banyo havluları, diş temizleme araçları ve kısmen yenmiş yiyecekler gibi nesnelerin, semptom göstermeyen taşıyıcılar ve temaslar arasında paylaşılması önlenmelidir (Martinson ve diğerleri 1998).

HBV enfeksiyonu aşılama ile önlenabilir. HBV aşılama kapsamı, bir ülkeden diğerine değişmektedir ve tahmini kapsama oranı Afrika ülkelerinde %24 iken batı ülkelerinde %70'in üzerindedir (Bekondi ve diğerleri 2015). Irak'ta yapılan önceki bir çalışmada, sağlık çalışanı olan tüm katılımcıların aşılandığı gösterilmiştir (Hussein 2015).

Yaş, akut enfeksiyonun şiddeti ve yaşamın ilerleyen dönemlerinde kronik taşıyıcı durumun çeşitli sekellerinin görülme sıklığı üzerinde etkilidir. Özellikle, akut enfeksiyon yetişkinlerde daha şiddetli olmasına rağmen, bebeklerde ve okul öncesi çocuklarda kronik taşıyıcılık riski çok daha yüksektir ve bu da ileriki yaşlarda primer hepatoselüler karsinom ve siroz riskini artırır. Bu çalışmada yaş gruplarına göre genotip sıklık dağılımı yaş grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

Cinsiyet ile ilgili olarak, mevcut bulgu, erkek ve kadın hastalar arasında anlamlı bir fark olmadığını ($p=0,680$) (Çizelge 4.2) göstermiştir. Bu sonuçlar, (Abdulla ve Goreal 2016) tarafından yapılan önceki çalışma ile ilişkilidir. HBV enfeksiyonu prevalansının erkeklerde (91/135) kadınlardan (43/135) daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ismail *et al.*

(2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada, Mısır'da erkekler arasında HBV enfeksiyonu prevalansının daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Bu çalışma, Al-Rubaye ve diğerleri tarafından yapılan önceki çalışma ile uyumluydu, çünkü erkeklerde kadınlardan daha yüksek olduğunu ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bulmuşlardı (Al-Rubaye *et al.* 2016). Ayrıca başka bir çalışmada HBsAg prevalansının erkeklerde (%0,7) kadınlardan (%0,5) daha yüksek olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p=0,07$) belirtilmiştir. Kadın bağışçı sayısı erkeklerden çok daha az olmasına rağmen, HBsAg pozitifliği açısından erkek/kadın oranı 1,2'dir ve bu beklenen sonuçlarla uyumludur (Ataallah *et al.* 2011).

Tarafından yapılan bir çalışmada, erkeklerin hepatit (%44,20) ve kadınların hepatit (%16,6) ile enfekte olduğunu buldular, bu nedenle erkekler kadınlardan daha fazla hepatit enfeksiyonu olduğu görülmüştür ve bunun sebebi de erkeklerin kadınlardan daha sık kan bağışlaması olduğu düşünülmüştür (Nile *et al.* 2018). Çoğu insan popülasyonunda, erkeklerde kadınlara göre kronik hepatit virüsü taşıyıcılarının prevalansı daha yüksektir. Kadınların enfeksiyona yanıt olarak anti-hepatit üretme olasılığı erkeklerden daha fazladır. Artan taşıyıcı sıklığı ile ilişkili hastalıklar erkekler arasında daha yaygındır (Tanaka *et al.* 2006).

Bahsedilen cinsiyet orantısızlığı, erkeklerde birden fazla cinsel partner, uyuşturucu kullanımı ve hijyenik olmayan berber tıraş uygulamaları gibi yüksek riskli işlerin ve davranışların artan sıklığı ile açıklanabilir.

4.6.2 IL-35

HBV sitopatik olmayan bir virüs olduğundan, immün aracılı konak reaksiyonları hem HBV ile ilişkili karaciğer hasarında hem de viral kontrolde çok önemli bir rol oynar.

Sunulan sonuçlar, Irak HBV hastalarının mevcut örneğinde IL-35'in aşağı regüle edildiğini doğrulamıştır. Bu bağlamda, genellikle konak aracılı immün reaksiyonların viral kontrolde ve HBV enfeksiyonuna bağlı karaciğer hasarında belirgin bir rol oynadığı ileri sürülmektedir (Mohsen 2020).

Sitokinlerin, IL-12 sitokin ailesi dahil olmak üzere bu reaksiyonlara aracılık ettiği gösterilmiştir. Aile, beş sitokini kapsar; HBV gelişiminde hayati bir rol oynadığı bildirilen IL.6; IL.12; IL.23, IL.27 ve IL.35 (Peeridogaheh *et al.* 2018; Muhsen 2020; Yang *et al.* 2019) ve diğer enfeksiyonlar (Alkhanak *et al.* 2015).

IL-35, bu ailede yeni tanımlanmış bir sitokindir. Bu çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu olarak, son zamanlarda kronik HBV enfeksiyonlu hastalarda IL-35 ve IL-35'in serum düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir ve yazarlar IL-35'in HBV enfeksiyonunda olası bir rolü olduğunu öne sürmüşlerdir (Shi ve diğerleri 2015). Bu nedenle, HBV hastalarının periferik kanında anormal bir IL-35 regülasyonu öne sürülmektedir, ancak hastalardaki azalmış serum IL-35 seviyesini açıklamak için net bir mekanizma tanımlanmamıştır.

Önceki çalışmalar, serum IL-35 seviyesinin ALT ve AST ile negatif korelasyon gösterdiğini bulmuştur. IL-35 ile ALT ve AST arasındaki korelasyon, IL-35'in karaciğer hasarının yeni bir belirteci olarak çalışabilme olasılığını göstermiştir. Ayrıca bazı çalışmalarda IL-35'in hepatoselüler karsinom progresyonu (Long *et al.* 2016), saldırganlık ve nüks (Fu *et al.* 2016) ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. İnsanlarda IL-12 sitokin ailesinin tek üyesi olan IL-35'in, canlı organizmada aktive olduğunda yukarı regülasyon kapasitesine sahip olabileceği düşünülmektedir (Collison ve diğerleri 2012). IL-35, immünolojik, inflamatuvar ve enfeksiyon hastalıklarının yanı sıra tümör ilerlemesi açısından da önemli bir katkı sağlayabilir (Sakkas ve diğerleri 2018). IL-35'in fizyolojik etkileri, öncelikle Treg hücrelerinin proliferasyonunu ve genişlemesini indükleyerek ve Th17 hücrelerinin farklılaşmasını engelleyerek ortaya çıkar, ancak IL-35 ayrıca CD4+ efektör T hücresi aktivasyonunu baskılayarak tüm reaktif T hücresi yanıtlarında azalmaya neden olabilir (Hu ve diğerleri 2014).

Ayrıca, IL-35 aşırı ifadesi, Th1 hücrelerinin frekansında seçici bir azalmaya ve IL-10 üreten CD4+ T hücrelerinde artışa yol açar. HBV enfeksiyonu durumunda, IL-35'e yanıt olarak tümör nekroz faktörü- α , interferon- γ , IL-6, IL-22 ve IL-23 serum düzeyleri azalırken IL-10 artar (Huang ve diğerleri 2019). IL-35 ve immünsüpresif mekanizmalarının daha ileri anlaşılmasıyla, kalıcı kronik HBV enfeksiyonunun veya karaciğer hastalıklarının kötüleşmesinin kontrolü için hedefe yönelik immünoterapiler ve antiviral yaklaşımlar tasarlamak mümkün olacaktır. Bu nedenle, özellikle IL-35 alt birimlerinin gen ifadesine dayalı olanlar da dahil olmak üzere, HBV'nin immünopatogenezinde IL-35'in rolünü aydınlatmak için daha fazla çalışmaya kesinlikle ihtiyaç vardır.

4.6.3 Iraklı hastalarda HBV genotipleri

HBV genotiplerinin karakterizasyonu, hepatit B'nin doğal seyri hakkında daha iyi bir anlayışa katkıda bulunur, çünkü virüsün genetik heterojenitesi, klinik sonuçları etkileyen biyolojik özelliklere sahip olma eğilimindedir. HBV, yüksek genetik heterojeniteye sahiptir. Genomik DNA dizisi moleküler evrimsel analizine göre, çeşitli ülkelerde izole edilen HBV suşları A'dan J'ye kadar on genotipe ayrılmıştır ve bunların farklı coğrafi dağılımları vardır (Kurbanov ve diğerleri 2010). Genotip B ve C Okyanusya ve Asya ile sınırlıyken, genotip A ve D yaygın olarak bulunurken Afrika ve Avrupa'da en yaygın olanıdır (Zehender ve diğerleri 2014). E, F, G ve H gibi diğer genotipler de bazen Asya'da bulunur.

Kanıtlar giderek HBV genotipleminin HBV hastalık ilerlemesini öngörmek ve uygun antiviral tedaviyi belirlemek için önemli olduğunu göstermektedir. Genotipler A ve D ile akut enfeksiyon, genotipler B ve C'ye göre kronisite oranının daha yüksek olmasına yol açar (Wai ve diğerleri 2005). Genotip C genellikle perinatal enfeksiyon için bir risk faktörü olarak kabul edilir ve siroz ve HCC dahil olmak üzere ciddi karaciğer hastalığıyla ilişkilidir (Liu et al. 2014). İnterferon tedavisinde, genotipler A ve B'ye sahip hastalar, genotipler C ve D'ye göre daha iyi tedavi yanıtına sahiptir (Kao ve diğerleri 2000).

HBV'nin genotipleme işlemi, hasta gruplarının karakterizasyonu ve epidemiyolojik çalışmalar için önemlidir. Farklı HBV genotiplerinin klinik önemi, akut ve kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda giderek daha fazla tanınmaktadır (Mohebbi ve diğerleri 2012). Dahası, birkaç çalışma, pre-kor ve kor promotor bölgelerindeki mutasyonlarla HBV e antijeninin (HBeAg) üretimini ortadan kaldıran veya azaltan mutasyonlar arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir. HBV enfeksiyonunun seyri, konak genetik faktörler, yaş ve virüsün genetik değişkenliği gibi birkaç faktöre bağlıdır. Epidemiyolojik önemin yanı sıra, HBV genotipleri hastalık deseni ve tedaviye yanıt üzerinde etkili olabilir (Sunbul 2014).

Bu çalışmada HBV genotiplerinin hastalar arasındaki dağılım yüzdesi şu şekildeydi: D (Saf + Karışık), A (Saf + Karışık), H (Karışık), B (Saf + Karışık), E (Saf + Karışık) C(Karışık), yani en yaygın genotip D saf genotip (%47) ve ikinci sırada H genotip (%13), bununla birlikte A karışım genotip (%22) yaygındı, bunu D genotip, B, E ve C genotipi ayrıca örneklerde kaydedilmiştir (%9, %5, %4) (karışık olarak).

Bağdat'ta Ahmed (2013), KHB hastalarında genotip D'nin (%80) ve karışık genotip D+F'de (%20) baskın olduğunu bulmuştur. Oysa Basra Al- Aboudi ve Al-Hmudi (2015) genotip D'yi %92,3 olarak saptadı ve %7,69'unda D+E karışık genotiplere sahipti. Ayrıca Irak'ın Kürdistan bölgesi Duhok'ta (Abdulla ve Goreal 2016) genotip D'nin Duhok / Irak'taki ana genotipi genotip B takip etmektedir. Genotip D'ye sahip KHB hastalarının yüksek yüzdesi HBe Ag pozitifdir. Komşu ülkelerdeki HBV genotipleri hakkındaki raporlar şunu göstermektedir; İran'da (Yoosefi *et al.* 2016), 154/163 numunede (%94,5) ve 9/163 numunede (%5,5) genotip D'nin C/D genotip karışımına sahip olduğunu bulmuştur. Ürdün'de Genotip D, HBV ile enfekte olmuş tüm Ürdünlü hastalarda baskın genotipi temsil ediyordu (Hamoudi *et al.* 2016). Suriye'deki hastaların %97'sinin genotip D ile enfekte olduğu bulunmuştur (Antaki *et al.* 2010).

Suudi Arabistan'da 160 HBV hastası arasında en yaygın olanı Genotip D idi ve 135 (%84,4) hastada bulunmuş, bunu A (18; %11,3) ve E (7; %4,3) izlemiştir (Asaad *et al.* 2015). Umman'da HBV genotipleri D (130/170; %76,47) ve A (32/170; %18,28) Umman'da baskınken, HBV genotipleri C ve E daha az sıklıkta idi (her biri %1,18) (Al

Baqlani *et al.* 2014). Birleşik Arap Emirlikleri'nde 88 hastanın hepsinde (%100) HBV DNA en yaygın olanı genotip D (%79,5) idi, bunu genotip A (%18,2) ve genotip C (%2,3) izlemiştir (Alfaresi *et al.* 2010). Mısır'da, genotip D'nin toplam enfeksiyonların %87'sini (%100) oluşturduğunu, HBV-DNA pozitif olduğunu, diğer %13'ün D/F karışık enfeksiyonlarını gösterdiğini göstermiştir (Khaled *et al.* 2011). Pakistan'ın farklı bölgelerinde yürütülen on farklı araştırma, Pakistan'daki en yaygın HBV genotipinin %63,71'lik genel yaygınlık oranıyla genotip D olduğunu, ardından genotip A (%10,036), genotip C (%7,55) ve genotip B'nin (5,335) geldiğini göstermiştir. Karışık genotipler sırasıyla %2,377 ve %9,931 olmuştur (Ali *et al.* 2011). Asya'da A, C ve D'nin en baskın olduğu yedi genotip (A-G) belirlenirken, Avrupa ve Afrika'da A, C, D ve G genotipleri tespit edilmiştir. A+C ve C+D karışık genotipleri Asya'da, Avrupa'da C+D ve Afrika'da A+D baskındı (Toan *et al.* 2006).

F ve H genotipleri yalnızca Güney ve Orta Amerika'da tespit edilmiştir ve genotipi G, Fransa, Almanya; Meksika ve Amerika Birleşik Devletleri'nde tanımlanmıştır. Genotip A, Kuzey Amerika, kuzeybatı Avrupa, Sahra altı Afrika'da daha yaygındır ve Hindistan. Çin'de üç genotip B, C, D ve A bulunmuştur (Tonetto *et al.* 2009; Dupinay *et al.* 2010; Roman *et al.* 2010; Li *et al.* 2008).

Genotip D ile enfeksiyon, genotip A'dan daha şiddetli karaciğer hastalığı ile ilişkilidir (Amini ve diğerleri 2008). Akut hepatitte ana HBV bulaşma yolu, cinsel ilişki, sık uluslararası seyahat ve farklı etnik kökenden insanlarla temas gibi görünmektedir; (2010). Bu çalışma, HBV enfeksiyonundan mustarip hastaların D, C ve A gibi farklı genotiplerle enfekte olduğunu göstermiştir; bu da hepatit B ile enfekte vakalarda HBV genotipinin baskınlığında önemli bir değişiklik olmadığını düşündürmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

- IL-35'in serum seviyesi kronik HBV hastalarında sırasıyla akut ve sağlıklı kontrol ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalmıştır.
- Mevcut çalışma, cinsiyetin ve yaşın enfeksiyon sonucu üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermiştir.
- Mevcut çalışma, 6 genotip ile karışık genotipik enfeksiyon göstermiştir. Bu çalışma, hastalar arasında karışık genotiplerde genotip D'nin (%47) baskın olduğunu göstermiştir.

5.2 Öneriler

Irak'ta hepatit B virüsünün coğrafi dağılım genotipinin değerlendirilmesi için örnek sayısının fazla olduğu çalışmalara ve IL-35'in HBV ile ilişkisini ortaya koymak için daha ileri düzey ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Abdulla, I. M. and Goreal, A. A. 2016. Detection of Hepatitis-B virus Genotypes among Chronic Carriers in Duhok-Iraq. *Journal of the Faculty of Medicine Baghdad*, 58(2): 170-175.
- Abdulrazaq, G. and AL-Azaawie, A. F. 2017. Molecular and Immunological Study of Hepatitis B virus infection in Samara City, Iraq. *Cihan University-Erbil Scientific Journal*, 2: 97-116.
- Ahmed, A. M. 2013. Determination of Hepatitis B virus genotypes among Iraqi chronic Hepatitis B patients and inactive HBV carriers (Doctoral dissertation, PhD. Thesis, Baghdad University, 76 Page, Baghdad).
- Akbar, N., Basuki, B., Garabrant, D. H., Sulaiman, A., Noer, H. S. and MuLYANTO. 1997. Ethnicity, socioeconomic status, transfusions and risk of hepatitis B and hepatitis C infection. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 12(11): 752-757.
- Al Baqlani, S. A., Sy, B. T., Ratsch, B. A., Al Naamani, K., Al Awaidy, S., Busaidy, Georg Pauli, and C-Thomas Bock. 2014. Molecular epidemiology and genotyping of hepatitis B virus of HBsAg-positive patients in Oman. *PLoS One*, 9(5): e97759.
- Al-Aboudi, S. A. K. and Al-Hmudi, H. A. 2015. Some of immunogenetic status of HBsAg negative, HBcAb positive Blood donors in Basra province-Iraq. *Annals of Biological Research*, 6(4): 47-54.
- Alestig, E., Hannoun, C., Horal, P. and Lindh, M. 2001. Phylogenetic origin of hepatitis B virus strains with precore C-1858 variant. *Journal of clinical microbiology*, 39(9): 3200-3203.
- Alfaresi, M., Elkoush, A., Alshehhi, H., Alzaabi, A. and Islam, A. 2010. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in UAE patients. *Virology journal*, 7(1): 1-8.
- Alkhanak, Y. R., Alwachi, S. N. and Zghair, K. H. 2015. The Effect of Toxoplasmosis Infection on Interleukin-12 Level During Human Maturity in Baghdad Province. *Iraqi Journal of Science*, 56(1B): 356-360.
- Al-Rubaye, A., Tariq, Z. and Alrubaiy, L. 2016. Prevalence of hepatitis B seromarkers and hepatitis C antibodies in blood donors in Basra, Iraq. *BMJ open gastroenterology*, 3(1): 67.

- Ameen, R., Sanad, N., Al-Shemmari, S., Siddique, I., Chowdhury, R. I., Al-Hamdan, S. and Al-Bashir, A. 2005. Prevalence of viral markers among first-time Arab blood donors in Kuwait. *Transfusion*, 45(12): 1973-1980.
- Amini-Bavil-Olyaei, S., Hosseini, S. Y., Sabahi, F. and Alavian, S. M. 2008. Hepatitis B virus (HBV) genotype and YMDD motif mutation profile among patients infected with HBV and untreated with lamivudine. *International journal of infectious diseases*, 12(1): 83-87.
- Antaki, N., Haffar, S., Deeb, S. A., Assaad, F., Abou Harb, R., Zeibane, M. Nassereldine and Kebbewar, K. 2010. High prevalence of HBV genotype D in Syria and the clinical characteristics of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Epidemiology and Infection*, 138(1): 40-44.
- Asaad, A. M., Al-Ayed, M. S. Z., Aleraky, M. and Qureshi, M. A. 2015. Hepatitis B virus genotyping in chronic hepatitis B patients in southwestern Saudi Arabia. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19, 525-528.
- Ataallah, T. M., Hanan, K. A., Maysoun, K. S. and Sadoon, A. A. 2011. Prevalence of hepatitis B and C among blood donors attending the National Blood Transfusion Center in Baghdad, Iraq from 2006-2009. *Saudi medical journal*, 32(10): 1046-1050.
- Bastian, D., Wu, Y., Betts, B. C. and Yu, X. Z. 2019. The IL-12 cytokine and receptor family in graft-vs.-host disease. *Frontiers in immunology*, 10: 988.
- Bekondi, C., Zanchi, R., Seck, A., Garin, B., Giles-Vernick, T., Gody, J. Petulla Bata and Vray, M. 2015. HBV immunization and vaccine coverage among hospitalized children in Cameroon, Central African Republic and Senegal: a cross-sectional study. *BMC infectious diseases*, 15: 1-9.
- Block, T. M., Guo, H. and Guo, J. T. 2007. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clinics in liver disease*, 11(4): 685-706.
- Bömmel, F., Bartens, A., Mysickova, A., Hofmann, J., Krüger, D. H., Berg, T. and Edelmann, A. 2015. Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors. *Hepatology*, 61(1): 66- 76.

- Candan, F. E. R. H. A. N., Alagözlü, H., Poyraz, Ö. M. E. R. and Sümer, H. 2002. Prevalence of hepatitis B and C virus infection in barbers in the Sivas region of Turkey. *Occupational medicine*, 52(1): 31-34.
- Chan, H. L., Hui, A. Y., Wong, M. L., Tse, A. M., Hung, L. C., Wong, V. W. and Sung, J. J. 2004. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut*, 53(10): 1494-1498.
- Cheng, X., Xia, Y., Serti, E., Block, P. D., Chung, M., Chayama, K., Liang, T. J. 2017. Hepatitis B virus evades innate immunity of hepatocytes but activates cytokine production by macrophages. *Hepatology*, 66(6): 1779-1793.
- Collison, L. W., Chaturvedi, V., Henderson, A. L., Giacomini, P. R., Guy, C., Bankoti, J., David and Vignali, D. A. 2010. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature immunology*, 11(12): 1093-1101.
- Collison, L. W., Delgoffe, G. M., Guy, C. S., Vignali, K. M., Chaturvedi, V., Fairweather, D., R. Satoskar and Vignali, D. A. 2012. The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nature immunology*, 13(3): 290-299.
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Richard S. Blumberg and Vignali, D. A. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450(7169): 566-569.
- Dasarathy, S., Misra, S. C., Acharya, S. K., Irshad, M., Joshi, Y. K., Venugopal, P. and Tandon, B. N. (1992). Prospective controlled study of posttransfusion hepatitis after cardiac surgery in a large referral hospital in India. *Liver*, 12(3): 116-120.
- Dawood, A., Hasan, G. and Hayawi, A. 2019. Determination Genotype D of Hepatitis B Virus amongst Patients in Mosul-Iraq. *Int J Sci and Tech Res*, 8(9): 1218-1220.
- Doo, E. C. and Ghany, M. G. 2010. Hepatitis B virology for clinicians. *Clinics in liver disease*, 14(3): 397-408.
- Dupinay, T., Restorp, K., Leutscher, P., Rousset, D., Chemin, I., Migliani, and Norder, H. 2010. High prevalence of hepatitis B virus genotype E in Northern Madagascar indicates a West-African lineage. *Journal of medical virology*, 82(9): 1515-1526.
- Ezzikouri, S., Ozawa, M., Kohara, M., Elmdaghri, N., Benjelloun, S. and Tsukiyama-Kohara, K. 2014. Recent insights into hepatitis B virus–host interactions. *Journal of medical virology*, 86(6): 925-932.

- Fu, Y. P., Yi, Y., Cai, X. Y., Sun, J., Ni, X. C., He, H. W., Xing Wang and Qiu, S. J. 2016. Overexpression of interleukin-35 associates with hepatocellular carcinoma aggressiveness and recurrence after curative resection. *British journal of cancer*, 114(7): 767-776.
- Ganem, D. 2001. Hepadnaviridae: the viruses and their replication. *Fields' virology*, 2, 2923-2969.
- Gerlich, W. H. 2013. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology journal*, 10(1): 1-25.
- Gerlich, W. H. and Robinson, W. S. 1980. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell*, 21(3): 801-809.
- Gurung, K., Poudel, T. P., Shah, G. J. and Mishra, D. 2018. Seroprevalence of Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus in Nepalgunj Medical College, Nepal. *Journal of Nepalgunj Medical College*, 16(1): 63-66.
- Hamoudi, W., Ghazzawi, I. and Hamoudi, M. M. Y. 2016. Hepatitis B genotypic and serologic characteristics in Jordan. *Journal of the Royal Medical Services*, 102(3878): 1-6.
- Hu, J. and Seeger, C. 2015. Hepadnavirus genome replication and persistence. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(7): a021386.
- Hu, Y., Dong, C., Yue, Y. and Xiong, S. 2014. In vivo delivery of interleukin-35 relieves coxsackievirus-B3-induced viral myocarditis by inhibiting Th17 cells. *Archives of virology*, 159, 2411-2419.
- Huang, Y., Hu, H., Liu, L., Ye, J., Wang, Z., Que, B., Wenjing L. and Lin, Y. 2019. Interleukin-12p35 deficiency reverses the Th1/Th2 imbalance, aggravates the Th17/Treg imbalance, and ameliorates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *Mediators of Inflammation*, 2019.
- Huang, Y., Wang, Z., An, S., Zhou, B., Zhou, Y., Chan, H. L. Y. and Hou, J. 2008. Role of hepatitis B virus genotypes and quantitative HBV DNA in metastasis and recurrence of hepatocellular carcinoma. *Journal of medical virology*, 80(4): 591-597.
- Hussein, N. R. 2015. Prevalence of HBV, HCV and HIV and Anti-HBs antibodies positivity in healthcare workers in departments of surgery in Duhok City, Kurdistan

- Region, Iraq. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 26(2): 70.
- Hussein, N. R., Haj, S. M., Almizori, L. A. and Taha, A. A. 2017. The prevalence of hepatitis B and C viruses among blood donors attending blood bank in Duhok, Kurdistan region, Iraq. *International Journal of Infection*, 4(1): 80-86.
- Idrees, M., Awan, Z., Rafique, S., Rehman, I. U., Akbar, H., Butt, S., Manzoor, S., Khan, L.A., Munir, S., Afzal, S. and Badar, S. 2010. Hepatitis B virus YMDD-motif mutations with emergence of lamivudine-resistant mutants: a threat to recovery. *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench*, 3(3): 98-108.
- Ismail, M. Z., Metwally, M. A., El-Feky, H. M., Ahmed, I. A., , M. A., Omar. and Idris, A. 2017. Role of intrafamilial transmission in high prevalence of hepatitis C virus in Egypt. *Hepatic Medicine: Evidence and Research*, 3: 27-33.
- Jafari, S., Buxton, J. A., Afshar, K., Copes, R. and Baharlou, S. 2012. Tattooing and risk of hepatitis B: a systematic review and meta-analysis. *Canadian journal of public health*, 103: 207-212.
- Kao, J. H., Chen, P. J. and Chen, D. S. 2010. Recent advances in the research of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiologic and molecular biological aspects. *Advances in cancer research*, 108: 21-72.
- Kao, J. H., Chen, P. J., Lai, M. Y. and Chen, D. S. 2002. Occult hepatitis B virus infection and clinical outcomes of patients with chronic hepatitis C. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11): 4068-4071.
- Kao, J. H., Wu, N. H., Chen, P. J., Lai, M. Y. and Chen, D. S. 2000. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *Journal of hepatology*, 33(6): 998-1002.
- Khaled, I. A., Mahmoud, O. M., Saleh, A. F. and Bioumie, E. E. 2011. Prevalence of HBV genotypes among Egyptian hepatitis patients. *Molecular biology reports*, 38(7): 4353-4357.
- Komatsu, H., Inui, A., Sogo, T., Tateno, A., Shimokawa, R. and Fujisawa, T. 2012. Tears from children with chronic hepatitis B virus (HBV) infection are infectious vehicles of HBV transmission: experimental transmission of HBV by tears, using mice with chimeric human livers. *The Journal of infectious diseases*, 206(4): 478-485.
- Kramvis, A., Kew, M. and François, G. 2005. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*, 23(19): 2409-2423.

- Kurbanov, F., Tanaka, Y. and Mizokami, M. 2010. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatology Research*, 40(1): 14-30.
- Lazarevic, I. 2014. Clinical implications of hepatitis B virus mutations: recent advances. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(24): 7653.
- Lee, C. M., Hung, C. H., Lu, S. N., Wang, J. H., Tung, H. D., Huang, W. S., Chen, C.L., Chen, W.J. and Changchien, C. S. 2006. Viral etiology of hepatocellular carcinoma and HCV genotypes in Taiwan. *Intervirology*, 49(1-2): 76-81.
- Levrero, M. and Zucman-Rossi, J. 2016. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*, 64(1): S84-S101.
- Liang, T. J. 2009. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology*, 49(5): 13-21.
- Liu, C. J. and Kao, J. H. 2006. Hepatitis B virus genotypes: Epidemiology and therapeutic implications. *Hepatitis B Annual*, 3(1): 54.
- Liu, J., Yang, H. I., Lee, M. H., Lu, S. N., Jen, C. L., Batrla-Utermann, R., Wang, L.Y., You, S.L., Hsiao, C.K., Chen, P.J. and Chen, C. J. 2014. Spontaneous seroclearance of hepatitis B seromarkers and subsequent risk of hepatocellular carcinoma. *Gut*, 63(10): 1648-1657.
- Liu, S., Zhang, H., Gu, C., Yin, J., He, Y., Xie, J. and Cao, G. 2009. Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(15): 1066-1082.
- Liu, Z., Dai, X., Wang, T., Zhang, C., Zhang, W., Zhang, W., Zhang, Q., Wu, K., Liu, F. and Liu, Y. 2017. Hepatitis B virus PreS1 facilitates hepatocellular carcinoma development by promoting appearance and self-renewal of liver cancer stem cells. *Cancer letters*, 400: 149-160.
- Long, J., Guo, H., Cui, S., Zhang, H., Liu, X., Li, D., Han, Z., Xi, L., Kou, W., Xu, J. and Ding, Y. 2016. IL-35 expression in hepatocellular carcinoma cells is associated with tumor progression. *Oncotarget*, 7(29): 45678.
- Martinson, F. E., Weigle, K. A., Royce, R. A., Weber, D. J., Suchindran, C. M. and Lemon, S. M. (1998). Risk factors for horizontal transmission of hepatitis B virus in a rural district in Ghana. *American journal of epidemiology*, 147(5): 478-487.
- Mcintosh, E. D. G. and Bek, M. D. 1997. Horizontal transmission of hepatitis B in a children's day-care centre: a preventable event. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 21(7): 791-792.

- McMahon, B. J. 2009. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatology international*, 3(2): 334-342.
- Mohebbi, S. R., Amini-Bavil-Olyaei, S., Zali, N., Damavand, B., Azimzadeh, P., Derakhshan, F., Sabahi, F. and Zali, M. R. 2012. Characterization of hepatitis B virus genome variability in Iranian patients with chronic infection, a nationwide study. *Journal of medical virology*, 84(3): 414-423.
- Mohsen, R. T., Al-azzawi, R. H. and Ad'hiah, A. H. 2020. Serum level of interleukin-35 in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Iraqi Journal of Science*, 61(11): 2860-2865.
- Nelson, N. P., Easterbrook, P. J. and McMahon, B. J. 2016. Epidemiology of hepatitis B virus infection and impact of vaccination on disease. *Clinics in liver disease*, 20(4): 607-628.
- Niedbala, W., Wei, X. Q., Cai, B., Hueber, A. J., Leung, B. P., McInnes, I. B. and Liew, F. Y. 2007. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *European journal of immunology*, 37(11): 3021-3029.
- Nile, RS., Kadhim, DA. and Mohsin, MA. 2018 The prevalence study of viral hepatitis in AL- Najaf AL-Ashraf province. *Int.J. Curr.Res. Biosci.Plant Biol*, 5(1): 1-9.
- Ozer, A., Yakupogullari, Y., Beytur, A., Beytur, L., Koroglu, M., Salman, F. and Aydogan, F. 2011. Risk factors of hepatitis B virus infection in Turkey: A population-based, case-control study. *Hepatitis monthly*, 11(4): 263-268.
- Papastergiou, V., Lombardi, R., MacDonald, D. and Tsochatzis, E. A. 2015. Global epidemiology of hepatitis B virus (HBV) infection. *Current hepatology reports*, 14, 171-178.
- Li, X., Zheng, Y., Liao, A., Cai, B., Ye, D., Huang, F. and Li, J. 2012. Hepatitis B virus infections and risk factors among the general population in Anhui Province, China: an epidemiological study. *BMC public health*, 12: 1-7.
- Peeridogaheh, H., Meshkat, Z., Habibzadeh, S., Arzanlou, M., Shahi, J. M., Rostami, S. and Teimourpour, R. 2018. Current concepts on immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Virus research*, 245: 29-43.
- Roman, S., Tanaka, Y., Khan, A., Kurbanov, F., Kato, H., Mizokami, M. and Panduro, A. 2010. Occult hepatitis B in the genotype H-infected Nahuas and Huichol native Mexican population. *Journal of medical virology*, 82(9): 1527-1536.

- Sakkas, L. I., Mavropoulos, A., Perricone, C. and Bogdanos, D. P. 2018. IL-35: a new immunomodulator in autoimmune rheumatic diseases. *Immunologic Research*, 66: 305-312.
- Sambrook, J. and Russell, S.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold. Spring. Harbor. New York, 6: 98.
- Schädler, S. and Hildt, E. 2009. HBV life cycle: entry and morphogenesis. *Viruses*, 1(2): 185-209.
- Seeger, C., Zoulim, F. and Mason, W. S. 2013. "Hepadnaviruses," in *Fields virology*, 6th Edn, eds D. M. Knipe, and P. M. Howley, (Philadelphia, PA: LippincottWilliams andWilkins), 8(11): 2185–2221.
- Shao, X., Ma, J., Jia, S., Yang, L., Wang, W. and Jin, Z. 2017. Interleukin-35 suppresses antiviral immune response in chronic hepatitis B virus infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7: 472.
- Shepard, C. W., Simard, E. P., Finelli, L., Fiore, A. E. and Bell, B. P. 2006. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiologic reviews*, 28(1): 112-125.
- Shi, M. I. N., Wei, J. U. E., Dong, J., Meng, W., Ma, J., Wang, T., Wang, N.A. and Wang, Y. 2015. Function of interleukin 17 and 35 in the blood of patients with hepatitis B related liver cirrhosis. *Molecular medicine reports*, 11(1): 121-126.
- Song, M. and Ma, X. 2016. The immunobiology of interleukin-35 and its regulation and gene expression. *Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases*, 213-225.
- Sunbul, M. 2014. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World journal of gastroenterology*, 20(18): 5427-5434.
- Tanaka, Y., Kurbanov, F., Mano, S., Orito, E., Vargas, V., Esteban, J. I., Yuen, M.F., Lai, C.L., Kramvis, A., Kew, M.C. and Mizokami, M. 2006. Molecular tracing of the global hepatitis C virus epidemic predicts regional patterns of hepatocellular carcinoma mortality. *Gastroenterology*, 130(3): 703-714.
- Tarky, A. M., Akram, W. A., Al-Naaimi, A. S., and Omer, A. R. 2013. Epidemiology of viral hepatitis B and C in Iraq: a national survey 2005-2006. *Zanco Journal of Medical Sciences (Zanco J Med Sci)*, 17(1): 370-380.

- Toan, N. L., Song, L. H., Kremsner, P. G., Duy, D. N., Binh, V. Q., Koeberlein, B., Kaiser, S., Kandolf, R., Torresi, J. and Bock, C. T. 2006. Impact of the hepatitis B virus genotype and genotype mixtures on the course of liver disease in Vietnam. *Hepatology*, 43(6): 1375-1384.
- Tonetto, P. A., Gonçalves, N. S., Fais, V. C., Vigani, A. G., Gonçalves, E. S., Feltrin, A. and Gonçalves, F. L. 2009. Hepatitis B virus: molecular genotypes and HBeAg serological status among HBV-infected patients in the southeast of Brazil. *BMC infectious diseases*, 9(1): 1-7.
- Wai, C. T., Fontana, R. J., Polson, J., Hussain, M., Shakil, A. O., Han, S. H., Davern, T.J., Lee, W.M., Lok, A.F. and US Acute Liver Failure Study Group. 2005. Clinical outcome and virological characteristics of hepatitis B-related acute liver failure in the United States. *Journal of viral hepatitis*, 12(2): 192-198.
- WHO, 2004. Hepatitis B surface antigen assays: operational characteristics (phase 1): report 2.
- WHO, 2020: World Health Organization - Hepatitis B Key facts [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> (Accessed August 25, 2020).
- Xiang, X. G. and Xie, Q. 2015. IL-35: a potential therapeutic target for controlling hepatitis B virus infection. *Journal of digestive diseases*, 16(1): 1-6.
- Xue, W., Yan, D. and Kan, Q. 2019. Interleukin-35 as an emerging player in tumor microenvironment. *Journal of Cancer*, 10(9): 2074.
- Yan, B., Lv, J., Feng, Y., Liu, J., Ji, F., Xu, A. and Zhang, L. 2017. Temporal trend of hepatitis B surface mutations in the post-immunization period: 9 years of surveillance (2005–2013) in eastern China. *Scientific reports*, 7(1): 1-8.
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Wang, H. 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *journal elife*, 1(10).
- Yang, L., Shao, X., Jia, S., Zhang, Q. and Jin, Z. 2019. Interleukin-35 dampens CD8+ T cells activity in patients with non-viral hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Immunology*, 10, 1032.

- Yu, H., Yuan, Q., Ge, S. X., Wang, H. Y., Zhang, Y. L., Chen, Q. R., Jun Z. and Xia, N. S. 2010. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype “I”. *PloS one*, 5(2): 9297.
- Zehender, G., Ebranati, E., Gabanelli, E., Sorrentino, C., Presti, A. L., Tanzi, E., Massimo C. and Galli, M. 2014. Enigmatic origin of hepatitis B virus: an ancient travelling companion or a recent encounter?. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(24): 7622.
- Zhang, J., Zhang, Y., Wang, Q., Li, C., Deng, H., Si, C. and Xiong, H. 2019. Interleukin-35 in immune-related diseases: protection or destruction. *Immunology*, 157(1): 13-20.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Mudhafar Saud Dakhil ALSHAHER

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2021-2023
---------------	---	-----------

Lisans	Al-Muthanaa Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyoloji Bölümü	2007-2011
--------	--	-----------