

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KRONİK AKTİF HEPATİT B ENFEKSİYONU OLAN HASTALAR İLE HEPATİT B
VİRUSUNA KARŞI DOĞAL BAĞIŞIKLIK GELİŞTİREN BİREYLERİN SİTOKİN
GEN POLİMORFİZMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Tuba KÖSE

TRABZON - 2013

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KRONİK AKTİF HEPATİT B ENFEKSİYONU OLAN HASTALAR İLE HEPATİT B
VİRUSUNA KARŞI DOĞAL BAĞIŞIKLIK GELİŞTİREN BİREYLERİN SİTOKİN
GEN POLİMORFİZMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Tuba KÖSE

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA**

TRABZON - 2013

ÖNSÖZ

Eğitim ve öğrenimim boyunca benden yardım ve desteğini esirgemeyen, bir baba şevkati ile her zaman yol gösteren Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Faruk AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Sonsuz bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, akademik gelişimimde büyük katkıları olan, çalışmamın her aşamasında her zaman destek ve güvenini yanımda bulduğum saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında zamanını bana ayıran ve laboratuvar aşamasında büyük katkıları olan hocamYrd. Doç. Dr. C. Kurtuluş BURUK'a teşekkür ederim.

Eğitimim süresince yetişmemde emekleri geçen değerli hocalarımız Prof. Dr. Murat ERTÜRK, Prof. Dr. İlknur TOSUN, Doç. Dr. A. Osman KILIÇ ve özellikle Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU'na teşekkür ederim.

Birlikte uyum ve hoşgörü içinde çalıştığım, yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli asistan, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma, mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Bütün hayatım boyunca, her zaman maddi manevi tüm desteklerini ve sevgilerini benden esirgemeyen sevgilianneme, babama, kardeşlerime sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca destekleri ile bana her zaman güç veren ve özellikle vaka toplama aşamasında büyük katkıları olan sevgili eşime ve canım oğluma gösterdikleri sabır ve anlayış için teşekkür ederim.

Dr. Tuba KÖSE
Trabzon, 2013

Sevgili anneme ve canım babama ithaf ediyorum...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hepatit B Virusu.....	3
2.1.1. Tarihçe.....	3
2.1.2. Sınıflandırma.....	4
2.1.3. Genel Özellikler	5
2.1.4. Genom Yapısı.....	7
2.1.5. Viral Proteinler.....	9
2.1.5.1. Yüzey (Kılıf) Proteinleri	9
2.1.5.2. C proteini.....	10
2.1.5.3. P Proteini	10
2.1.5.4. X Proteini	10
2.1.6. Viral Replikasyon.....	11
2.1.7. Epidemiyoloji	13
2.1.8. HBV'nin Patogenezi	14
2.1.9. HBV Enfeksiyonunun Klinik Seyri	16
2.1.10. HBV Enfeksiyonlarının Tanımı	17
2.1.11. Tanı.....	18
2.1.11.1. Serolojik Testler	18
2.1.11.2. Moleküler Testler	21
2.1.12. Tedavi.....	22
2.1.13. Korunma ve Kontrol.....	23
2.2. Sitokinler	23
2.2.1. İnterlökin-1 (IL-1)	25

2.2.2. İnterlökin-2 (IL-2)	26
2.2.3. İnterlökin-4 (IL-4)	26
2.2.4. İnterlökin-6 (IL-6)	27
2.2.5. İnterlökin-10 (IL-10)	27
2.2.6. İnterlökin-12 (IL-12)	28
2.2.7. İnterferon- γ (IFN- γ).....	28
2.2.8. Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α)	29
2.2.9. Tümör Gelişim Faktörü β 1 (TGF- β 1)	30
2.3. Polimorfizm.....	30
3. MATERYAL METOD	32
3.1. Materyal	32
3.1.1. Çalışma Grubu.....	32
3.1.2. Kullanılan Gereçler	32
3.1.2.1. Kullanılan Solüsyonlar.....	32
3.1.2.2. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	33
3.2. Metod	34
3.2.1. Çalışma Planı.....	34
3.2.2. Mononükleer Hücrelerin Ayrılması	36
3.2.3. DNA İzolasyonu.....	36
3.2.4. DNA'nın Spektrofotometrede Konsantrasyonunun Ölçümü	36
3.2.5. İzole Edilen DNA'da Beta Aktin Geninin Tespiti	36
3.2.6. Sitokin Gen Polimorfizminin Tespiti İçin PZR Yapılması	37
3.2.7. İstatistiksel Analizler.....	38
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA.....	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
7. ÖZET	80
8. SUMMARY	81
9. KAYNAKLAR	82

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Ortohepadnaviridae ve Avihepadnaviridae Ailelerindeki Virusların Genel Özellikleri.....	5
Tablo 2. HBV Serolojik Testlerinin Yorumlanması	21
Tablo 3. Beta Aktin Gen Analizinde Bir Hasta İçin Gerekli Olan Reaksiyon Karışımının İçeriği ve Miktarları.....	37
Tablo 4. Beta aktin geni için PZR döngü programı	37
Tablo 5. Sitokin Genleri Analizinde Bir Hasta İçin Gerekli Olan Reaksiyon Karışımının İçeriği ve Miktarları.....	38
Tablo 6. Sitokin Genleri İçin PZR Döngü Programı	38
Tablo 7. Protrans Sitokin Gen Polimorfizmi Analiz Cetveli	39
Tablo 8. Kronik Aktif Hepatitli ve Doğal Bağışık Grubun Cinsiyetlere Göre Dağılım Yüzdesi	41
Tablo 9. Kronik Aktif Hepatitli ve Doğal Bağışık Grubun Cinsiyete Göre Yaş Ortalaması.....	41
Tablo 10. HBV'ye Karşı Doğal Bağışık Grup ile Kronik Aktif Hepatitli Hastalarının Sitokin Gen Polimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması	58
Tablo 11. HBV'ye Karşı Doğal Bağışık (DB) ve Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grubun Sitokin Gen Polimorfizm Sonuçlarının Genotiplerine Göre Karşılaştırılması.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Hepatit B Partikül Tipleri	6
Şekil 2. HBV'nin Genom Yapısı	7
Şekil 3. HBV'nin Yüzey Proteinlerini Sentezleyen Gen Bölgeleri	10
Şekil 4. HBV'nin Replikasyon Şeması	11
Şekil 5. HbsAg Prevalans Haritası, 2008	13
Şekil 6. İyileşme ile Sonlanan Akut HBV Enfeksiyonunda Serolojik Göstergeler	19
Şekil 7. Akut Hepatiti İzleyerek Kronikleşen HBV Enfeksiyonunda Serolojik Göstergeler	19
Şekil 8. Çalışma Planı ve İşlemlerin Yürütülme Şeması	35
Şekil 9. IL-1 α Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları	42
Şekil 10. IL-1 α Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasında Genotiplere Göre Pozitiflik Oranlarının Dağılımı	43
Şekil 11. IL-1 β Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları	44
Şekil 12. IL-1R Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları	44
Şekil 13. IL-1RA Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları	45
Şekil 14. IL-4R α Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları	46
Şekil 15. IL-12 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları	46
Şekil 16. IFN- γ Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları	47
Şekil 17. IFN- γ Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasında Genotiplere Göre Pozitiflik Oranlarının Dağılımı	48
Şekil 18. TGF- β 1 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları	49

Şekil 19.	TGF- β 1 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları.....	49
Şekil 20.	TNF- α Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları.....	50
Şekil 21.	IL-2 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları.....	51
Şekil 22.	IL-4 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları.....	52
Şekil 23.	IL-4 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları.....	52
Şekil 24.	IL-4 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasında Genotiplere Göre Pozitiflik Oranlarının Dağılımı.....	53
Şekil 25.	IL-6 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları.....	54
Şekil 26.	IL-10 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları.....	55
Şekil 27.	IL-10 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları.....	55
Şekil 28.	IL-10 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasında Genotiplere Göre Pozitiflik Oranlarının Dağılımı.....	56
Şekil 29.	IL-10 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasında Genotiplere Göre Pozitiflik Oranlarının Dağılımı.....	56
Şekil 30.	HBV'ye Karşı Doğal Bağışık ve Kronik Aktif Hepatitli Gruplarda Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Dağılımı	62

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No
Resim 1. Tübüler Partiküller (A), Sferik Partiküller (B) ve Dane Partikülü'nün (C) Elektron Mikroskopik Görüntüsü.....	7
Resim 2. Sitokin Gen Polimorfizminin %2'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü (Çift Bantlar Pozitifdir)	57

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit B virusu (HBV), *Hepadnaviridae* ailesinin *Orthohepadnavirus* genusunda yer alan 42 nm çapında, sferik biçimde ve zarflı bir virustur. Kısmi çift sarmallı olan 3.2 kb uzunluğunda sirküler DNA genomuna sahiptir. Hepatositlerde replike olarak karaciğer fonksiyon bozukluğuna neden olur (1). Dünya Sağlık Örgütü'nün(WHO) tahminlerine göre 2 milyar insan hepatit B virüsü(HBV) ile enfektidir ve 350 milyondan fazla kişide kronik enfeksiyon mevcuttur. Taşıyıcılık oranları ise bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Amerika ve Batı Avrupa'da düşük (%0.1-2), Akdeniz ülkelerinde ve ülkemizde orta (%2-8), Afrika ve Orta Asya'da yüksek (%8-20) taşıyıcılık oranları mevcuttur (2,3). HBV enfeksiyonunun inkübasyon periyodu 1-4 aydır. Erişkinlerin üçte birinde semptomatik enfeksiyon görülür. Beş yaşının altındaki çocuklarda ise enfeksiyon çoğunlukla asemptomatik olarak seyreder. Bu çocukların sadece %10'unda semptomlar görülür. Bir yaşın altında ise semptomatik enfeksiyon oldukça nadirdir.

Enfeksiyonla mücadelede immün yanıtı oluşturan savunma hücrelerinin fonksiyonları büyük önem taşımaktadır. Dendritik hücrelerle yakın temasta olan T hücrelerinin, T-bağımlı B hücrelerinin çoğalması ve yanıtın olgunlaşması sitokinler adı verilen proteinlerin salgılanması ile yönetilmektedir (4). Örneğin Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) ve İnterferon- γ (IFN- γ) hepatit B enfeksiyonuna karşı gelişen inflamatuvar yanıtta çok önemli iki sitokindir (5).

İnsan genomundaki hayati öneme sahip DNA dizileri iyi korunmaktadır. Fakat bazı DNA dizilerinde kısıtlı değişiklikler oluşabilmektedir. Bu tür değişiklikler **polimorfizm** olarak adlandırılmaktadır. Değişikliğin gözlemlendiği DNA dizilerinin bulunduğu kısımlarise polimorfik bölge olarak tanımlanırlar(6).

Sitokin gen polimorfizmlerinin inflamatuvar yanıtı etkisi merak uyandırmaktadır. Sitokin gen polimorfizmlerinin kronik HBV enfeksiyonunun gelişimi ve ilerlemesi ile

ilişkisi olduğu gösterilmiştir (7). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda ise sitokin gen polimorfizmleri ile hastalık duyarlılığı arasında ilişkiler olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada HBV'ye karşı doğal bağışık (Anti-HBc ve Anti-HBs pozitif) kişilerle kronik aktif hepatit B enfeksiyonu gelişen hastalarda sitokin gen polimorfizmlerinin araştırılması hedeflenmiştir. Araştırmada her iki gruptan elde edilen kanlardasitokin gen polimorfizmlerinin belirlenmesi, bunların karşılaştırılarak analizlerinin yapılması ve böylece iki hasta grubu arasında sitokin gen polimorfizmleri açısından farkların ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatit B Virus

2.1.1. Tarihçe

Hipokrat'ın, M.Ö. 5. yüzyılda ilk kez “epidemik sarılığı” tanımlaması ile viral hepatitler bilinmeye başlamıştır (8). Virchow (1) 1865 yılında “kataral iktter” teriminden söz etmiştir. İnsanlık tarihi boyunca anlatılan sarılık salgınları 19. ve 20. yüzyıllarda çeşitli savaşlar sırasında daha sık görülmüştür. Özellikle hepatit A salgınları olmak üzere, kan ve kan ürünlerinin savaş dönemlerinde sıkça kullanımı sebebiyle hepatit B salgınlarının da yaşanmış olması olasıdır. İlk kez Almanya Bremen’de 1883 yılında insan lenf sıvısı kullanılarak hazırlanan çiçek aşısı kampanyası sonucunda HBV’nin yayıldığıLurman tarafından gösterilmiştir (1, 9). Daha sonra 20. yüzyılın ilk yarısında “uzun inkübasyon süreli sarılık salgınları” bildirilmiştir. İkinci Dünya Savaşı sırasında ise insan serumu ile hazırlanan sarı humma aşısı ile aşılanan askeri personelde hepatitolguları görüldüğü bilinmektedir (10).

Virusların keşfinden önce yapılan epidemiyolojik gözlemlere dayalı olarakfekal-oral bulaşan tip A ve parenteral yolla bulaşan tip B olmak üzere iki ayrı hepatit tablosu olduğu bilinmekteydi. Ancak, McCallum ve Bauer (8) 1947 yılında enfeksiyöz hepatit ve serum hepatiti olmak üzere iki farklı hastalık tipini belirlediler. İlki fekal-oral bulaşan 2-6 haftalık inkübasyon süresine sahip ve çocuklarda sık görülen, diğeri kan ürünlerinin deriyle teması sonucu bulaşıp 2-6 aylık uzun bir inkübasyonu olan ve erişkinlerde daha sık görülen hastalıklardı.

Blumberg ve Alter (11) 1965 yılında, HBV’yi kan yoluyla bulaşan hepatit etkeni olarak ilk kez tanımladılar. Sık kan transfüzyonu yapılan Avustralya kökenli bir lösemi hastası ile yaptıkları çalışma sırasında hastanın serumunda immünopresipitasyon yöntemi

ile HBV yüzey antijenini gösterdiler. Araştırmacılar “Avustralya antijeni” şeklinde isimlendirdikleri bu yapının B tipi hepatit ile ilişkisini ortaya koyarak Nobel ödülü kazandılar.

Dane ve ark (8) 1970 yılında immün elektron mikroskopisi tekniğini kullanarak inceledikleri hasta serumlarında, yüzeylerinde aynı antijeni taşıyan virüs benzeri partikülleri tanımlayarak bu partiküllerin Hepatit B virüsüne ait olduğunu ileri sürdüler.

Krugman (8) 1971 yılında ısı ile inaktive edilen hepatit B yüzey antijeni bulunan serumların immünojenik olduğunu ve aşı olarak kullanılabileceğini gösterdi. 1973 yılında ise Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından hepatitin iki farklı enfeksiyöz ajanını birbirinden ayırmak amacı ile “hepatit A” ve “hepatit B” terimlerinin kullanılması önerildi (9). Daha sonra 1979 yılında, HBV’nin DNA’sı klonlanarak tam nükleotid dizisi çıkarıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile virüs DNA’sı çoğaltılarak HBV’nin moleküler biyolojisi, epidemiyolojisi, patogenezi, tanı ve tedavisi ile ilgili çok önemli gelişmeler kaydedildi (1, 8). 1980’li yıllardan sonra etkenin doku kültürlerinde üretilmesinin mümkün olması ve moleküler biyoloji konusundaki ilerlemeler neticesinde HBV ile ilgili hızlı bilgi birikimi sağlandı (12).

2.1.2. Sınıflandırma

HBV, Hepadnaviridae ailesi içinde yer alan ve bu ailenin başlıca bir prototipi olan bir virustur. Hepadnavirus terimindeki “hepa” hepatotropik kelimesinden, “dna” DNA genomundan gelmektedir. Bilinen tüm hepadnaviruslar hepatotropiktirler ve karaciğer hücrelerini enfekte ederek bulundukları konakta hepatit enfeksiyonu meydana getirirler (13).

Hepadnaviridae ailesi, Orthohepadnavirus ve Avihepadnavirus olmak üzere iki cinse ayrılmaktadır. Bu cinslerin genel özellikleri Tablo 1’de gösterilmiştir. Orthohepadnavirus üyeleri; insanları, yer sincaplarını (*Spermophilus lateralis*), dağ sıçanlarını (*Marmota monax*), Arktik sincapları (*Spermophilus parryii*) ve çeşitli maymunları enfekte etmektedir. Avihepadnavirus üyeleri ise ördek, gri balıkçıl (*Ardeacinerea*), küçük kar kazı (*Anser rossii*), kar kazı (*Anser caerulescens*) ve beyaz leylekleri enfekte etmektedir. Genel olarak Orthohepadnaviruslar memelilerde, avihepadnaviruslar ise kuşlarda bulunmakla

birlikte genomik yapıları birbirlerine benzerdir (14). HBV insanda enfeksiyon oluşturan tek tür olması nedeniyle Hepadnavirus ailesinin diğer üyelerinden ayrılmaktadır. Woodchuck hepatitis virus (WHV), Graund squirrel hepatitis virus (GSHV), Duck hepatitis B virus (DHBV) Hepadnaviridae ailesi içindeki diğer türlerdendir (15).

Tablo 1. Ortohepadnaviridae ve Avihepadnaviridae Ailelerindeki Virusların Genel Özellikleri, (10, 16).

Özellik	Ortohepadnaviridae (HBV, WHV, GSHV)*	Avihepadnaviridae (DHBV)**
Genom	3.2-3.3 kb	3.0 kb
DNA	Kısmen çift sarmallı	Tamamlanmış çift sarmallı
Viriyon çapı	40-42 nm	46-48nm
Konak	Memeli hayvanlar ve insanlar	Kanatlı hayvanlar
Yüzey proteinleri	L, M, S	L, M

*HBV: Hepatitis B virus, WHV: Woodchuck hepatitis virus, GSHV: Graund squirrel hepatitis virus

**DHBV: Duck hepatitis B virus

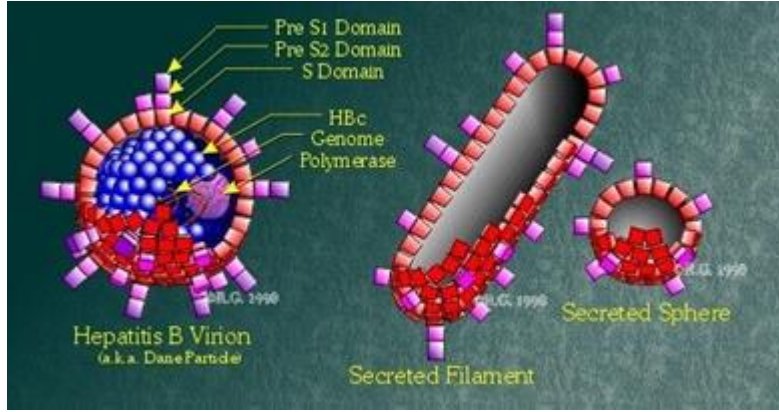
2.1.3. Genel Özellikler

Hepatit B virusu, 42 nm çapında yuvarlak ve zarflı bir DNA virusudur (1). Hepatotropik özellik gösteren HBV, en küçük hayvan DNA virusu olmasına rağmen iç içe geçen DNA okuma bölgelerine sahip olması nedeniyle geniş bir sentez kapasitesine sahiptir. Bir DNA virusu olduğu halde revers transkriptaz enzimi kodlar ve bir ara RNA molekülü aracılığıyla replikasyonunu tamamlar (17). HBV ile enfekte hastaların serumlarında 3 farklı morfolojik yapı bulunmaktadır. Bunlar:

a) Dane partikülü: 42 nm çapındaki bir çekirdek (core) veya nükleokapsidi çevreleyen hepatit B yüzey antijeni (HBsAg, *surface antigen*) ve onu da çevreleyen lipid yapıları bir dış zarftan oluşan tam bir viriyon şeklindeki partiküllerdir. Dane ve arkadaşları tarafından 1970 yılında HBV'li hastaların serumlarında tanımlanmıştır (9). Partiküller nükleik asit içeriğinden dolayı enfeksiyöz özellikte olup karaciğerde aktif bir replikasyon varlığının göstergesidirler (10, 18-20).

b) Küresel partiküller: 22 nm çapındaki küresel şekilli, sadece HBsAg yüzey antijenlerinden oluşan partiküllerdir. Kanda dolaşan HBsAg'nin çoğunluğunu bu partiküller oluşturur (10, 18-20).

c)**Tübüler partiküller:** 22 nm çapındaki değişik uzunluklarda olabilen (22-500 nm) ve virus replikasyonu olan hastaların serumlarında daha sık rastlanan partiküllerdir (10, 18-20).

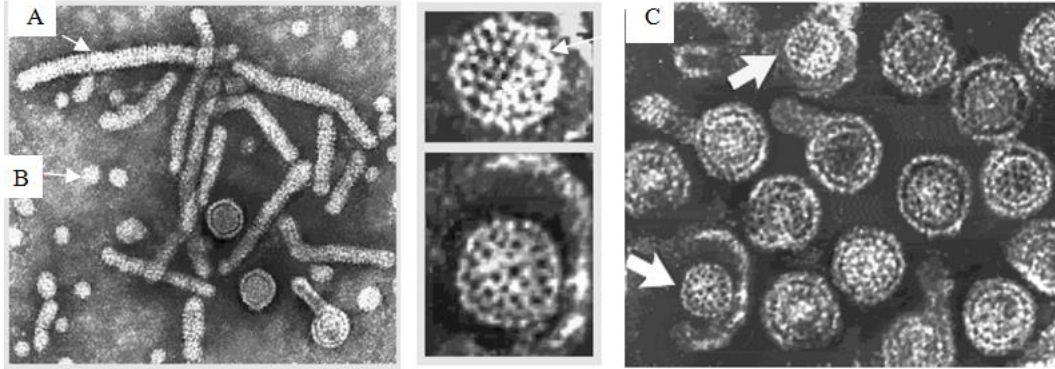


Şekil 1. Hepatit B Partikül Tipleri (21).

Her üç partikülün yapısında da ortak olan kısım HBsAg'dir ve immünojenik özellik gösterir. Anti-Hepatit B yüzey antijeni (Anti-HBs) antikorları ile reaksiyona girer. HBsAg ve HBcAg antijenlerinin yanında enfekte hücrelerden salınan Hepatit B e antijeni (HBeAg) de bulunmaktadır ve enfeksiyöz viryon yapımının göstergesidir (22-24). HBV ile enfekte hastaların serumlarında mililitrede 10^{10} civarında enfeksiyöz viryon bulunmaktadır. Enfektiviteye Dane partiküllerinin neden olduğu saptanmıştır (9, 12).

Virusun stabilitesi her zaman HBsAg'nin stabilitesi ile paralel değildir. Çok yoğun olmayan virus; 98°C 'de 1 dakika ya da 60°C 'de 10 saatısıldığında, eter/asit (pH 2.4) ile en az 6 saat muamele edildiğinde HBsAg'nin immünojenitesi ve antijenik özelliği kaybolmadığı halde virusun enfektivitesi kaybolmaktadır. Eğer virüs yoğunluğu çok fazla ise bu işlemler sonucu inaktivasyon tam olamamaktadır. HBsAg %2,5'luk sodyumhipoklorit ile 3 dakikada antijenik özelliğini yitirir. Serumda bulunan virusların enfektivitesi doğrudan kaynatmakla 2 dakikada, 121°C 'de 0,5 atmosfer basıncı altında 20 dakikada, 160°C 'de kuru sıcak havada 1 saatte inaktive olur. Son çalışmalar HBV'nin 500 ppm klor solüsyonunda 10 dakikada, % 0,1-2'lik sıvı glutaraldehid, %80'lik etil alkol ya da %70'lik izopropil alkol ile 2 dakikada inaktive olduğunu göstermiştir. HBV, $30-32^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildiğinde en az 6 ay, -20°C 'de ise 15 yıl enfektivitesini koruyabilmektedir (25).

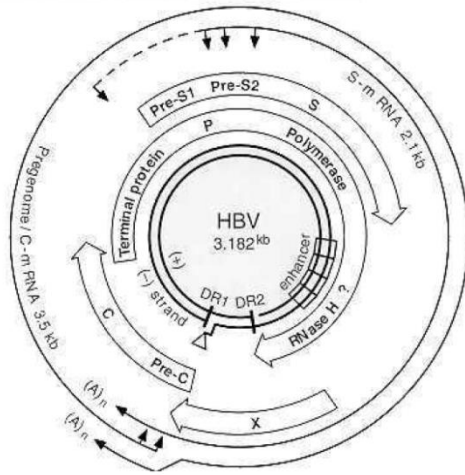
Hepatit B virusu, onkojenik özellik gösteren bir virus gibi görünmektedir. Hepatosellüler karsinom (HCC) gelişiminde HBV'nin ilişkili olduğunu gösteren ilk bulgular, WHBV modellerinde çalışılmıştır (26). Birçok çalışma, konak genomuna en sık entegre olan ORF'nin HBx geni olduğunu ve bu olayın hepatokarsinogenezde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (27).



Resim 1. Tübüler Partiküller (A), Sferik Partiküller (B) ve Dane Partikülü'nün (C) Elektron Mikroskopik Görüntüsü (28).

2.1.4. Genom Yapısı

HBV genomu kısmi çift sarmallı, sirküler bir DNA'ya sahiptir. Sirküler sarmalların hiç biri kovalent olarak kapalı olmamakla birlikte replikasyon sırasında çembersel hale gelmektedir. Genom "birbiri içine geçen genler" biçiminde organize olmuştur (9).



Şekil 2. HBV'nin Genom Yapısı (29).

Hayvan virusları içerisinde bilinen en küçük DNA genomuna sahip olan HBV viryonu 3200 nükleotid içeren negatif polariteli uzun iplik (L zinciri) ile 1800-2700 nükleotid içeren pozitif polariteli kısa iplikten (S zinciri) oluşmaktadır (8, 20, 30). Bu iki zincirin 5' uçlarında taşıdıkları 224 komplementer ortak baz çiftinin koheziv bölge denilen kısımlarından birbirlerine hidrojen bağları ile tutunması sonucu HBV DNA'nın yapısal bütünlüğü sağlanır. DR (*direct repeats*) olarak adlandırılan bu iki sabit bölge 10-12 nükleotidlik yinelenen dizilerden meydana gelmiştir. Uzun zincirin 5' ucu 1826. nükleotidde DR1 içinde, kısa zincirin 5' ucu ise 1592. nükleotidde DR2 içinde bulunur. Bu bağlanma sonucu DNA sirküler bir yapı kazanmasına rağmen, zincirlerin her birinin 3' ve 5' uçları gerçekten birleşik olmadığı için normaldelineer moleküllerdir. Negatif zincirin 5' ucunda kovalent bağlarla bağlanan viral polimeraz bulunurken, pozitif zincirin 5' ucunda yine kovalent bağlarla bağlanmış olan oligonükleotid RNA bulunur (19, 20).

Hepatit B virusu, protein sentezi esnasında aynı genomik dizileri farklı açık okuma çerçeveleri (*Open Reading Frame=ORF*) kullanarak yapar (1). HBV genomunun tüm genetik bilgilerini içeren L zinciri üzerinde 4 farklı ORF bölgesi vardır. Bu ORF'ler, 6 başlangıç kodonu, 2 transkripsiyon güçlendirici (*enhancer*) element (Enh1, Enh2), 4 promotor ve pek çok DNA replikasyon sinyalleri ile kodlanırlar. Bu dört gen bölgesi arka arkaya ve birbirinden ayrı yerlerde bulunmazlar. Aksine birbirleri ile iç içedirler ve aynı nükleotidler ile farklı bölgelerden okumanın başlaması sonucunda farklı proteinlerin sentezlenmesi mümkün olur. Bu şekilde genomdaki nükleotid dizilerinin yarısı, birden fazla mRNA sentezi için kullanılabilir (19, 20).

- a. S geni: Pre S1, Pre S2 ve S bölgesinde büyük (39kDa), orta (31 kDa), küçük (24 kDa) olmak üzere üç yüzey proteinini kodlar.
- b. C geni: C bölgesi çekirdek proteini (HbcAg), Pre C bölgesi ise enfektivite proteini (HbeAg) olmak üzere iki ayrı proteini kodlar.
- c. P geni: DNA polimeraz, revers transkriptaz ve ribonükleaz (RNaz) aktivitesi bulunan viral polimerazı kodlar.
- d. X geni: X proteinini kodlar (31, 32).

2.1.5.Viral Proteinler

Negatif polariteli uzun iplik olan (L zinciri) üzerindeki 4 ORF bölgesi tarafından viral proteinler kodlanırlar. Bu gen bölgelerinden viral komponentlerin sentezi 4 farklı mRNA aracılığıyla gerçekleşir. Bunlar:

- a) 3.5 kb'lık mRNA: Negatif polariteli zincirden sentezlenen bu mRNA precore/core proteinleri ile polimeraz proteinlerinin sentezini yapar. Genom replikasyonu için de kalıp görevi görür.
- b) 2.4 kb'lık mRNA: PreS1, PreS2 ve S olmak üzere 3 farklı yüzey proteinini sentezletir.
- c) 2.1 kb'lık mRNA: Sadece PreS2 ve S proteinlerinin sentezinde görev yapar.
- d) 0.7 kb'lık mRNA: X proteinini sentezletir (8, 18, 23).

2.1.5.1.Yüzey (Kılıf) Proteinleri

Küçük, orta ve büyük yüzey proteinlerinin sentezi 2.1 ve 2.4 kb'lık mRNA'dan üç ayrı başlangıç kodonu ile yapılır (1). mRNA'nın amino terminalindeki başlangıç kodonundan başlayarak preS1, preS2 ve S proteinlerinden oluşan büyük(L) yüzey proteinini sentezlenir. PreS2 ve S proteinlerinden orta(M) yüzey proteini oluşturulurken sadece üçüncü başlangıç kodonundan başlayarak küçük (S) yüzey proteini sentezlenmiş olur. Her üç yüzey proteini de glikozillenmiş olarak Dane partikülü içinde yer alır (9). Büyük ve orta yüzey proteinleri Dane partikülünde eşit oranda bulunurlar. Bu proteinler tüm yüzey proteinlerinin %30'unu meydana getirirler. Küçük yüzey proteini ise Dane partikülünden 100 kat daha fazla sentezlenerek enfekte hücrelerden salınır. Sferik partiküller yalnızca küçük yüzey proteininden oluşurlar. Filamentöz partiküller küçük ve orta yüzey proteinlerinden meydana gelirler. Bu iki partikül enfekte kişilerde kana salınarak immun kompleks sendromlarının oluşmasına neden olur. Büyük yüzey proteini ise hücreden dışarı salınmaz ve fazlası hücre içinde birikerek "buzlu cam görünümü" olarak adlandırılan patolojik görüntünün oluşmasına neden olur (1, 9, 33).



Şekil 3. HBV'nin Yüzey Proteinlerini Sentezleyen Gen Bölgeleri

2.1.5.2.C proteini

C geni üzerinde Pre C ve C olmak üzere iki gen bölgesi mevcuttur. Okuma işlemi Pre C kodonundan başlarsa Pre C proteini oluşur ve HBeAg sentezi için prokürsördür. Eğer okuma işlemi C bölgesinden başlarsa C proteini sentezlenerek HBcAg oluşur (20).

2.1.5.3.P Proteini

P geni revers transkriptaz aktivitesine sahip DNA polimeraz enzimini kodlar (23). P proteininin immunojen özelliği vardır. P geni, HBV genomunun yaklaşık 3/4'ünü kaplayan en uzun gendir. Nükleotid 2309 ile 1623 arasında yer alır ve 832 aminoasitten (bazen 845 aminoaside kadar uzar) oluşmuş 92 kDa molekül ağırlığında bir protein sentezler. P proteini; revers transkriptaz, endonükleaz (RNaz H) ve hem DNA hem de RNA'ya bağımlı polimeraz aktivitesine sahiptir. P proteinin terminal kısmı negatif DNA sarmalının sentezlenmesinde RNA pregenomunun revers transkripsiyonu için “primer” olarak da hizmet verir (18, 24, 34).

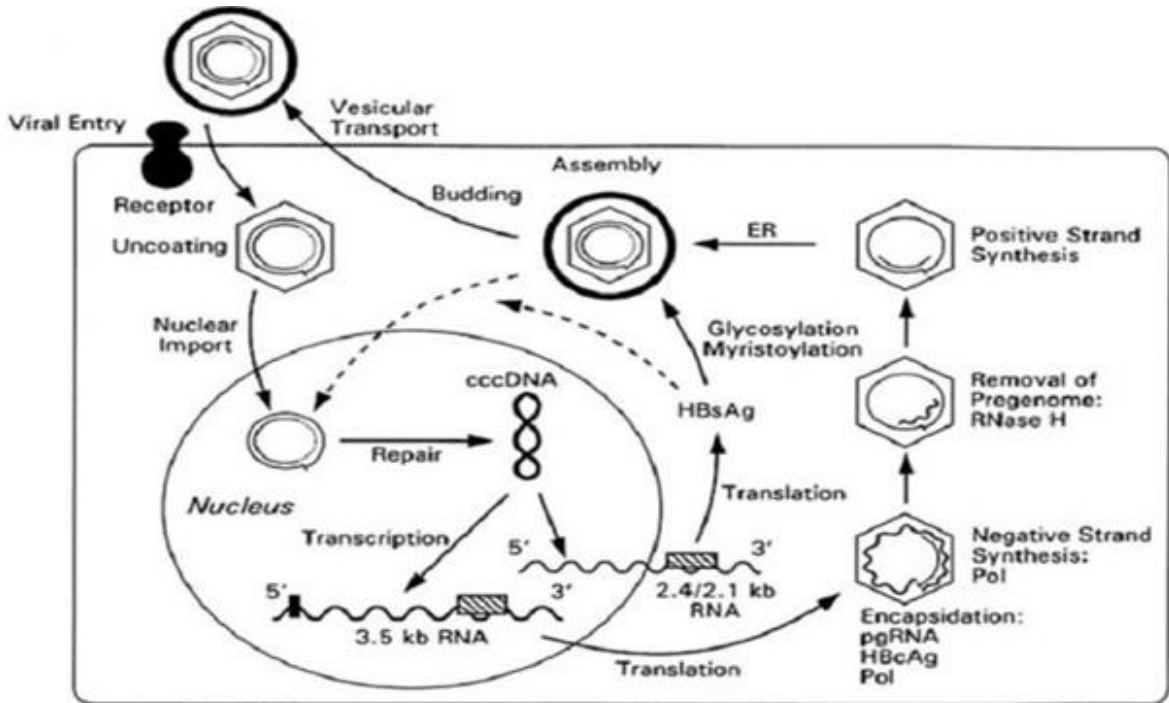
2.1.5.4.X Proteini

X geni, HBV genomundaki 1376 ile 1838. nükleotidler arasında bulunan en küçük gen bölgesidir. Doğal enfeksiyonlardaki rolü tam bilinmemekle birlikte virusun replikasyonu için gereklidir. Viral genleri ve MHC genlerini invitro olarak aktive ettiği gösterilmiştir (1, 9). X geninin hepatosellüler karsinom gelişiminden de sorumlu olduğu bilinmektedir. Çekirdekte transkripsiyon faktörlerini etkilemekte, sitoplazmada mitojenik sinyaller ile birçok promotor bölgeyi aktive etmekte, viral RNA'nın stabilitesini

sağlamakta, hücre büyümesini ve apoptozisi etkileyerek hepatokarsinogeneze yol açmaktadır (35).

2.1.6. Viral Replikasyon

HBV'nin kanıtlanmış tek enfeksiyon bölgesi hepatositler olmakla birlikte pankreasın bazı endokrin ve ekzokrin hücreleri, safra kanalı epitel hücreleri, böbrek ve lenfoid dokularda da replikasyon olabilmektedir. Ancak hepatositler dışındaki bölgelerin viral patogeneze rolü olmadığı sanılmaktadır. Lenfositlerdeki rezervuarların virusun persistansına katkısı olabileceği düşünülmektedir (1).



Şekil 4. HBV'nin Replikasyon Şeması (36).

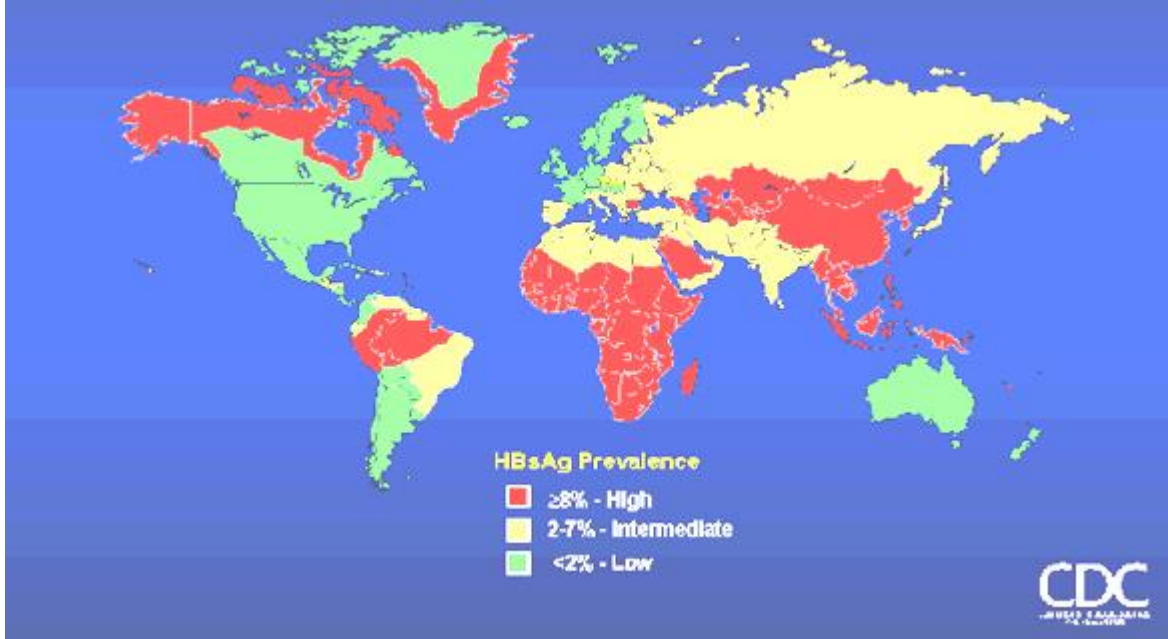
Viral replikasyon bir RNA kalıbı aracılığıyla revers transkripsiyonla sitoplazmada gerçekleşir. Negatif zincir pregenomik RNA (pgRNA) olarak adlandırılan RNA aracından, pozitif zincir ise negatif zincirden sentezlenmektedir (25).

HBV ile oluşan enfeksiyonların ilk aşaması, hedef hücreye bağlanma ile başlar. Hücre içine giriş için hepatosit reseptörü ile virusun pre S proteinlerinin etkileşimi söz konusudur. Pre S1 proteininin 3-77. aminoasitleri virusun enfektivitesi ile ilişkili bulunmuştur (36). Pre S2 proteini ise albumine bağlanarak karaciğere bağlanmada

albumini aracı olarak kullanmaktadır. Viral tutunmanın ardından nükleokapsid, füzyon yolu ile sitoplazmaya girerek burada soyunma işlemini gerçekleştirir ve genetik materyal nükleusa aktarılır. Genetik materyalin çekirdeğe taşınması pasif difüzyon ve tübüler taşınım yolu ile gerçekleşir. Çekirdekte açığa çıkan kısmen çift sarmallı viral genomun eksik olan pozitif zincirinin, endojen DNA polimeraz tarafından tamamlanmasıyla süper kıvrımlı, kovalent bağlı, sirküler yapıdaki cccDNA (*covalently closed circular DNA*) olarak isimlendirilen HBV DNA formu meydana gelir (1, 9). Viral DNA'nın RNA sentezinde kalıp görevi yapabilmesi için cccDNA gerekli olduğundan, enfeksiyonun başlangıcını gösteren bir belirteç olarak kabul edilir. Çekirdekte bulunan hücresel RNA polimeraz II enzimi ve viral düzenleyicilerin (4 adet *promoter* ve 2 adet *enhancer*) yardımıyla cccDNA'dan mRNA'lar sentezlenir. “*Core promoter*” bölgesi viral replikasyonun kilit noktasıdır ve negatif zincirden 3.5 kb'lık en büyük RNA olan pregenomik RNA (pgRNA)'yı sentezletir. Sentezlenen mRNA'lar sitoplazmaya taşınır ve orada translasyona uğrayarak viral proteinler sentezlenir. pgRNA öncelikle 200-300 molekül kadar çekirdek proteini sentezlettikten sonra viral polimeraz sentezlenir. Polimeraz sentezi pgRNA'nın kor bölgesinde bulunan bir başlangıç kodonundan başlamaktır ve aynı zamanda çekirdeğe yerleşir. pgRNA'nın 5' ucundaki e-dizisi olarak isimlendiren enkapsidasyon dizileri viral polimerazı bağlayarak kor yapımını başlatır (37). Çekirdek proteinleri ikiyeşerli olarak biraraya gelir ve disülfid bağlarıyla stabilize olur. Bu birimlerden 120 tanesi birleşerek ikozahedral yapıdaki kapsidi meydana getirir. Enkapsidasyon dizisi bulunduran pgRNA'lar kapsid içerisine girerler ve pgRNA'dan revers transkripsiyon ile negatif viral DNA zincirinin sentezini gerçekleştirirler (1, 9). Sentez viral çekirdek içinde ancak sitoplazmada gerçekleşmektedir. Bu olayla eş zamanlı olarak viral polimerazın RNaz H aktivitesi ile pgRNA yıkılır. Yine viral polimerazın DNA polimeraz aktivitesi ile 5' ucunda bulunan RNA primeri kullanılarak pozitif viral DNA zincirinin sentezi de gerçekleştirilir. Pozitif zincirin sentezi için negatif zincirin DR1 bölgesinde bulunan primer DR2 bölgesine taşınır ve sentez buradan başlar. Her iki zincirin 5' uçları bu nedenle farklıdır. Pozitif zincirin sentezi, yüzey proteinlerinin kor bölümünü çevrelemesi ve polimerazın da tükenmesi sonucu tamamlanamaz, eksik kalır. Her iki DNA zinciri 5' uçlarından bağlanarak DNA sentezi tamamlanmış olur (8, 18, 23). HBV replikasyonu sırasında sitoplazmada yeni sentezlenen viral DNA'ların birkısmı çekirdeğe taşınarak orada devamlı bir cccDNA havuzu oluşturur (18, 19).

2.1.7. Epidemiyoloji

HBV'nin bulaşı; parenteral, perinatal, horizontal ve cinsel temas ile olmak üzere farklı yollarla olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada HBeAg pozitif olgularda %91 oranında, idrarda HBV DNA pozitifliği de saptanmıştır (38).



Şekil 5. HbsAg Prevalans Haritası, 2008 (39).

Tüm dünyada hepatit B enfeksiyonu önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünyada HBV ile karşılaşmış iki milyar civarında insan olduğu tahmin edilmektedir (1). Yaklaşık 360 milyon kişide kronik HBV enfeksiyonu görülmektedir (40). Tüm dünyada, HBV enfeksiyonuna bağlı yıllık ölüm sayısının 500.000 ile 700.000 arasında olduğu sanılmaktadır (9). Kronik HBV taşıyıcılarında karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinom riski artmıştır (41).

HBV enfeksiyonunun görülme sıklığı dünyanın farklı bölgelerde değişiklik göstermektedir. Bu nedenle dünya ülkeleri üç grupta incelenmektedir:

a) Yüksek endemisite ülkeleri: HbsAg pozitifliğinin %8'in üzerinde görüldüğü ülkelerdir. Dünya nüfusunun %45'i yüksek endemisite ülkelerinde yaşamaktadır. Hindistan ve Japonya dışındaki birçok Asya ülkesi, Afrika ülkeleri, Alaska ve Yeni Zelanda gibi ülkeler bu grupta yer almaktadır. Enfeksiyon, sıklıkla kronikleşme riskinin yüksek olduğu

erken çocukluk dönemlerinde kazanılmaktadır. Yüksek endemisite ülkelerinde insanların hayatları boyunca HBV ile karşılaşma riskleri %60' tan fazladır (42).

b) Orta endemisite ülkeleri: HBsAg pozitifliğinin %2-7 arasında görüldüğü ülkelerdir. Dünya nüfusunun %43'ü bu ülkelerde yaşamaktadır. Kuzey Afrika ülkeleri, Ortadoğu ülkeleri, ülkemizin de içinde yer aldığı Akdeniz ülkeleri, Doğu Avrupa ve Rusya orta endemisite ülkeleri arasında yer almaktadır. WHO verilerine göre Türkiye orta endemisite ülkeleri arasında bulunmaktadır (42).

c) Düşük endemisite ülkeleri: Toplumdaki HBsAg pozitifliğinin %2'nin altında görüldüğü ülkelerdir. Dünya nüfusunun %12'si bu ülkelerde bulunmaktadır. ABD, Kanada, Kuzey ve Batı Avrupa ülkeleri düşük endemisite ülkelerindendir. Bu ülkelerdeki insanların yaşamları boyunca HBV ile karşılaşma riskleri %20'den azdır (42).

Orta endemisite ülkeleri arasında yer alan Türkiye' nin HBsAg pozitiflik oranı %1-14.3 arasında bildirilmiştir. Ülkemizin batı illerinde (İstanbul, İzmir vb.) bu oran %3-4.5 gibi daha düşük olmakla birlikte doğu ve güneydoğu illerinde bu oran %8-14.3'lere yükselmektedir (43-46).

2.1.8. HBV'nin Patogenezi

HBV hepatotropik bir virus olmasına karşın hepatotoksik değildir. Yüksek düzeyde viral replikasyon görülmesine rağmen normal seviyede karaciğer enzim düzeyleri ve histopatolojisi olan kronik taşıyıcılar, virusun direkt sitopatik etkisi olmadığını göstermektedir. Ayrıca hücre kültürlerinde üretilen virusun, hücre canlılığı üzerine etki etmediği saptanmıştır. HBV ile doğumda karşılaşan yenidoğanlarda yüksek viral replikasyon olmasına rağmen immatür immün sistemleri nedeniyle karaciğer hasarı hafif olmaktadır. Aksine HBV'nin neden olduğu fulminan hepatitlerde düşük virus seviyelerine rağmen güçlü immün yanıt mevcuttur. Oluşan bu immün yanıt sonucunda karaciğer dokusunda hepatosellüler nekroz meydana gelmektedir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, virusun temizlenmesi ve hepatosit harabiyetinden sitotoksik hücrelerin sorumlu olduğunu göstermiştir (47). Ancak sitotoksik hücre sayısının, virusla enfekte hücre sayısına göre az olması virusun temizlenmesinde inflamatuvar sitokinlerin aracılık ettiği ikincil mekanizmaların olduğunu düşündürmektedir. Özellikle tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve

(interferon- γ)IFN- γ , HBV'nin temizlenmesinde önemli rol almaktadır. Bu sitokinler nükleokapsidlerin ve viral RNA'nın yıkılmasını sağlamaktadırlar.

Sitokinler, konak savunmasında viral replikasyonu baskılayarak “direkt” veimmün yanıt tipini belirleyerek “indirekt”olarak rol alırlar. Akut enfeksiyonda güçlü poliklonal hücresel yanıt hastalığın seyrini belirlemektedir. Etkin immün yanıtın başlatılması için interferon (IFN γ/β) salınımı gereklidir. Bu sayede HBV DNA miktarı düşürüldükten sonra doğal ve özgül immün yanıt hücreleri hepatosite göç ederler. CD8+ sitotoksik T hücrelerinin (Tc) enfekte hepatositleri temizlemesi ALT yükselmesi ile birliktedir. Daha sonra antikor yanıtı oluşmaktadır. Bellek hücreleri oluşarak reenfeksiyon ve reaktivasyon engellenmektedir. Akut enfeksiyonda HBcAg, HBeAg ve HBsAg'ye karşı güçlü CD4+ T hücre (T helper) yanıtı meydana gelir. HBcAg'ye karşı MHC sınıfıII CD4+ T hücre yanıtları vireminin kontrolündeki en etkin mekanizmadır ve bu yanıt HBV'nin serumdan temizlenmesi ile aynı döneme rastlar. Anti-HBs sentezi T hücresine bağımlıdır. CD4+ T hücreleri, CD8+ sitotoksik T hücrelerini aktive etmektedir. Kronik enfeksiyonda bu yanıtın zayıfladığı görülmektedir. İyileşen akut HBV enfeksiyonunda hücresel yanıtın gücü yanında, fonksiyonel yanıtı da farklılık gösterir. İyileşen akut HBV enfeksiyonunda CD4+ T hücrelerinde tip 1 (Th1) sitokin yanıtı, kronik enfeksiyonda tip 2 (Th2) sitokin yanıtı görülür (48).

Kendisini sınırlayan akut HBV enfeksiyonunda tip 1 T hücre yanıtının yanında güçlü sitotoksik T lenfosit (Tc) yanıtı da vardır. Çekirdek, zarf ve polimeraz proteinlerine karşı gelişen bu Tc yanıtı virusun temizlenmesini sağlamaktadır. Karaciğer hücrelerinin sıkı yapısı Tc'lerin enfekte hücelere ulaşmasını engellemektedir. Tc'lerden salınan sitokinler direkt olarak HBV replikasyonunu engellemektedir. TNF- α , HBV mRNA'sının yıkımını hızlandırır. Core promotor bölgesi IFN- γ , IFN- α ve TNF- α varlığında inhibe olmaktadır (1).

HBV spesifik Tc'ler, hem HBV enfeksiyonunun kontrolünde hem de hepatosit hasarında rol almaktadır. Kronik enfeksiyonda Tc yanıtı periferde zayıfda olsa karaciğerde devam etmektedir. Normal immün yanıtı sahip olan kişilerde HBV enfeksiyonunu takiben hepatosite giren HBV, immün sistem tarafından tanınmalıdır. Hepatosittensalınan IFN- α ve IFN- γ , “*Major Histocompatibility Complex*” (MHC) sınıf I ve II'yi uyarır. MHC sınıf I, HBV'nin hücreiçindeki antijenik işaretlerini hepatosit yüzeyinde Tc'ye tanıtır. Dahasonra Fas ligandı, sitokinler ve perforinler aracılığı ile enfekte hepatosit apoptozise uğratılırve

yok edilir. Apoptotik hücreler biyopsi materyallerinde asidofilik “*Councilman* cisimcikleri” olarak görülmektedir (1, 9). MHC sınıf II ise, HBV’nin plazmadaki HBcAg ve HBeAg gibi antijenik işaretlerini makrofajlar üzerindeki CD4+ T hücrelerine (T helper) sunar ve onları hassas hale getirir. CD4+ T lenfositlerinden interlökin-2 (IL-2), interlökin-4 (IL-4), interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10), TNF- α ve IFN- γ salınarak virus elimine edilir. Ayrıca hem Tc’ler hem de B hücreleri uyarılarak antikor cevabı sağlanır. Bu şekilde oluşan cevaba Th1 cevabı denir. Taşıyıcılar ve kronik karaciğer hastalarında ise IFN yetersizliği, antijen sunumunda eksiklik, T lenfosit cevabında azalma sonucu immün cevap yeterince oluşamaz ve virüs vücuttan temizlenemez. Bu tip cevaba da Th2 cevabı denir. Taşıyıcılar ve kronik karaciğer hastalarındaki yetersiz immün cevabın nedeni tam açık değildir. Sonuç olarak HBcAg/HBeAg spesifik Th1/Th2 tipinde immün cevap karaciğer hasarının seyri ve prognozunda önemli görülmektedir (49).

2.1.9. HBV Enfeksiyonunun Klinik Seyri

HBV enfeksiyonu dört farklı klinik dönemde incelenmektedir:

a) **İmmün tolerans dönemi**: Virus replikasyonu yüksek olmasına karşın klinik belirtilerin bulunmadığı, karaciğer enzimlerinin normal olduğu dönemdir. Bu dönem yenidoğanlarda onlarca yıl sürebilir (1).

b) **İmmünolojik yanıt dönemi**: İnflamatuar cevabın meydana geldiği, hücre harabiyeti ile giden, erişkinlerde akut hepatit tablosunun görüldüğü dönemdir. Enfekte hücrelerin yok edilmesi sonucu HBV DNA düzeyleri düşüktür. Kronik hastalarda bu dönem on yıl ya da daha fazla sürmektedir (1).

c) **Viral replikasyonun baskılandığı dönem**: Konak immün yanıtı ile viral replikasyon durur. HBeAg’nin kaybolup Anti-HBe’nin oluştuğu dönemdir. Karaciğer enzimleri normale döner. HBsAg halen pozitifdir. HBV, hepatosit DNA’sına entegre olur (1).

d) **İmmün dönem**: HBsAg’nin negatifleştiği ve Anti-HBs antikorlarının oluştuğu son dönemdir (1).

Diğer virüslerle enfeksiyon, immünsupresyon, HBV mutantları, genetik özellikler ve cinsiyet gibi faktörlere bağlı olarak enfeksiyon, bu dönemlerden birinde duraklayarak kronik hastalık gelişimine neden olabilir. Hastalarda asemptomatik enfeksiyondan

fulminan hepatite, siroz ve hepatosellüler karsinoma kadar değişebilen farklı klinik tablolar meydana gelebilir (50).

2.1.10. HBV Enfeksiyonlarının Tanımı

Akut enfeksiyon: Alınan virüs miktarı ve konak immünitesine göre değişmekle birlikte 45-120 gün arasında değişen inkübasyon dönemi ile başlamaktadır (1). Akut enfeksiyon asemptomatik olarak geçirilebildiği gibi kolestatik hepatit ve nadiren de fulminan hepatit şeklinde de olabilmektedir. Virusun alınmasını takiben altı hafta sonra HBsAg ve diğer aktif viral replikasyon göstergeleri pozitifleşir ve karaciğer enzimleri yükselir. Semptomatik enfeksiyon kişinin yaşı ile ilişkilidir. Okul öncesi çocuklarda genellikle asemptomatik enfeksiyon görülmektedir. Erişkinlerde ise yorgunluk, halsizlik, iştahsızlık, bulantı, hafif ateş, sarılık ve hepatomegali gibi hepatik fonksiyon bozukluğu belirtileri görülür. Sarılıklı olgularda idrar renginde koyulaşma, skleralarda ve ciltte sararma gibi bilirubin yüksekliğine bağlı bulgular vardır (19). Fulminan hepatit gelişen olgularda kanama diyatezi, hepatorenal sendrom, hepatik ensefalopatiye akut karaciğer yetmezliği gelişir. Akut hepatitli olgularda antikor antijen komplekslerine bağlı olarak serum hastalığı, poliarteritis nodosa, membranoprolifretif glomerulonefrit ve çocuklarda papüler akrodermatit görülebilmektedir (33). Akut enfeksiyon geçirenlerin çoğunda yeterli immün yanıt ile iyileşme görülür. Virus karaciğerden tamamen temizlenir. Oluşan Anti-HBs kişiyi yeni enfeksiyonlara karşı korur (1).

Kronik enfeksiyon: HBV ile enfekte kişilerin %5-10'unda akut enfeksiyon sonrasında virus karaciğerden temizlenemediği için meydana gelir. Bu insanların yaklaşık üçte ikisi kronik pasif hepatite dönüşürken üçte biri, karaciğerde nedbeleşme, siroz, karaciğer yetmezliği ve hepatosellüler karsinoma yol açabilen kronik aktif hepatite dönüşür. Kronik aktif hepatitli olgularda hepatit D virusu ile (HDV) koenfeksiyon meydana gelebilir ve bu durumda fulminan hepatit tablosu da görülebilir (17). Kronik enfeksiyonlu kişilerde HBsAg pozitifliği altı aydan uzun sürerken anti-HBs antikorları ise saptanamaz. Enfeksiyonun kronikleşmesi ile yaş ve immün sistemin durumunun yakından ilişkisi bulunmaktadır. Doğumda HBV enfeksiyonu meydana gelen bebeklerde %80-90 oranında kronikleşme gözlenirken erişkinlerde bu oran %5-10'dur. Hemodiyaliz hastaları, organ transplantasyon alıcıları ve kemoterapi hastalarında kronik enfeksiyon riski

yüksektir. Transaminazları normal, karaciğer biyopsisinde normal histolojik yapı ya da portal alanda minimal mononükleer hücre infiltrasyonu görülen asemptomatik olgulara “kronik persistan hepatit” denir. Kronik aktif hepatit olgularında ise orta-belirgin derecede karaciğer enzimlerinde yükselme ve biyopside “*piecemeal*” nekrozu, lobuler inflamasyon ve asidofilik “*Councilman* inklüzyon cisimcikleri” görülür (51). Karaciğer enzimleri normal olup normal karaciğer histolojisine sahip grup sağlıklı taşıyıcı olarak isimlendirilir.

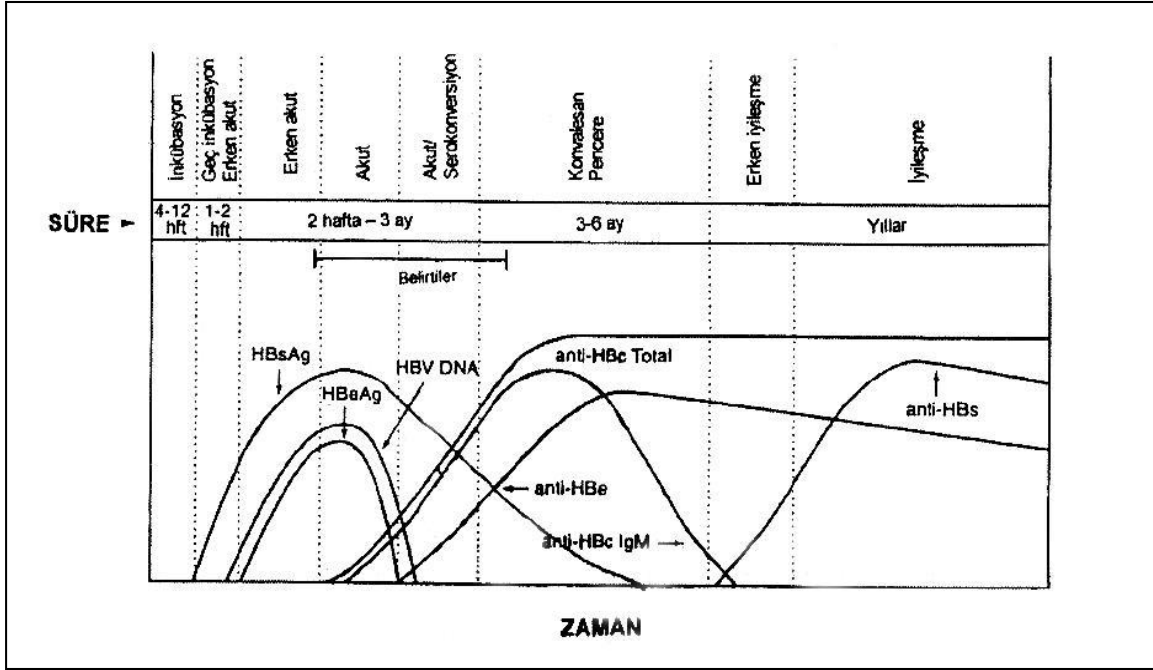
Kronik HBV enfeksiyonunun son yıllarda tanımlanan bir formu da “okült hepatit” olarak isimlendirilen gizli enfeksiyonudur. HBsAg negatif olmasına rağmen serum ya da karaciğer dokusunda HBV DNA pozitif olarak saptanmaktadır (52).

Dünyada her yıl hepatosellüler karsinom (HCC) nedeniyle 500.000 kişi ölmektedir. HBV enfeksiyonu HCC gelişiminde en önemli risk faktörü olarak kabul edilmektedir. HBV ile enfekte kişilerde hayat boyu HCC gelişme riski %10-25 olup, enfeksiyonun başlamasından yaklaşık 30-50 yıl sonra gelişir. Hastada siroz gelişmişse HCC riski daha da yükselmektedir (1).

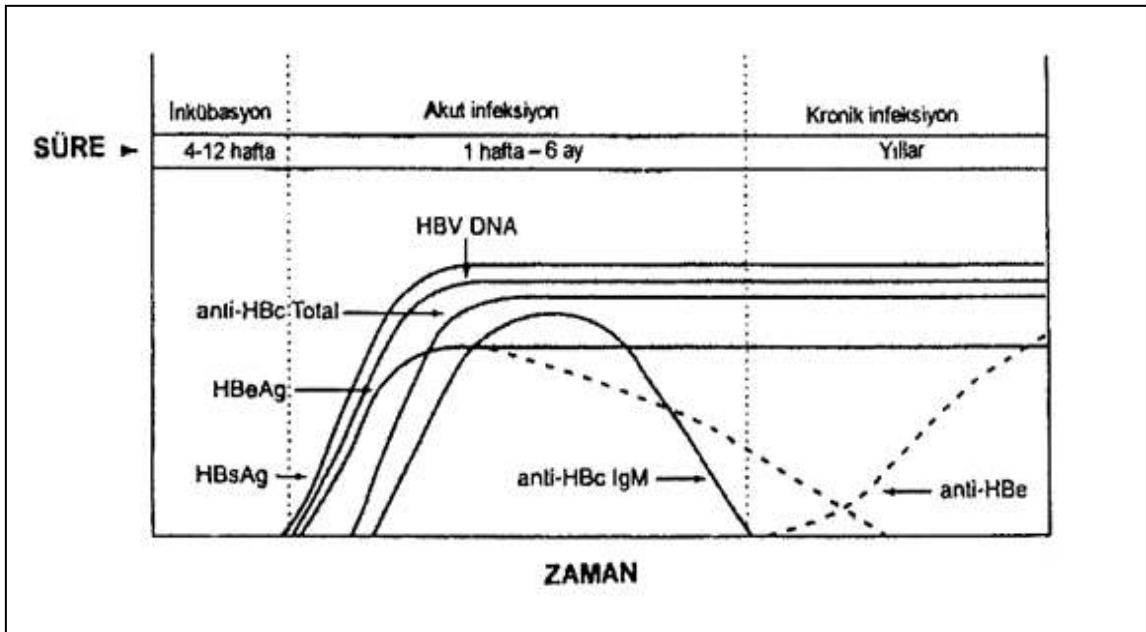
2.1.11. Tanı

2.1.11.1.Serolojik Testler

HBV’ye ait antijenlerin ve antikorların hasta serumunda saptanması enfeksiyonun özgül tanısı için kullanılan en yaygın yöntemdir. Virusa ait HBsAg ve HBeAg ticari olarak bulunan birçok “*enzyme immunoassay*” (EIA) ve “*radio immunoassay*” (RIA) kiti aracılığıyla saptanabilir. Bu antijenlere karşı gelişen antikorlar (anti-HBc IgM, total anti-HBc, total anti-HBs ve anti-HBe IgG yine ticari kitler kullanılarak tespit edilebilir (33, 53, 54). Akut ve kronik HBV enfeksiyonunun serolojik göstergeleri Şekil 6-7’de gösterilmiştir.



Şekil 6. İyileşme ile Sonlanan Akut HBV Enfeksiyonunda Serolojik Göstergeler (33).



Şekil 7. Akut Hepatiti İzleyerek Kronikleşen HBV Enfeksiyonunda Serolojik Göstergeler (33).

HBsAg; hem akut hem de kronik enfeksiyonun tanısında kanda saptanabilir (9). Akut enfeksiyonda semptomların başlamasından 3-5 hafta önce kanda tespit

edilebilmektedir. Hastalığın iyileşmesi ile 4-6 ay içinde yavaş yavaş azalarak kaybolur. HBsAg'nin 6 aydan daha uzun bir süre kalması enfeksiyonun kronikleşebileceğini düşündürür (55). Ayrıca HBV aşılması sonrasında da kısa bir süre HBsAg pozitifliği de saptanabilmektedir. Bu sürenin 18 güne kadar uzayabildiğini gösteren bir çalışma da mevcuttur (56).

HBeAg; akut enfeksiyonda HBsAg'yi izleyerek pozitifleşir ve HBsAg'den önce kaybolur. Aktif viral replikasyonun göstergesidir. HBeAg pozitifliği olan hastaların bulaştırıcılığı daha fazla olmaktadır. Kanda virusun fazla olduğunu göstermektedir. HBsAg negatif ise HBeAg saptanamaz. Ters bir durumda mutant virus varlığı araştırılmalıdır. HBeAg pozitif kronik vakalarda ağır karaciğer hastalığı gelişme riski artmıştır. Enfeksiyon ilerledikçe aktif viral replikasyonun azalması sonucu, hastaların yaklaşık %50'sinde spontan HBeAg serokonversiyonu gelişebilmektedir (57).

Anti-HBe; HBeAg'ye karşı gelişen antikorlardır. HBeAg'nin kaybolmasını takiben en geç 1-2 hafta içinde ortaya çıkmaktadır. Bazı olgularda kısa bir dönem HBeAg ile birlikte pozitif olarak saptanabilmektedir. Anti-HBe'nin saptanması akut enfeksiyonda viral replikasyonun azaldığını gösterir, hastalığın iyileşmeye yöneldiğinin habercisi olarak kabul edilir. Kronik enfeksiyonda ise anti-HBe enfektivitenin ve viral replikasyonun azaldığını gösterir. Bu nedenle Anti-HBe, HBsAg ve HBV DNA hastalığın takibinde kullanılan önemli göstergelerdir (58).

Anti-HBc IgM; akut HBV enfeksiyonunun göstergesidir. HBsAg pozitifliğinden 1-4 hafta sonra saptanır ve pencere dönemindeki tek pozitif göstergedir. "Pencere dönemi" HBsAg ve HBeAg'nin kaybolduğu ancak bu antijenlere karşı antikorların saptanabilir düzeye gelmediği dönemdir. Anti-HBc IgM, 3-12 ay içinde azalarak serumdan kaybolur, kronik enfeksiyonların akut alevlenmesinde tekrar pozitif olarak saptanabilir (9).

Anti-HBc IgG ve total anti-HBc; anti-HBc IgG, anti-HBc IgM'den sonra pozitifleşerek ömür boyu pozitif kalır. Kişinin HBV enfeksiyonu ile karşılaştığının bir göstergesidir. Uzamış pencere döneminde, HBsAg'nin saptanamayacak düzeyde düşük olduğu kronik enfeksiyonlarda veya serolojik çapraz reaksiyonlara bağlı durumlarda tek başına pozitif olarak saptanabilir. İyileşmiş HBV enfeksiyonlarında anti-HBs antikorlarının saptanamayacak düzeye indiği durumlarda salt anti-HBc pozitifliği görülebilmektedir. HIV enfeksiyonu gibi bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlarda da Anti-HBs kaybolabilir ve tek enfeksiyon göstergesi olarak anti-HBc pozitifliği bulunabilir. Ayrıca hepatit C

virusu (HCV) ve HDV gibi koenfeksiyonlarda HBsAg salınımı baskılanarak salt anti-HBc IgG pozitifliği saptanabilmektedir (59).

Anti-HBs; akut enfeksiyondan sonra hastalığın iyileşme ile sonlandığını ve bağışıklık geliştiğini gösterir. Oluşan anti-HBs ve anti-HBc antikorları genellikle ömür boyu saptanabilir düzeyde kalır. Bununla birlikte %15 olguda 6 yıl içinde anti-HBs'nin kaybolduğunu bildiren çalışmalar vardır (58). Aşılamadan sonra da anti-HBs pozitifleşir fakat anti-HBc antikorları negatiftir. Aşılamadan sonra serumda ölçülen 10 IU/ml'nin üzerindeki anti-HBsantikor düzeyleri koruyucu kabul edilir (9). Bazı kronik HBV enfeksiyonu olgularında HBsAg ile beraber düşük titrede anti-HBsantikorları bulunabilmektedir ancak genellikle HBsAg ile immün kompleksler oluşturduğundan tespit edilememektedir. HBV serolojik testlerinin yorumlanması Tablo 2'de belirtilmiştir.

Tablo 2. HBV Serolojik Testlerinin Yorumlanması (25).

	HBsAg	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HBc IgM	Anti-HBc IgG	Anti-HBs	HBV DNA
Erken enfeksiyon dönemi	+	-	-	-	-	-	+
Akut enfeksiyon	+	+	-	+	+/-	-	+
Pencere dönemi	-	-	-	+	+/-	-	-
Akut hastalığın nekahat dönemi	-	-	+	+	+	-	-
Geçirilmiş enfeksiyon	-	-	+/-	-	+	+	-
Kronik enfeksiyon (enfektivitesi yüksek)	+	+	-	-	+	-	+
Kronik enfeksiyon	+	-	+	-	+	-	+/-
Kronik enfeksiyon	-	-	+	-	+	-	+/-
Salt Anti-HBc pozitifliği (düşük düzey enfeksiyon)	-	-	-	-	+	-	+
Salt Anti-HBc pozitifliği (eskiden geçirilmiş enfeksiyon?, yalancı test pozitifliği?)	-	-	-	-	+	-	-
Aşılama ile kazanılmış bağışıklık	-	-	-	-	-	+	-

2.1.11.2. Moleküler Testler

Serolojik göstergeler, bazen HBV enfeksiyonun tanısında yetersiz kalabilmektedir. Gizli HBV enfeksiyonu veya mutant virus enfeksiyonları varlığında viral replikasyonun gösterilmesi için HBV DNA araştırılması gerekmektedir. Antiviral tedavi endikasyonunun belirlenmesinde ve tedavi takibinde HBV DNA ölçümü gereklidir (60). PZR temelli kalitatif ve kantitatif HBV DNA testleri mevcuttur. Hibridizasyon ve sinyal

amplifikasyonu gibi yöntemler kullanılarak HBV DNA alt saptama sınırları düşürülmeye çalışılmıştır. Farklı kitlerle saptanan DNA miktarlarının karşılaştırılabilmesi amacı ile Dünya Sağlık Örgütü tarafından uluslar arası bir standart getirilmiştir. Günümüzde kullanılan kitler bu aralığı referans aldıkları için sonuçları karşılaştırılabilmektedir (61).

Karaciğer dokusunda HBV replikasyon araçlarının saptanması da viral replikasyonun duyarlı bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Antiviral tedavinin ardından serumda HBV DNA saptanamazken, hepatositlerde replikasyon devam edebilmektedir. Bu nedenle cccDNA ve viral mRNA'lar araştırılmalıdır. Gerçek zamanlı PZR metodu ile kantitasyonu yapılabilen replikasyon araçları tedavi izleminde önemlidir. Ancak bu testlerin rutin kullanıma girebilmesi için standardizasyonu gerekmektedir (62).

2.1.12. Tedavi

Akut HBV enfeksiyonun tedavisi: Destek tedavisi uygulanır. Antiviral tedavi endike değildir. Karaciğer yetmezliği yönünden hasta takip edilmelidir. Fulminan hepatit gelişen hastalarda karaciğer transplantasyonu gerekebilir.

Kronik HBV enfeksiyonun tedavisi: Tedavinin ana hedefi bulaştırıcılığın önlenmesi, viral replikasyonun baskılanması ve karaciğer histolojisinin bozulmasının engellenmesidir. Bu dönem viral replikasyonun durması, HBV DNA negatifleşmesi, HBeAg'nin kaybolması, anti-HBe serokonversiyonu, karaciğer inflamasyonunun azalması ve enzimlerinin normale dönüşü ile takip edilir (63, 64). Kronik HBV tedavisinde FDA onayı alan ilk ilaç alfa-interferon'dur. Daha sonra pegil interferonlar kullanıma girerek daha uzun etki ve daha az yan etki ile immünomodülatör tedavi sağlanabilmektedir. HBV viral polimerazını inhibe eden antiviral ajanlar tedavideki diğer seçeneklerdir (65). Lamivudin, adefovir dipivoksil, entekavir, telbivudin, tenofovir, disoproksil fumarat HBV enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan başlıca antiviral ilaçlardır. Antivirallerle tedavi reaktivasyonları önlemek amacı ile uzun süre devam ettirilmelidir (66, 67).

2.1.13. Korunma ve Kontrol

HBV enfeksiyonundan korunma, pasif immünizasyon ve aktif immünizasyon olmak üzere iki şekilde olmaktadır.

Pasif immünizasyon; HBsAg pozitif anneden doğan bebeklere, HBsAg pozitif kan veya vücut sıvıları ile perkutan/mukozal temas edenlere, HBsAg pozitif bir partnerle cinsel ilişki yaşayanlara anti-HBs içeren hepatit B hiperimmunoglobulini (HBIG) 100-200 IU/ml uygulanır .

Aktif immünizasyon; Aşı için HBsAg içeren rekombinant aşılar kullanılarak 0, 1 ve 6. ayda olmak üzere 3 dozlu veya 0, 1, 2 ve 12. ayda uygulanan 4 dozlu şemalar kullanılır. Aşılamayı takiben oluşan 10IU/L ve üzerindeki anti-HBs düzeyleri koruyucu olarak kabul edilmektedir (68).

HBV bulaşını azaltıcı önlemlerin alınması temel hedeftir. Genel hijyen önlemlerinin yanında kan ve kan ürünlerinin taranması, gebe takiplerinde serolojik testlerin yapılması, güvenli cinsel yaşam eğitimi, damar içi uyuşturucu kullanımının rehabilitasyonu ve eğitimi dikkat edilmesi gereken konulardır (57).

2.2. Sitokinler

Sitokinler, hücre bölünmesi, immünite, inflamasyon, başkalaşım, doku içine hareket ve tamir mekanizmaları gibi olaylarda görev alan 15-30 kDa'luk düşük moleküler ağırlığa sahip salgısal proteinlerdir. Sitokinler uyarılmış lenfositler, monositler, makrofajlar ve diğer bazı hücreler tarafından sentezlenirler. Salındıkları hücre çevresindeki hücrelere (parakrin), salındıkları hücreler üzerine doğrudan (otokrin) etki yaparak ya da dolaşıma salınarak uzaktaki hücrelere (endokrin) etki gösterirler (69).

Sitokinler etkilerini hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla oluştururlar. Etki edecekleri hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak hücrenin RNA ve protein sentez kalıplarını değiştirirler. Sitokin reseptörleri sitoplazmik kuyruklarında, uyarım sonrası uygun adaptör proteinlerin toplanmasını hızlandırmak amacı ile protein-protein etkileşim bölgeleri ya da fosforilasyon motifleri bulundurulur. Sitokin reseptör aktivasyonları sıklıkla ligand uyarımı sonucu reseptör alt ünitelerinin dimer ya da trimer şeklinde birleşmeleri ile

gerçekleşir. Takiben reseptörleri ile sitoplazmik kuyruklarının geçici birleşmeleri aracılığıyla sinyaller hücre içine iletilir (4).

Genel olarak sitokinler “*pleiotropik*”etkilidirler; çeşitli hücre tiplerinde çoklu etki gösterirler. Ancak, reseptör komponentlerini paylaştıkları ve ortak transkripsiyon faktörleri kullandıkları için sitokinlerin etkileri arasında benzerlikler bulunmaktadır. Örneğin IL-4’ün birçok biyolojik aktivitesi interlökin-13 (IL-13) ile benzerlik göstermektedir. Yine de bütün sitokinlerin kendilerine özgü birkaç tane özellikleri bulunmaktadır (4).

Lenfositlerin gelişimi, kronik inflamatuvar yanıtın oluşması, doğal bağışıklık mekanizmalarının aktivasyonu ve kemik iliğinde hematopoezin kontrolünde sitokinlerin rolü oldukça önemlidir. Kemik iliğinde kök hücrelerden kan elemanlarının oluşması, stromal hücrelerden üretilen sitokinler aracılığı ile olmaktadır. Bu sitokinler arasında granülosit-makrofaj koloni stimulator faktör (GM-CSF), granülosit koloni stimulator faktör (G-CSF), IL-6, IL-7 velösemi inhibitör faktör (LIF) bulunmaktadır (4).

Enfeksiyonun erken evresinde doğal bağışıklık sistemi hücreleri tarafından oluşturulan sitokinler, edinsel bağışık yanıtı etkileyen ana unsurlardandır. Antijene özgül T hücrelerinin, mikrobiyal patojenleri sunan dendritik hücrelerle karşılaşacakları lenf düğümlerine gitmesi sonrasında, sunulan ürünlere bağlı olarak dendritik hücreler tarafından salgılanan özgün sitokinler T lenfositlerin hangi alt tipe dönüşeceklerini belirlemektedirler. Bu dönüşüm Th1 ya da Th2 fenotipi şeklinde olmaktadır. Lenfoid germinal merkezlerde ise B-blastlardan antikor salgılayan plazma hücrelerinin oluşumu, hafıza B hücrelerinin dönüşümü yine sitokinler aracılığı ile olmaktadır (4). Lenfositlerin uyarılması ve inflamatuvar yanıtın başlatılmasında hayati öneme sahip bu sitokinler “**proinflamatuvar sitokinler**”olarak isimlendirilmektedir (70). Uyarıcı ajanın inflamatuvar işlemlerle yok edilmesinin ardından, bu işlemlerin sonlandırılması da gerekmektedir. Bu immünoregülatuar görevi yerine getiren sitokinler ise “**antiinflamatuvar sitokinler**”olarak adlandırılırlar. Başlıca proinflamatuvar sitokinler interlökin-1, tümör nekrozis faktör- α , interlökin-6, interlökin-8, interlökin-11, interlökin-12 vekemokinlerdir. Bunların başlıca sistemik etkileri hücre aktivasyonu ve çoğalması,nötrofili, ateş ve akut faz proteinlerinin indüksiyonu, kapiller geçirgenliğin artması,kompleman aktivasyonu, hipotansiyon ve şok olarak özetlenebilir.Antiinflamatuvar sitokinler ise interlökin-4, interlökin-10, interlökin-13, interlökin-16, interferon- α ’dır. Antiinflamatuvarsitokinlerin başlıca görevleri proinflamatuvar sitokinlerin etkilerini ortadan kaldırmaktır (70).

2.2.1. İnterlökin-1 (IL-1)

Monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, B lenfositler ve endotel hücreler tarafından salgılanan, immunolojik reaksiyonların ve inflamasyonun başlaması için önemli bir mediatördür. IL-1'in α ve β olarak kodlanan iki farklı tipi vardır (71). Her iki tip arasında %25 homoloji vardır ve biyolojik etkinlikleri aynıdır (69). İnterlökin-1 hemen hemen tüm doku ve organ sistemlerinde etkili olabilen 17,5 kDa ağırlığında, polipeptid yapıda bir sitokindir (72). Etkileri aşağıda sıralanmıştır:

- B hücre proliferasyonunu ve T hücre aktivasyonunu sağlar,
- IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF, IFN, GM-CSF, prostaglandin E2 (PGE2) salgılanmasını uyarır,
- Adezyon moleküllerinin üretimini artırır,
- Ateşi yükseltir,
- Nötrofili yapar,
- Hepatositleri aktive ederek akut faz proteinlerinin salgısını artırır,
- Osteoklastları uyarak kemik yıkımını artırır,
- Kaslarda protein yıkımı gibi katabolik etkileri vardır,
- Özellikle sıtma gibi bakteriyel enfeksiyonlara, letal radyasyona ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarına karşı nonspesifik direnç sağlar,
- TNF ile sinerjistik etkileri vardır (4, 69, 71, 72).

İnterlökin-1 reseptörleri (IL-1R) tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki çeşittir. Sinyal üretimine sadece tip 1 reseptörler aracılık eder. IL-1'in etkileri aynı hücreler tarafından kendi etkilerini baskılamak üzere üretilen bir IL-1 reseptör antagonisti (IL-1RA) tarafından kontrol edilir (73). IL-1 ve IL-1RA arasında fizyolojik bir denge mevcuttur. Gönüllüler üzerinde yapılan çalışmalarda plazmaya lipopolissakkarit enjekte edildikten sonra meydana gelen IL-1 salınımının ardından 2 saat içinde en yüksek düzeye ulaşan, 3-6 saat içinde de neredeyse yaklaşık 100 kat kadar artış gösteren IL-1RA salınımı olduğu gösterilmiştir. İnflamasyon, enfeksiyon gibi çeşitli hastalıklarda ve ameliyat sonrasında, dolaşımda antiinflamatuvar protein üretimi ile IL-1RA düzeyleri yükselir. İnterlökin-1'in hedef hücreler üzerindeki etkisini bloke eden IL-1RA salınımı normal fizyolojinin devamının sağlanmasında da hayati önem taşımaktadır (74).

2.2.2. İnterlökin-2 (IL-2)

T hücresi büyüme faktörü (TCGF) olarak da isimlendirilen 15 kDa ağırlığındaki IL-2, başlıca Th1 hücreleri tarafından salınmakla birlikte bazı durumlarda Th2 ve NK hücreleri tarafından da salınabilmektedir. Etkileri şu şekilde olmaktadır:

- Aktive T ve B hücrelerinin proliferasyonunun sağlar,
- Antikor yapımını indükler,
- Nötrofillerin ve NK hücrelerinin sitotoksitesini artırır,
- IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, IFN- γ , TNF- β , TGF- β sentezlerini artırır,
- IL-2, otokrin etki ile kendisini sentezleyen hücreleri uyarak salınımını artırır (69).

2.2.3. İnterlökin-4 (IL-4)

B hücresi büyüme faktörü (BCGF) olarak da bilinen IL-4, Th2 lenfositler, sitotoksik T lenfositler, NK ve mast hücreleri tarafından salınan 20 kDa ağırlığında bir glikoproteindir (71, 75). Temel fizyolojik etkisi alerjik olayları düzenlemek olan IL-4'ün işlevleri şunlardır:

- Makrofajlarda MHC klas II üretimini aktive eder,
- Mast hücrelerini farklılaştırır,
- Aktive B hücrelerinin proliferasyonunu ve IgE salınımını sağlar,
- Th2 oluşumunu uyarır,
- IL-12 üretimini azaltarak Th1 oluşumunu baskılar,
- Makrofaj fagositozunu artırır,
- IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α ve nitrik oksit sentezini baskılar,
- IL-1RA salınımını uyarır.

IL-4 ve IL-13 birçok nitelikleri benzerdir ve IL-4R α geni, IL-4 ve IL-13'e bağlanabilen tip I transmembran proteini olan IL-4 reseptörünün alfa zincirini kodlar (4, 71, 72).

2.2.4. İnterlökin-6 (IL-6)

İnterlökin-6, mononükleer fagositik hücreler, vasküler endotel hücreleri, fibroblastlar tarafından sentezlenen 26 kDa moleküler ağırlığındadır bir sitokindir. IL-6 özellikle hepatositler ve B lenfositler üzerine etkilidir ve görevleri şunlardır (75):

- B hücrelerinin immünglobulin yapımını indükler,
- T hücrelerini aktive ederek IL-2 yapımını artırır,
- Kemik iliğinde hematopoietik koloni stimülasyonu için kofaktördür,
- Hepatositleri aktive ederek akut faz proteinlerinin sentezlenmesine neden olur,
- Ateşe yapıcı etkisi vardır,
- Hipofiz ön lobundan prolaktin, büyüme hormonu, luteinizan hormon salınımını uyarır,
- Glukokortikoid sentezini indükler,
- Osteoklastları aktive eder,
- IL-1 ve TNF ile sinerjistik etki gösterir (69, 71, 72, 75).

İnterlökin-6, birçok inflamatuvar olayda ve kanser gelişiminde rol alan bir sitokindir (76). Plasmositom ve myelomlarda malign plazmahücrelerininotokrin büyüme faktörü olarak IL- 6'yı salgıladıkları bilinmektedir (77).

2.2.5. İnterlökin-10 (IL-10)

İnterlökin-10, 18 kDa'luk bir sitokin olup CD4+ yardımcı hücrelerinin Th2 alt grubu tarafından üretilir. Ayrıca bazı aktive B hücreleri, Th1 hücreleri, aktive makrofajlar ve bazı non-lenfositik hücre tipleri (keratinositler) tarafından da üretilmektedir. IL-10'un temel biyolojik etkinliği, T hücrelerinden sitokin yapımını baskılamak olduğu için "sitokin sentez inhibitörü" olarak adlandırılmaktadır. IL-10'un fonksiyonları şunlardır: (78).

- Th1 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder,
- B hücre proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu artırır,
- NK ve makrofaj aktivasyonunu engeller,
- IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ , GM-CSF, G-CSF sentezini inhibe eder,
- TGF- β ile sinerjistik etki gösterir.

Birçok enfeksiyon sırasında IFN- γ cevabına, IL-10 yapımı da eşlik etmektedir. Bu durumun tip 1 sitokin cevabı sonucunda oluşabilecek doku harabiyetinin minimize edilmesi için meydana geldiği düşünülmektedir (77, 69).

2.2.6. İnterlökin-12 (IL-12)

İnterlökin-12, T ve B lenfositler, NK hücreleri, dendritik hücreler ve monositler tarafından üretilen 70 kDa'luk heterodimer yapıda bir polipeptiddir (69, 78). IL-12'nin etkileri şunlardır:

- Th1 başkalaşımı için kritik bir sitokindir (stimülasyon),
- IFN- γ üretimi ve T lenfositlerine etkisi nedeniyle hücre yanıtının önemli bir düzenleyicisidir,
- Hücre içi bakterilere karşı erken yanıtta ana mediatördür ve bu mikroplara karşı hücresel cevabın anahtar indükleyicisidir,
- NK hücrelerinin en güçlü uyarandır ve sitotoksik aktivitelerini artırır,
- IL-8 ve IFN- γ transkripsiyonunu tetikler,
- Sitotoksik T hücre cevabını uyarır,
- IL-2 ile kuvvetli sinerjistik etki gösterir (79, 69).

2.2.7. İnterferon- γ (IFN- γ)

İnterferonlar α , β ve γ olmak üzere üç çeşittir. INF- α lökositlerden, INF- β fibroblastlardan ve IFN- γ T lenfositlerden salınır. INF- γ 21-24 kDa moleküler ağırlığında bir glikoproteindir. Diğer iki interferona göre immünmodülatöretkisi daha fazla, antiviral etkisi ise daha az olan IFN- γ , hem CD4⁺ yardımcı T hücreleri hem de tüm CD8⁺ T hücreleri tarafından üretilmektedirler. B hücreleri ve NK hücreleri tarafından da üretilir (71, 78). Etkileri şunlardır:

- Th1 hücrelerine diferansiyasyonu artırır,
- Th1 ve NK hücrelerinin aktivitelerini şiddetlendirir, Th2 hücrelerini inhibe eder,
- T ve B lenfositlerinin direkt etki ile farklılaşmalarına yardımcı olur,
- Mononükleer fagositlerin güçlü bir aktivatörüdür,
- MHC sınıf I ve II molekül ekspresyonunu artırır,

- IL-4'ün bazı etkilerini antagonize eder,
- Damar endotel hücrelerinin aktivatörüdür,
- Antiviral etkinlik gösterir,
- Lipoprotein lipaz aktivasyonu ile kaşeksiye neden olur (4, 72).

2.2.8. Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α)

Tümör Nekrozis Faktör- α , nonglikolize bir transmembran proteini olup, molekül ağırlığı 17 kDa'dur. Kaşektin olarak da isimlendirilmektedir. T ve B lenfositler, monositler, makrofajlar, NK hücreleri, dendritik hücreler ve mast hücreleri tarafından salgılanır. TNF- α , IL-1 ile birlikte enflamasyonun temel mediyatörüdür. Etkileri şu şekilde olmaktadır:

- Nötrofillerin infiltrasyonunu sağlar,
- T ve B lenfositlerinin proliferasyonuna neden olur,
- Endotel hücrelerini ve makrofajları aktive eder,
- Fibroblast ve mezanşimal hücrelerde proliferasyon yapar,
- Adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır,
- IL-1, IL-6, IL-8 sentezini indükler,
- Anjogenezi sağlar,
- Sinoviyal hücre aktivasyonu yapar,
- Hepatositleri aktive ederek akut faz proteinlerinin sentezini sağlar,
- Hipotalamus aktivasyonu ile glukokortikoid salınımına neden olur,
- Tümör hücrelerine sitotoksik etki göstererek nekroz yapar,
- Osteoklastları aktive eder,
- Apoptozu indükler,
- Kaşeksiye neden olur,
- IL-1 ile birlikte ateş cevabı oluşturur.

TNF, sepsis ve endotoksik şokun önemli bir mediyatörüdür. Gram negatif bakteriyel sepsis durumlarında çok yüksek miktarlarda TNF üretimi olur. Bunun sonucunda dolaşım kollapsı ile dissemine intravasküler koagülasyon (DIC) meydana gelir (69, 70).

2.2.9. Tümör Gelişim Faktörü $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)

T ve B lenfositler, makrofajlar ve mast hücreleritarafından salınan 25 kDa molekül ağırlığında bir sitokindir. Etkileri şunlardır:

- Genellikle immünitinin negatif regülasyonunu sağlar,
- Birçok hücre (T, B ve NK hücreleri, epitelyal hücreler) için antiproliferatif etki gösterir,
- Lenfokin ve immunoglobulin yapılmasını inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterir,
- Nötrofiller ve monositler için ise kemotaksisi artırarak proinflamatuvar etki eder,
- B hücrelerini immünoglobulin A yapımına sevk eder,
- Bellek hücrelerinin oluşumunu sağlar,
- Fibroblastların çoğalmasını sağlayarak yara iyileşmesini hızlandırır,
- Uzun süreli etkide fibrozis gelişimine neden olur (4, 69, 70, 72).

2.3. Polimorfizm

İnsan genom dizilim çalışmaları her insan genomunda DNA dizilerinin %99.9 oranında benzer olduğunu kanıtlamıştır (80). Geriye kalan %0.1’lik fark, bireysel genotipik ve fenotipik değişikliklerin sorumlusudur. Bir insanın anne ve babasından gelen homolog iki kromozomu karşılaştırıldığında yaklaşık her 1000 bp’de bir farklılık gözlenmektedir. Protein kodlayan bölgelerde ise bu oran 2500 bp’de bir olmaktadır. Teknükleotit değişimlerini (varyasyonları, polimorfizmleri) içeren genler, toplumda %1’den daha fazla sıklıkta bulunan allel genler olarak tanımlanmaktadır (81). Bununla birlikte toplumda %1’den daha az görülen farklılıklar“nadir varyant” olarak isimlendirilmektedir (82).

Polimorfizmlerin protein sentezi üzerine etkisi farklılık göstermektedir. Bazı polimorfizmlerin protein sentezi üzerine hiçbir etkisi yoktur, fark edilmeleri ancak DNA dizi analizleri ile mümkündür. Protein kodlayan bölgelerde bulunan polimorfizmler ise aminoasit değişikliğine neden olurlar. Gen ekspresyonunu değiştiren,transkripsiyon düzenleyecisi promotor bölgelerde bulunan polimorfizmler genin ifade edilme düzeyini, birbaşka deyişle ürün oluşumu ve miktarını etkileyerek protein sentezine etki eder. Bu duruma örnek olarak; IL-10 genine ait promotor bölgede -1082, -819 ve -592

pozisyonlarında yer alan polimorfik bölgelerde sırasıyla G, C, C allellerinin varlığı A, T, A allellerinin bulunmasına göre IL-10 üretimini artırdığı bilinmektedir (83).

En yaygın görülen polimorfizm şekli olan SNP'lerde (*Single Nucleotide Polymorphism*) genellikle bir nükleotit başka bir nükleotit ile yer değişikliği yapar. Tek bazlık delesyon ve insersiyonlar da bu grubun içinde bulunur. Yaklaşık olarak her 1000 nükleotitte bir SNP'lerbulunmaktadır. İki insan genomu karşılaştırıldığında aralarında yaklaşık 3 milyon adet tek nükleotit farklılığı mevcuttur. Tüm popülasyon değerlendirildiğinde U.S. National Library of Medicine'de yaklaşık 25 milyon civarındakayıtlı SNP bulunmaktadır (84). Toplumdaki minör allel frekansı %5'ten daha sık olan SNP'ler, yaygın SNP'ler olarak adlandırılır. Bir SNP'nin yaygın olması sağlık üzerine etkisinin olmadığı anlamına gelmez. SNP'ler doğrudan hastalık yapmaktan ziyade hastalığa eğilimi artırabilir veya azaltabilir. SNP'ler ayrıca hastalığın prognozu, tedavi başarısı, ilaç direnci veya viral bir enfeksiyona karşı direnç gibi klinik durumları da etkileyebilmektedir (82).

SNP'ler dışında farklı polimorfizm tipleri de mevcuttur. Genom içerisinde yer alan kısa dizi tekrarlarının farklı sayıda olması ile karakterize VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) polimorfizmleri vardır. Aynı zamanda STR (*short tandem repeats*) polimorfizmleri olarak da adlandırılır. Bu tekrarlar15-500 nükleotit uzunluğunda ise minisatellit DNA polimorfizmi, 2-15 nükleotit arasındaki uzunlukta ise mikrosatellit DNA polimorfizmi olarak tanımlanır. STR'ler adli tıpta ve bağlantı analizinde önemlidirler. Uzunluğu 1 kb veya daha büyük olan bir DNA segmentinin kopya sayısının farklılığından kaynaklanan polimorfizmler ise kopya sayısı varyantı (*Copy Number Variant-CNV*) polimorfizmleri olarak adlandırılırlar (85).

3. MATERYAL METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışmaya 6 aydan daha uzun süre HBsAg pozitifliği bulunan, HBV DNA miktarı 2000 IU/ml'nin üzerindeki, kalıcı veya aralıklı ALT/AST yüksekliği bulunan karaciğer biyopsisinde belirgin inflamatuvar aktivite gösteren, Anti-HBs negatif olan kronik aktif hepatitli 33 hasta ile Anti-HBsve Anti-HBc IgG'si pozitifbulunan daha önceden HBV aşısı uygulanmamışolan doğal bağışıklık gelişen 34 kişi dahil edildi. Pediatrik yaş grubundaki hastalar, karaciğer karsinomu ya da başka bir malignitesi olanlar, HCV gibi ek viral hastalığı bulunanlar araştırmaya dahil edilmedi.

3.1.2. Kullanılan Gereçler

Santrifüj, manyetik karıştırıcı, hassas terazi, pH ölçer, -20 ve -80°C'lik derin dondurucular, buzdolabı, vorteks, çalkalayıcı, çeşitli tüpler, enjektörler, 10 ml'lik EDTA'lı tüpler, otomatik pipetler, otomatik pipet uçları, pastör pipetleri, elektroforez tankı, güç kaynağı, UV transilluminatör, spor, pastör fırını, ependorf tüpler, thermal cycler, NanoDrop spektrofotometre (Thermo Scientific, USA), deiyonize su sağlayıcı, buz makinesi, mikrodalga fırın, distile su cihazı.

3.1.2.1. Kullanılan Solüsyonlar

1. Mononükleer hücre ayırım solüsyonları

1. Fikol

2. Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)

1X çalışma solüsyonu

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 4,3 mM Na₂HO₄
- 1,47 mM KH₂PO₄

2. Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları

1 TBE elektroforez tamponu (Tris-borik asit-EDTA)(pH8.0)

10X stok solüsyonu (1L)

- 108 g Tris base
- 55 g Borik asit
- 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)

0,5X çalışma solüsyonu (1L)

- 44,5 mM Tris base
- 44,5 mM Borik asit
- 1 mM EDTA

1. Etidium bromide solüsyonu (10mg/ml)

2. Yükleme tamponu

- %0.2 Bromphenol blue
- Xylene cyanole
- %30 Gliserol

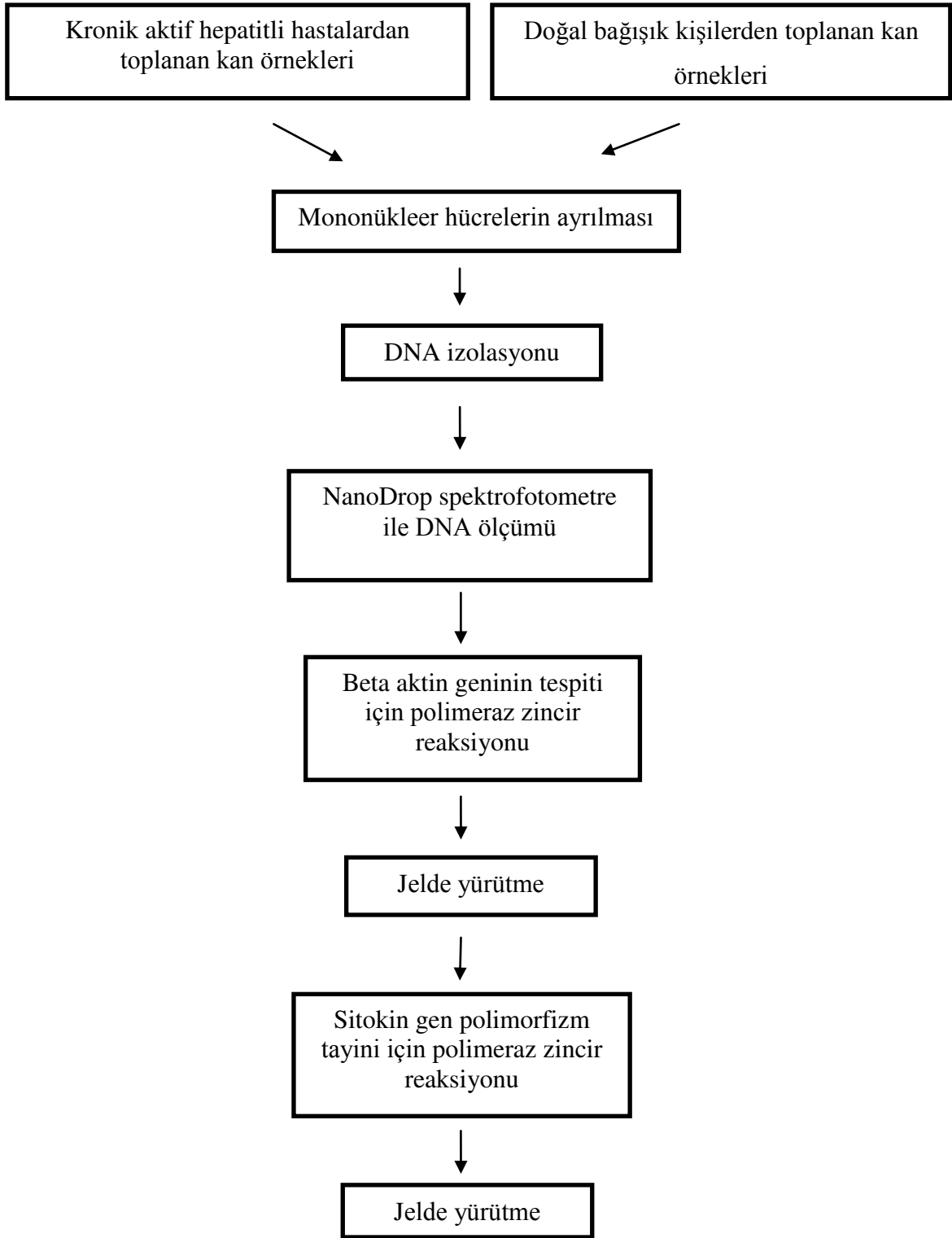
3.1.2.2. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler, kitler ve sarf malzemeleri çeşitlifirmalardan temin edildi. Trisma-base, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ethidium bromide (Sigma), fikol (Biochrom), borik asit, bromphenol blue (Fisher), HCl, NaCl, KCl, Na₂HO₄, KH₂PO₄, tris base, glycerol, Xylene cyanole(Merck), agaroz (Seakem LE),taq DNA polimerase (Thermo), deoksinükleotit primerleri (dNTP's) (Thermo), Cytokine Genotyping Kit (Invitrogen, USA).

3.2. Metod

3.2.1. Çalışma Planı

Bu çalışma KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Mart 2012-Şubat 2013 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Bu süre içerisinde hepatit B virusu ile enfekte olduktan sonra iyileşen 34 doğal bağışık kişiden ve akut enfeksiyon sonrasında kronik aktif hepatit gelişen 33 hastadan EDTA'lı tüplere 9 cc kan örnekleri alındı. Toplanan örneklerden ilk olarak mononükleer hücre ayrımı yapıldı. Ayrılan bu hücreler DNA izolasyonu yapılana kadar -20°C'de saklandı. Daha sonra elde edilen mononükleer hücrelerden DNA izolasyonu yapıldı. Tüm örneklerden PZR yöntemi ile beta aktin geni tespiti yapılarak DNA mevcudiyeti gösterildi. Sitokin gen polimorfizm çalışmasında kullanılmak üzere gerekli olan DNA yoğunluklarının belirlenebilmesi için nanodrop spektrofotometre ile ölçüldü. Uygun sulandırılmaları yapılarak DNA yoğunlukları 75-125 ng/µl olacak şekilde hazırlandı. Yine PZR yöntemi kullanılarak sitokin gen polimorfizmleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar istatistik programında değerlendirilerek yorumlandı. Çalışma planı ve işlemin yürütülme şeması Şekil 8'de gösterildi.



Şekil 8. Çalışma Planı ve İşlemlerin Yürütülme Şeması

3.2.2. Mononükleer Hücrelerin Ayrılması

Işıktan korunarak saklanan ve çalışma öncesinde oda sıcaklığına getirilen fikor solüsyonundan 15 ml'lik falkon tüpe 3 ml koyuldu. Hastadan alınan 9ml kanın 6ml'sifikor içeren tüpün kenarından yavaşça sızdırılarak ilave edildi. 2600 rpm'de 25 dakika santrifüj edildikten sonra plazma ile fikor arasında kalan buğulu kısım, başka bir falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine PBS solüsyonu eklenerek 12 ml'ye tamamlandı. 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısımdaki sıvı döküldü. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra tüpün dibine çöken mononükleer hücrelerin üzerine 0,5 ml PBS solüsyonundan eklenerek pastör pipetiyle karıştırıldı ve ependorf tüpe aktararak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı. Bu işlem her bir hasta örneği için tekrarlandı.

3.2.3. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için BioRobot EZ1 (Qiagen,Hilden, Almanya) cihazı ve EZ1 DNA Blood KİT (Qiagen, Almanya) kullanıldı.

3.2.4. DNA'nın Spektrofotometrede Konsantrasyonunun Ölçümü

Elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları, NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, USA) spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçüldü. DNA konsantrasyonları, İnvitrogen sitokin gen polimorfizm kitinin üretici firmasının önerisine göre 75-125 ng/μl olacak şekilde steril deiyonize su ile sulandırılarak hazırlandı.

3.2.5. İzole Edilen DNA'da Beta Aktin Geninin Tespiti

Beta aktin hücrenin hareketini ve yapısını korumakla görevli olan ve her hücrede bulunan “*housekeeping*” bir proteindir. Testlerde internal kontrol olarak kullanılır. *Housekeeping* genlerin sentezi, tüm nükleuslu hücre tiplerinde vardır ve bu genler hücrenin hayatta kalması için gereklidir. İzole edilen DNA'larda beta aktin geninin varlığı PZR ile araştırılarak elde edilen örneklerde yeterli miktarda DNA olup olmadığı saptandı. Bunun

için beta aktin genine spesifik (ATCATGTTTGAGACCTTCAA ve CATCTCTTGCTCGAAGTCCA, 320 bp) primerler kullanıldı (85).

Her bir DNA örneği için Tablo 3'te belirtilen miktarlarda reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra hafifçe vortekslenerek küçük ependorflara 40'ar µl bölündü. Hazırlanan reaksiyon karışımının üzerine 10µl DNA eklenerek Tablo 4'te belirtilen PZR döngü programında amplifiye edildi. Agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi için 0,5X TBE tamponu ile %2'lik agaroz jel hazırlandı. Örnekler hazırlanan agaroz jele yüklenerek 85V'da 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Sonuçlar UV transilluminatörde değerlendirildi.

Tablo 3. Beta Aktin Gen Analizinde Bir Hasta İçin Gerekli Olan Reaksiyon Karışımının İçeriği ve Miktarları

Buffer	5 µl
dNTP mix(10mM)	2 µl
MgCl (25 mM)	3 µl
Primer mix (10pM)	5 µl
Taq polimeraz	0.25 µl
Ddw	24.75 µl
Template	10 µl

Tablo 4. Beta aktin geni için PZR döngü programı

	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	94°C	5 dakika	1
Denatürasyon	95°C	1 dakika	
Annealing (Bağlanma)	60°C	1 dakika	20
Ekstansiyon (Uzama)	72°C	1.5 dakika	
Ekstansiyon (Uzama)	72°C	7 dakika	1
Bekletme	+4 °C	Süresiz	

3.2.6. Sitokin Gen Polimorfizminin Tespiti İçin PZR Yapılması

Sitokin gen polimorfizminin tespiti için Invitrogen(USA) firmasından temin edilen PZR-SSP (*single strand polymorphism*) sitokin gen paneli 13 farklı sitokin çeşidinin tespitinde kullanıldı. Invitrogen sitokin gen paneli 2 ayrı bileşenden (1. oligonükleotid primerleri emdirilmiş 96'lı pleytler, 2. buffer) oluşmaktadır. Her bir hastanın PZR amplifikasyonu için 522,3 µl toplam hacimli master miks ve DNA karışımı (Buffer 140µl,

genomik DNA 50µl, deiyonize su 329µl, Taq Polimeraz (5U/µl) 3,3µl) hazırlandı (Tablo 5). Hazırlanan reaksiyon karışımı hafifçe vorteksenerek her bir hasta için pleytlerdeki 48 kuyucuğa 10'ar µl bölündü. Tablo 6'te verilen PZR döngü programına göre amplifiye edildi. Amplifiye edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezde yürütmek için 0,5X TBE tamponlu %2'lik agaroz jel hazırlandı. Örnekler, her bir hasta için 24'lük 2 ayrı jele yüklendi ve 0,5X TBE'li tampon ortamında 85V, 35 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Sonuçlar UV transilluminatörde değerlendirildi. Her bir kuyucukta bulunan pozitif kontrollerin çalışıp çalışmadığı kontrol edilerek çift bant gösteren kuyucuklar pozitif olarak kabul edildi. Sonuçlar Tablo 7'deki Invitrogen sitokin gen polimorfizm analiz cetveline işaretlenerek değişimler saptandı.

Tablo 5. Sitokin Genleri Analizinde Bir Hasta İçin Gerekli Olan Reaksiyon Karışımının İçeriği ve Miktarları

PZR Buffer	140µl
Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	3.3µl
ddw*	329µl
DNA (75-125 ng/ µl)	5µl

*double distilled water

Tablo 6. Sitokin Genleri İçin PZRDöngü Programı

	Sıcaklık	Süre	
Başlangıç denatürasyonu	94°C	2 dakika	
Denatürasyon	94°C	15 saniye	10 siklus
Annealing (Bağlanma)	65 °C	1 dakika	
Denatürasyon	94°C	15 saniye	20 siklus
Annealing (Bağlanma)	61	50 saniye	
Extansiyon (Uzama)	72°C	30 saniye	
Bekletme	4°C	Süresiz	

3.2.7.İstatistiksel Analizler

Sonuçlar Invitrogen sitokin gen polimorfizm analiz cetveline işaretlenerek değişimler saptandıktan sonra istatistiksel analizleri Epi Info Version 6 programı kullanılarak yapıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılması için χ^2 testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Genotiplerin değerlendirmesinde Pearson chi-square test ve

uygun olan yerlerde Fisher'skesin (exact) testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 7. Protrans Sitokin Gen Polimorfizmi Analiz Cetveli

1. Pleyt	2. Pleyt	Sitokin Geni	Allelik Özellik	Baz Uzunluğu	İnternal Kontrol
1	49	IL-1 α	T at pos -889	220	440
2	50	IL-1 α	C at pos -889	220	440
3	51	IL-1 β	C at pos -511	215	440
4	52	IL-1 β	Tat pos -511	215	440
5	53	IL-1 β	T at pos +3962	336	440
6	54	IL-1 β	C at pos +3962	336	440
7	55	IL-1R	C at pos pst1 1970	288	440
8	56	IL-1R	T at pos pst1 1970	288	440
9	57	IL-1RA	T at pos mspa111100	297	440
10	58	IL-1RA	C at pos mspa111100	297	440
11	59	IL-4R α	G at pos +1902	143	440
12	60	IL-4R α	A at pos +1902	143	440
13	61	IL-12	C at pos -1188	802	440
14	62	IL-12	A at pos -1188	802	440
15	63	IFN- γ	A at pos +874	277	440
16	64	IFN- γ	T at pos +874	277	440
17	65	TGF- β 1	C at Codon 10; G at Codon 25	80	440
18	66	TGF- β 1	C at Codon 10; C at Codon 25	80	440
19	67	TGF- β 1	T at Codon 10; G at Codon 25	80	440
20	68	TGF- β 1	T at Codon 10; C at Codon 25	80	440
21	69	TGF- β 1	C at Codon 10	195	440
22	70	TGF- β 1	T at Codon 10	195	440
23	71	TNF- α	G at pos -308; G at pos -238	110	440
24	72	TNF- α	A at pos -308; G at pos -238	110	440
25	73	TNF- α	G at pos -308; A at pos -238	110	440
26	74	TNF- α	A at pos -308; A at pos -238	110	440
27	75	IL-2	T at pos -330; G at pos +166	562	89
28	76	IL-2	G at pos -330; G at pos +166	564	89
29	77	IL-2	G at pos -330; T at pos +166	569	89
30	78	IL-2	T at pos -330; T at pos +166	569	89
31	79	IL-4	T at pos -1098; T at pos -590	557	89
32	80	IL-4	T at pos -1098; C at pos -590	557	89
33	81	IL-4	G at pos -1098; T at pos -590	557	89
34	82	IL-4	G at pos -1098; C at pos -590	557	89
35	83	IL-4	T at pos -590; T at pos -33	610	89
36	84	IL-4	T at pos -590; C at pos -33	610	89
37	85	IL-4	C at pos -590; T at pos -33	610	89
38	86	IL-4	C at pos -590; C at pos -33	610	89
39	87	IL-6	G at pos -174; G at pos nt565	427	89

Tablo 7'nin devamı

1. Pleyt	2. Pleyt	Sitokin Geni	Allelik Özellik	Baz Uzunluğu	İnternal Kontrol
40	88	IL-6	C at pos -174; G at pos nt565	426	89
41	89	IL-6	G at pos -174; A at pos nt565	428	89
42	90	IL-6	C at pos -174; A at pos nt565	428	89
43	91	IL-10	G at pos -1082; C at pos -819	305	89
44	92	IL-10	G at pos -1082; C at pos -592	530	89
45	93	IL-10	A at pos -1082; C at pos -819	305	89
46	94	IL-10	A at pos -1082; T at pos -819	305	89
47	95	IL-10	A at pos -1082; C at pos -592	530	89
48	96	IL-10	A at pos -1082; A at pos -592	530	89

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 33 kronik aktif hepatitli hastanın 17'si kadın, 17'si erkek; 34 doğal bağışık olgunun 14'ü kadın, 19'u erkekti. Grupların cinsiyetlere göre dağılım yüzdeleri Tablo 8'de gösterildi. Çalışmaya alınan kişilerin yaşları 18-83 arasında değişmekte olup yaş ortalaması $42,85 \pm 12,28$ olarak bulunmuştur. Her iki çalışma grubunun cinsiyetlere göre yaş ortalaması incelendiğinde kadın doğal bağışık grubun yaş ortalaması 39,05 olarak saptanırken erkeklerin yaş ortalaması 43,47 olarak tespit edildi. Kronik aktif hepatitli grubun cinsiyetlere göre yaş ortalaması incelendiğinde ise kadınların yaş ortalaması 37,28 bulunurken erkeklerin yaş ortalaması 49,78 olarak bulundu (Tablo 9). Kronik aktif hepatitli grupta cinsiyetlere göre yaş ortalamalarının dağılımı incelendiğinde erkeklerin yaş ortalamasının kadınlara göre daha yüksek olduğu görüldü ($p= 0.021$). Doğal bağışık grupta cinsiyetlere göre yaş ortalamalarının dağılımında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p= 0.089$).

Tablo 8. Kronik Aktif Hepatitli ve Doğal Bağışık Grubun Cinsiyetlere Göre Dağılım Yüzdesi

	Kadın	Erkek	Toplam
Kronik aktif hepatit	14 (%42)	19 (%58)	33
Doğal bağışık	17 (%50)	17 (%50)	34

Tablo 9. Kronik Aktif Hepatitli ve Doğal Bağışık Grubun Cinsiyete Göre Yaş Ortalaması

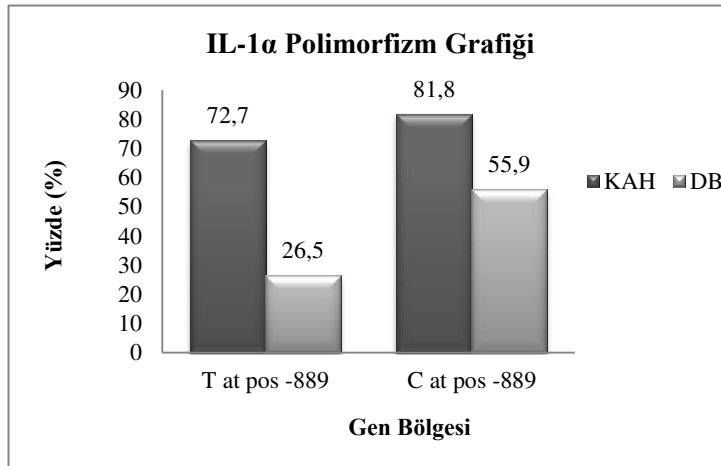
	Kadın	Erkek
Kronik aktif hepatit	$37,28 \pm 13.74$	$49,78 \pm 15.24$
Doğal bağışık	$39,05 \pm 6.20$	$43,47 \pm 8.29$

Doğal Bağışık Grup ile Kronik Aktif Hepatit B Hastalarında Sitokin Gen Polimorfizmleri ile İlgili Bulgular

Anti-HBs ve anti-HBc pozitif doğal bağışık grup ile kronik aktif hepatit B hastalarının sitokin gen polimorfizmleri karşılaştırıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

IL-1 α 'nın -889 gen bölgesinde bulunan T alleli kronik aktif hepatitli hastaların %72.7'sinde pozitif olarak saptanırken doğal bağışık kişilerin %26.5'inde pozitif olarak tespit edildi.

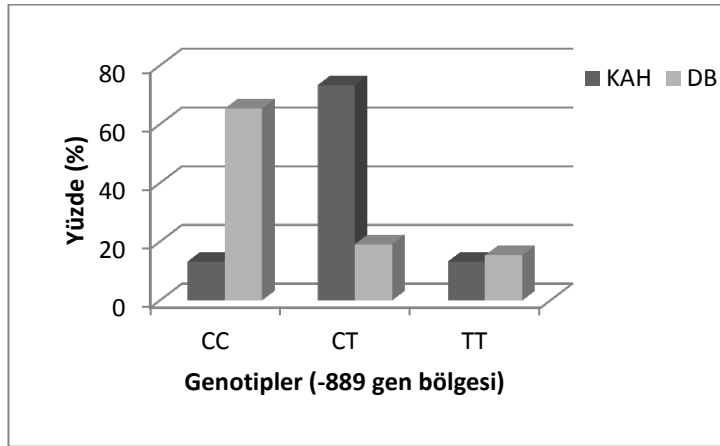
IL-1 α 'nın -889 gen bölgesinde bulunan C alleli kronik aktif hepatitli hastaların %81.8'inde, doğal bağışık kişilerin %55,9'unda pozitif olarak bulundu (Şekil 9). Sonuç olarak T allelinde [$p < 0.001$ ($p = 0.0003973$)], C allelinde $p = 0.042$ değerleri elde edilerek istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu.



Şekil 9. IL-1 α Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

Genotipik olarak değerlendirdiğimizde kronik aktif hepatitli grupta CT genotipinin %73.4, doğal bağışık grupta %19.2 oranında pozitif olduğu görüldü. İstatistiksel olarak değerlendirdiğimizde gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edildi [$p < 0.001$ ($p = 0.000044$)]. Diğer bir genotip olan CC genotipini incelediğimizde kronik aktif hepatitli grupta %13.3 oranında pozitiflik bulunurken doğal bağışık grupta %65.4 oranında pozitiflik saptandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi [$p < 0.001$ ($p = 0.0003579$)]. TT genotipi değerlendirdiğimizde Tablo 11'de gösterilen pozitiflik

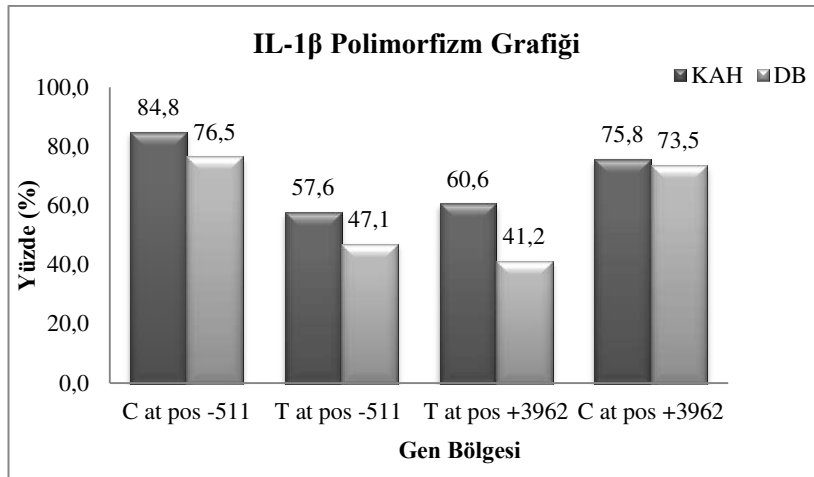
oranları elde edildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görüldü ($p=0.28$) (Şekil 10).



Şekil 10. IL-1 α Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasında Genotiplere Göre Pozitiflik Oranlarının Dağılımı

IL-1 β 'nin -511 promotor gen bölgesinde bulunan C alleli kronik aktif hepatitli grupta %84.8 oranında pozitif olarak saptanırken doğal bağışık grupta %76.5 oranında pozitif saptandı. **IL-1 β** 'nin -511 gen bölgesinde bulunan T allelinde ise kronik aktif hepatitli grupta %57.6 oranında pozitiflik bulunurken doğal bağışık grupta %47.1 oranında pozitiflik saptandı. Her iki polimorfik bölge için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi (sırası ile $p=0.576$, $p=0.537$) (Şekil 11).

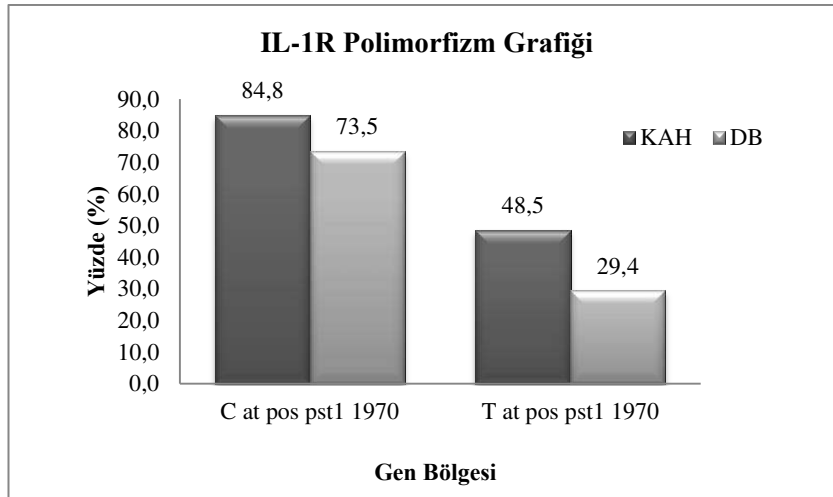
IL-1 β 'nin +3962 pozisyonunda bulunan T ve C allel polimorfizmlerinde Şekil 11'de gösterilen pozitiflik oranları elde edilerek sırası ile $p=0.178$, $p=0.943$ değerleri tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi.



Şekil 11. IL-1β Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

Genotipik olarak değerlendirildiğinde -511 ve +3962 gen bölgesindeki CC, CT ve TT genotipleri incelendi ve Tablo 11’de belirtilen pozitiflik oranları ile p değerleri elde edilerek gruplar arasında anlamlı farklılıklar olmadığı görüldü.

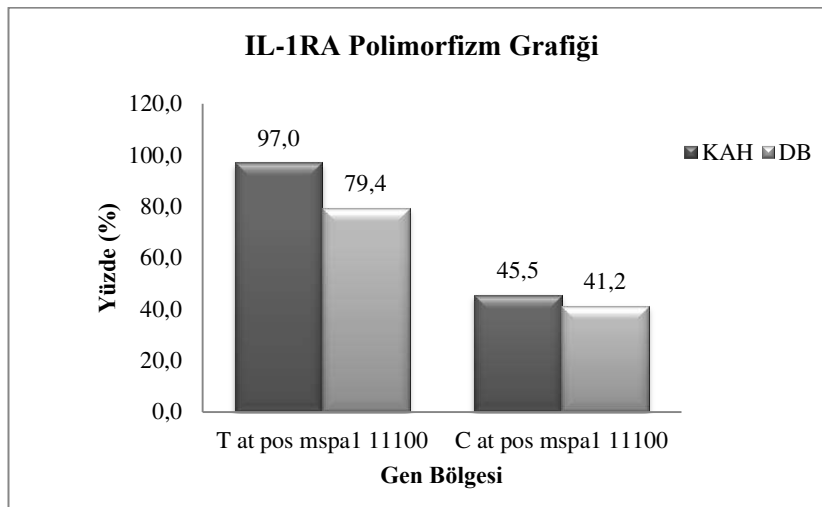
IL-1R’nin pst1 1970 gen bölgesindeki C ve T allel polimorfizmlerinde Şekil 12’de gösterilen pozitiflik oranları tespit edildi. Sırası ile $p= 0.401$ ve $p= 0.176$ değerleri saptanarak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.



Şekil 12. IL-1R Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

Genotipik olarak değerlendirildiğinde ise CC, CT, TT genotiplerinin pozitiflik oranları ve p değerleri Tablo 11’de gösterildiği şekildedir ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi.

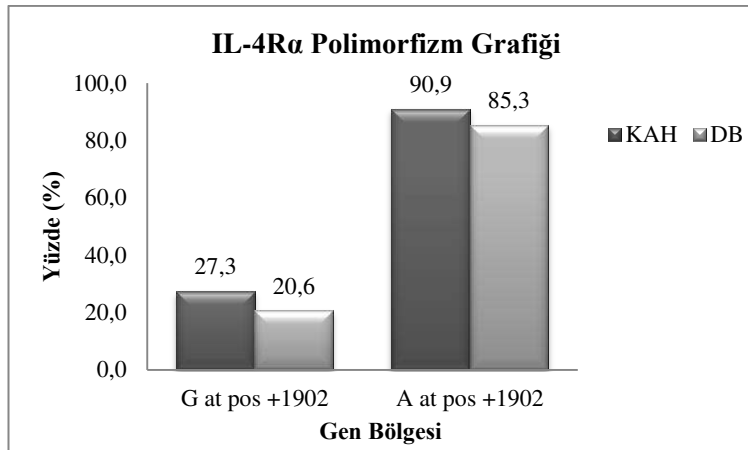
IL-1RA’nın mspa1 11100 gen bölgesinde bulunan T veC allel polimorfizmlerinde tespit edilen pozitiflik oranları Şekil 13’te gösterildiği gibidir. Her iki polimorfik bölge için sırası ile $p= 0.054$ ve $p= 0.914$ değerleri elde edilerek gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 13. IL-1RASitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

Genotipik olarak değerlendirildiğinde CC, CT, TT genotiplerinin pozitiflik oranları ve p değerleri Tablo 11’de gösterildi. İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi.

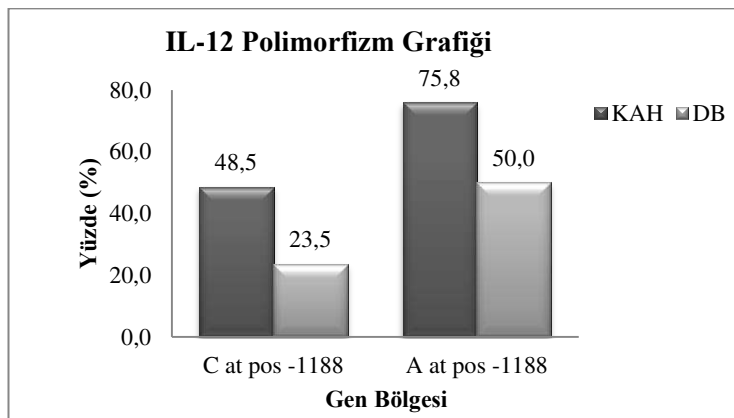
IL-4Ra’nın +1902 gen bölgesinde bulunan G ve A allel polimorfizmleri değerlendirildiğinde Şekil 14’te belirtilen pozitiflik oranları elde edildi ve sırası ile $p= 0.219$ ve $p= 0.709$ değerleri saptanarak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 14. IL-4Ra Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

Genotipik olarak değerlendirildiğinde AA, GA, GG genotiplerinin pozitiflik oranları ve p değerleri Tablo 11’de gösterildi. İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi.

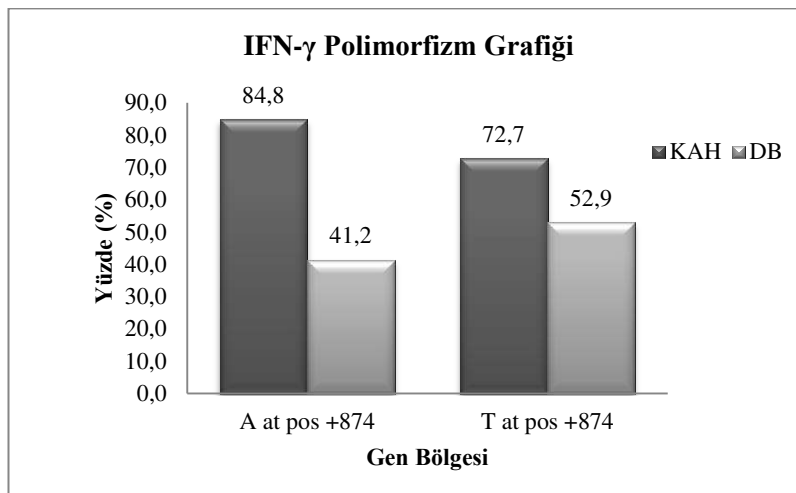
IL-12’nin 1188 promotor gen bölgesinde bulunan C ve A allel polimorfizmlerinin kronik aktif hepatitli ve doğal bağışık gruplardaki pozitiflik oranları Şekil 15’te gösterilmiştir. İncelemelerimizin sonucunda $p= 0.060$ ve $p= 0.054$ değerleri elde edilerek gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 15. IL-12 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

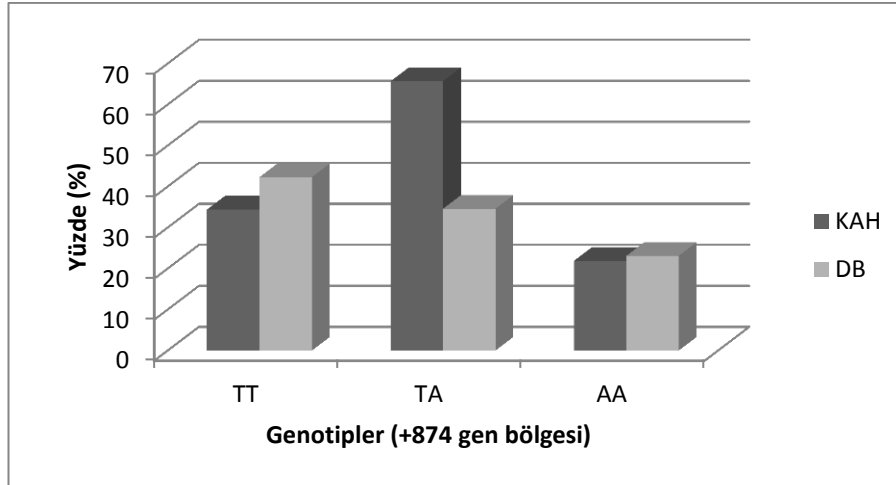
Genotipik olarak değerlendirildiğinde AA, AC, CG genotiplerinin pozitiflik oranları ve p değerleri Tablo 11’de gösterildi. İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi.

IFN- γ 'nın +874 gen bölgesindeki A allelini doğal bağışık grubun %41.2'sinde pozitif olarak bulunurken kronik aktif hepatitli hastaların %84.8'inde pozitif olarak saptandı. T alleli ise doğal bağışık kişilerin %52.9'unda, kronik aktif hepatitli hastaların %72.7'sinde pozitif olarak bulundu (Şekil 16). A allelinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken [$p < 0.001$ ($p = 0.0005761$)] T allelinde anlamlı bir fark bulunamadı ($p = 0.155$).



Şekil 16. IFN- γ Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

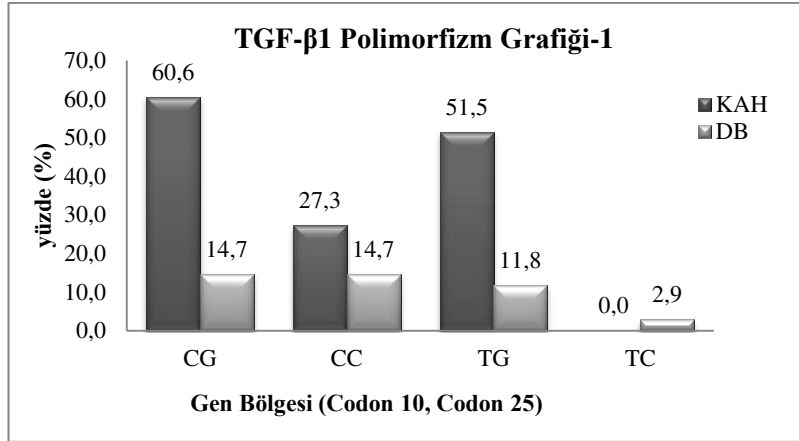
Genotipik olarak değerlendirildiğinde +874 gen bölgesinde TT, TA, AA genotiplerinin pozitiflik oranları Şekil 17'de belirtildiği gibidir. TA genotipi kronik aktif hepatitli grupta %65.7 oranında görülürken doğal bağışık grupta %34.6 oranında tespit edildi. Bu gen bölgesinde TA genotipinde istatistiksel olarak kronik aktif hepatitli grup lehine anlamlı bir artış gösterdiği görüldü ($p = 0.018$). Diğer genotiplerde ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo 11).



Şekil 17. IFN- γ Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasında Genotiplere Göre Pozitiflik Oranlarının Dağılımı

TGF- β 1 (C at Codon 10; G at Codon 25) polimorfizmi doğal bağışık grupta %14.7 pozitif olarak saptanırken kronik aktif hepatitli hasta grubunda %60.6 pozitiflik bulundu. **TGF- β 1**, (T at Codon 10; G at Codon 25) polimorfizmi ise doğal bağışık grubun %11,8'inde pozitif olarak saptandı (Şekil 18). Kronik aktif hepatitli hasta grubunda ise %51.5 oranında pozitif bulundu. TGF- β 1 (C at Codon 10; G at Codon 25) polimorfizmlerinde [$p < 0.001$ ($p = 0.0002822$)] ve (T at Codon 10; G at Codon 25) polimorfizmlerinde $p = 0.001$ değerleri saptanarak istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu. Ancak genotipik olarak değerlendirdiğimizde Codon 10 bölgesindeki CC, GC, GG genotiplerinde gruplar arasında anlamlı fark olmadığı görüldü (sırası ile $p = 0.344$, $p = 0.190$, $p = 0.107$) (Tablo 11).

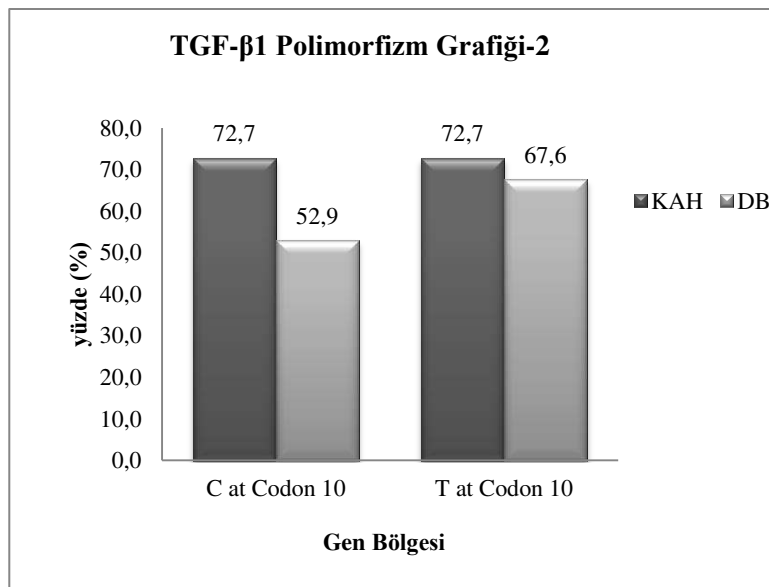
TGF- β 1 (C at Codon 10; C at Codon 25) polimorfizmlerinde doğal bağışık grupta %14.7 pozitif olarak saptanırken kronik aktif hepatitli hasta grubunda %27.3 pozitiflik tespit edildi ($p = 0.334$). **TGF- β 1** (T at Codon 10; C at Codon 25) polimorfizmlerinde doğal bağışık grupta %2.9 pozitif olarak saptanırken kronik aktif hepatitli hasta grubunda pozitiflik tespit edilmedi ($p = 1.000$), (Şekil 18). Sonuç olarak her iki haplotipte istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmadı. Genotipik olarak Codon 25 gen bölgesindeki TT, CT, CC genotipleri incelendiğinde ise gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi (sırası ile $p = 0.974$, $p = 0.809$, $p = 0.260$) (Tablo 11).



Şekil 18.TGF-β1Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

TGF-β1 C at Codon 10 polimorfizminin değerlendirilmesi ile doğal bağışık grupta %52.9 oranında pozitif olarak saptanırken kronik aktif hepatitli hasta grubunda %72.7 oranında pozitiflik tespit edildi (Şekil 19). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.155$).

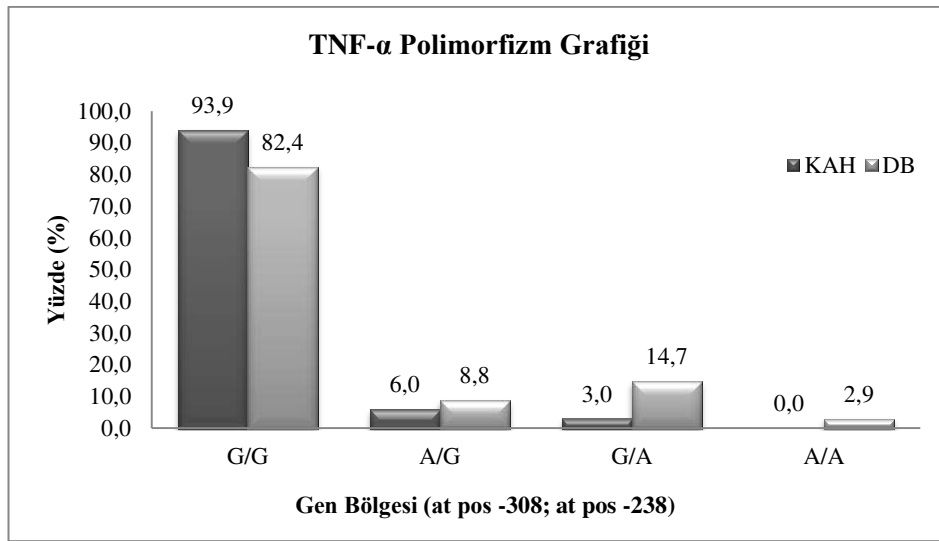
TGF-β1 T at Codon 10 polimorfizminin tek başına değerlendirilmesi ile doğal bağışık grupta %67.6 oranında pozitif olarak saptanırken kronik aktif hepatitli hasta grubunda %72.7 oranında pozitiflik tespit edildi (Şekil 19). Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.155$).



Şekil 19.TGF-β1Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

TNF- α (G at pos-30; G at pos -238) polimorfizmlerinde kronik aktif hepatitli grupta %93.9 ve doğal bağışık grupta %82.4 oranında olmak üzere her iki grupta da yüksek pozitif değerler elde edildi. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ($p= 0.258$), (Şekil 20).

TNF- α (A at pos-308; G at pos -238), **TNF- α** (G at pos-308; A at pos -238) ve **TNF- α** (A at pos-308; A at pos -238) haplotiplerinde Şekil 20’de gösterilen düşük pozitiflik oranları elde edildi. Sırası ile $p= 1.000$, $p= 0.197$, $p= 1.000$ değerleri elde edilerek gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmedi.



Şekil 20. TNF- α Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

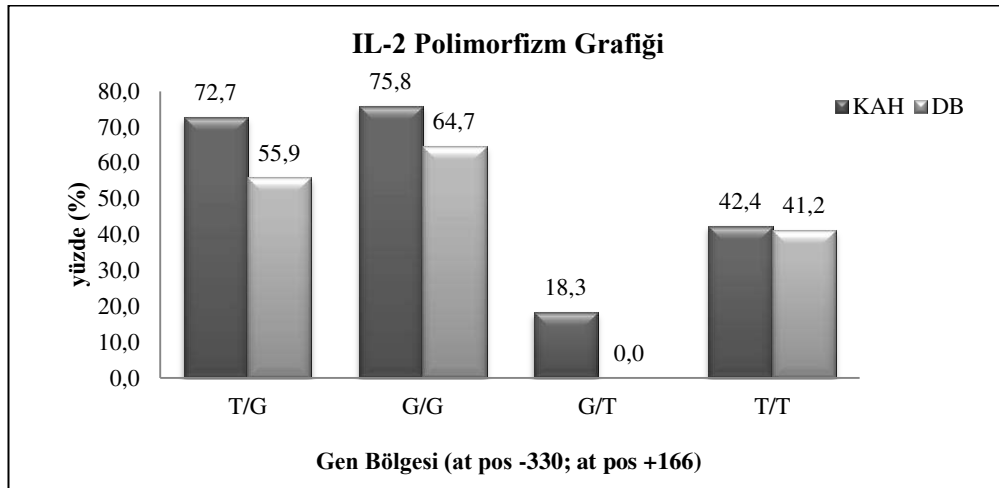
Genotipik olarak değerlendirildiğinde -308 gen bölgesinde kronik aktif hepatitli grupta %93.7, doğal bağışık grupta %80.0 oranında GG genotipi tespit edildi. Ancak gruplar arasında anlamlı fark görülmedi ($p= 0.087$). kronik aktif hepatitli grupta AA genotipi %6.3 oranında görülürken doğal bağışık grupta %20.0 oranında tespit edildi. Her iki grup arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p= 0.087$). AA genotipine ise her iki grupta da hiç rastlanmadı.

TNF- α 'nın -238 gen bölgesindeki GG genotipine kronik aktif hepatitli grupta %90.4, doğal bağışık grupta ise %80.0 oranında rastlanırken gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi ($p= 0.153$). GA ve AA genotipleri ise Tablo 11’de gösterilen oranlarda tespit edildi ve istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (sırası ile $p= 0.317$, $p= 0.241$).

IL-2'nin (G at pos -330; T at pos +166)polimorfizmleri kronik aktif hepatitli hastaların %18.3'ünde pozitif olarak bulunurken doğal bağışık grupta pozitiflik saptanmadı. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p= 0.011$), (Şekil 21).

IL-2 (T at pos -330; G at pos +166) polimorfizmlerinde Şekil 21'de belirtilen pozitiflik oranları tespit edildi ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p= 0.236$), (Şekil 21).

IL-2 (G at pos -330; G at pos +166) ve **IL-2** (T at pos -330; T at pos +166) polimorfizmlerinin pozitiflik oranları Şekil 21'de gösterildiği şekildedir. Her iki polimorfizm incelemesinde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi (sırası ile $p= 0.470$, $p= 0.165$).



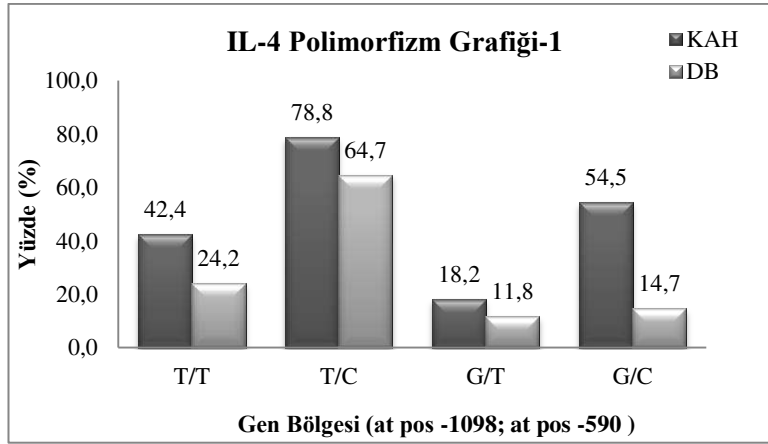
Şekil 21. IL-2 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

Genotipik olarak değerlendirildiğinde -330 gen bölgesinde GG, GT, TT genotipleri Tablo 11'de gösterilen oranlarda tespit edildi. Ancak genotiplerin hiçbirisinde gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi (sırası ile $p= 0.292$, $p= 0.306$, $p= 0.260$).

İnterlökin-2'nin +166 gen bölgesindeki GG, GT, TT genotiplerinin pozitiflik oranları Tablo 11'de gösterildi. Bu genotiplerin hiçbirisinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (sırası ile $p= 0.670$, $p= 0.660$, $p= 0.508$).

IL-4 (G at pos -1098; C at pos -590)polimorfizmleri kronik aktif hepatitli grupta %54.5 oranında pozitif bulunurken doğal bağışık grupta %14.7 oranında pozitif saptandı

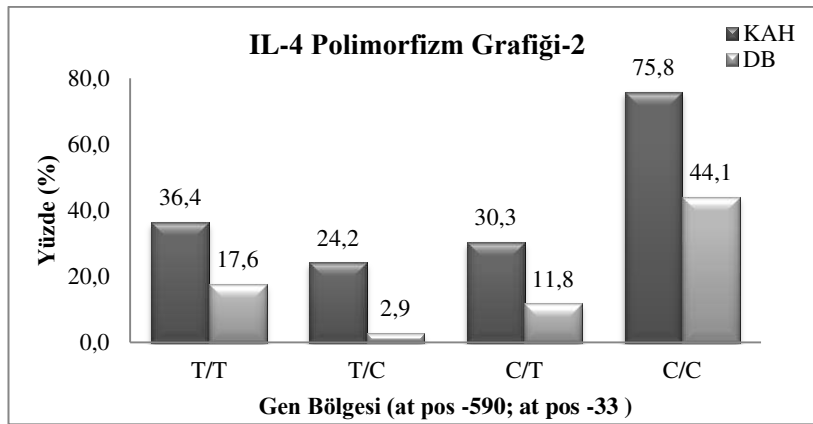
(Şekil 22). Değerlendirmelerimiz sonucunda $p= 0.001$ bulunarak istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.



Şekil 22. IL-4 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

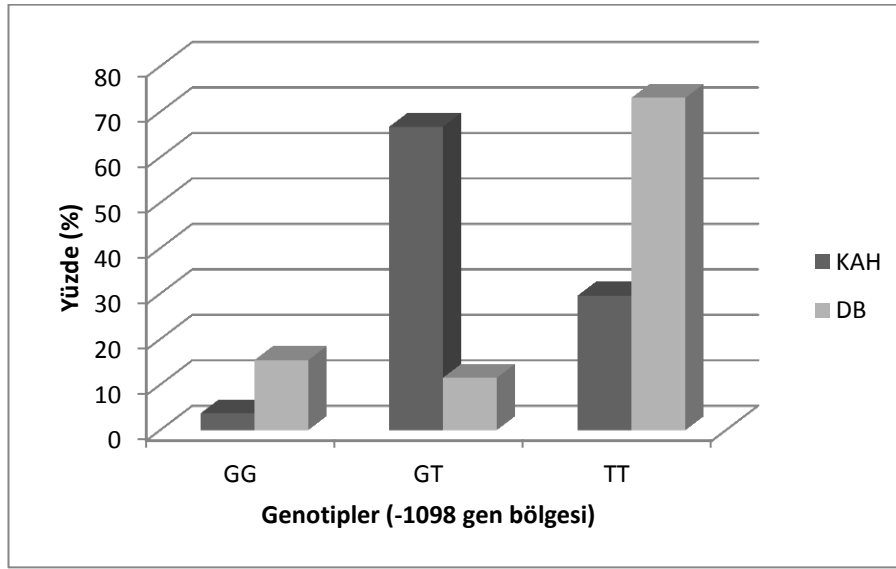
IL-4 (T at pos -590; C at pos -33) polimorfizmleri kronik aktif hepatitli hastaların %24.2'sinde doğal bağışık grubun %2.9'unda pozitif olarak bulundu (Şekil 23). İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p= 0.013$ bulunarak gruplar arasında anlamlı fark saptandı

IL-4 (C at pos -590; C at pos -33) polimorfizmleri kronik aktif hepatitli grupta %75.8 doğal bağışık grupta %44.1 oranında pozitif olarak bulundu (Şekil 23). İstatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p= 0.016$). İncelediğimiz diğer IL-4 polimorfizmlerinin gruplar arasındaki pozitiflik oranları Şekil 22 ve Şekil 23'te gösterilmiştir. Bu polimorfizmlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo 10).



Şekil 23. IL-4 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

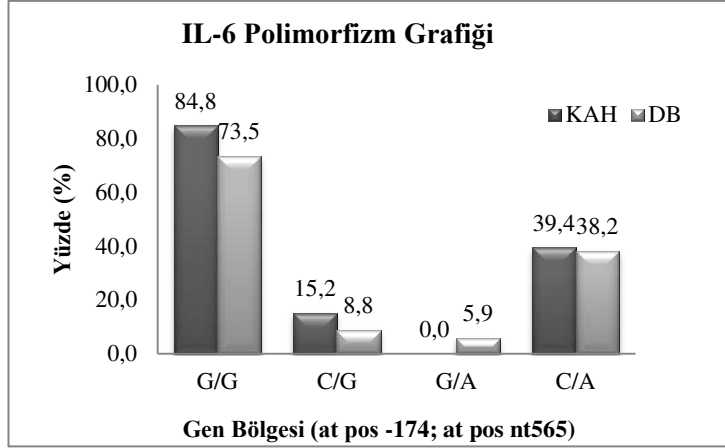
Genotipik olarak değerlendirildiğinde -1098 gen bölgesinde TT genotipinde doğal bağışık grupta istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p= 0.0015$). Pozitiflik oranları Şekil 24’te belirtilen GT genotipinde ise kronik aktif hepatitli grupta, doğal bağışık gruba göre anlamlı bir artış gözlemlendi [$p< 0.001$ ($p= 0.0001328$)], (Tablo 11). Bu gen bölgesindeki GG genotipi ile -590 ve -33 gen bölgesinde görülen genotiplerin pozitiflik oranları ile p değerleri Tablo 11’de gösterildi. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde bu genotiplerde gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi.



Şekil 24. IL-4 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasında Genotiplere Göre Pozitiflik Oranlarının Dağılımı

IL-6 (at pos -174; at pos nt565) polimorfizmleri değerlendirildiğinde elde edilen pozitiflik oranları Şekil 25’te belirtilmiştir. Çalışmamızda (G at pos -174; G at pos nt565) polimorfizmi için $p= 0.401$ bulunarak istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi.

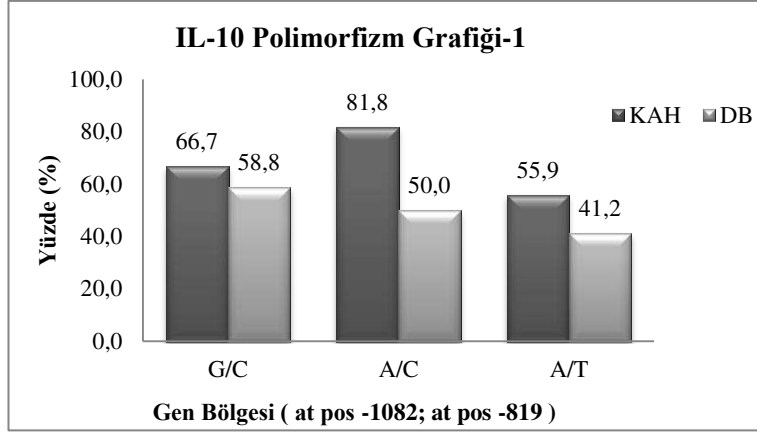
IL-6 (Cat pos -174; G at pos nt565), **IL-6** (Gat pos -174; A at pos nt565), **IL-6** (Cat pos -174; A at pos nt565) polimorfizmlerinin pozitiflik oranları Şekil 25’te gösterilmiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde sırası ile $p= 0.476$, $p= 0.492$, $p= 0.878$ değerleri elde edildi ve gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı.



Şekil 25. IL-6 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

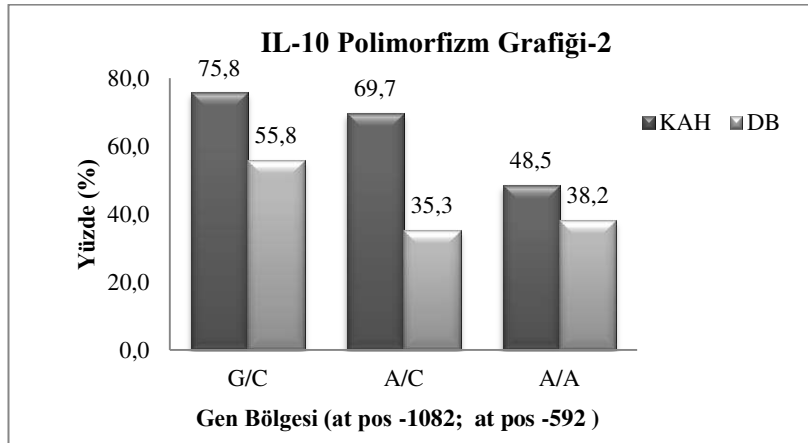
Genotipik olarak değerlendirildiğinde -174 gen bölgesinde CC, GC, GG genotiplerinin pozitiflik oranları Tablo 11’de gösterildiği şekilde bulundu. Bu genotiplerin hiçbirinde gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi (sırası ile $p= 0.286$, $p= 0.650$, $p= 1.000$). nt656 gen bölgesinde AA, GA, GG genotipleri incelendiğinde ise sırası ile $p= 0.344$, $p= 0.340$, $p= 0.450$ değerleri elde edilerek gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (Tablo 11).

IL-10 (A at pos -1082; C at pos -819) polimorfizmleri kronik aktif hepatitli grubun %81.8’inde, doğal bağışık grubun %50.0’ında pozitif olarak saptandı (Şekil 26). **IL-10** (A at pos -1082; C at pos -592) polimorfizmleri ise kronik aktif hepatitli hastaların %69.7’sinde pozitif olarak saptanırken doğal bağışık grubun %35.3’ünde, pozitif bulundu (Şekil 27). İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde sırası ile $p= 0.012$ ve $p= 0.010$ değerleri elde edilerek anlamlı farklar bulundu.



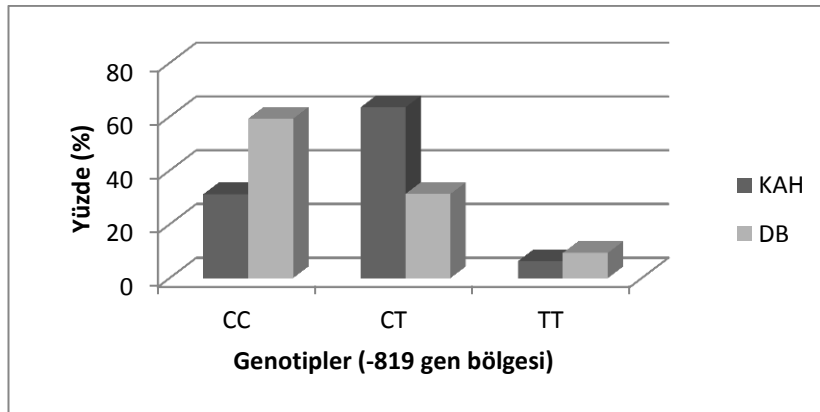
Şekil 26. IL-10 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

IL-10'un incelediğimiz diğer polimorfizmlerindeki pozitiflik oranları Şekil 26 ve Şekil 27'de gösterilmiştir. Bu polimorfizmlerin istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi (Tablo 10).



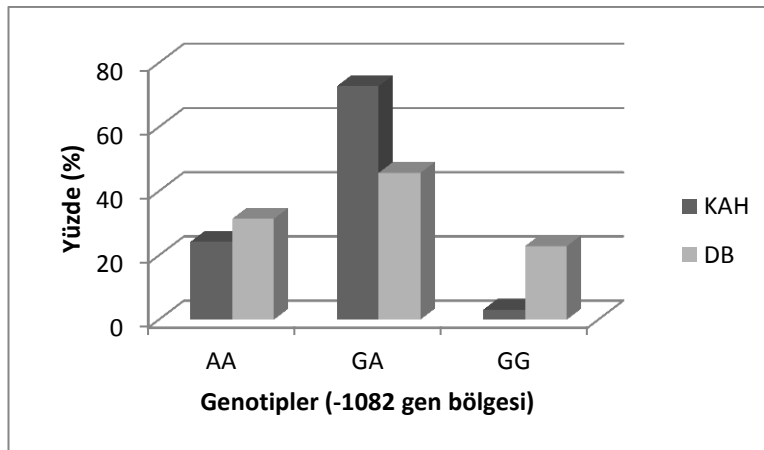
Şekil 27. IL-10 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasındaki Pozitiflik Oranları

Genotipik olarak değerlendirdiğimizde IL-10'un -819 gen bölgesinde CC, CT, TT genotiplerinin pozitiflik oranları Şekil 28'de gösterildiği gibidir. CC genotipinde doğal bağışık grup lehine olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p= 0.023$). CT genotipinde ise kronik aktif hepatitli grup lehine olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p= 0.012$). TT genotipinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p= 0.322$).



Şekil 28. IL-10 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasında Genotiplere Göre Pozitiflik Oranlarının Dağılımı

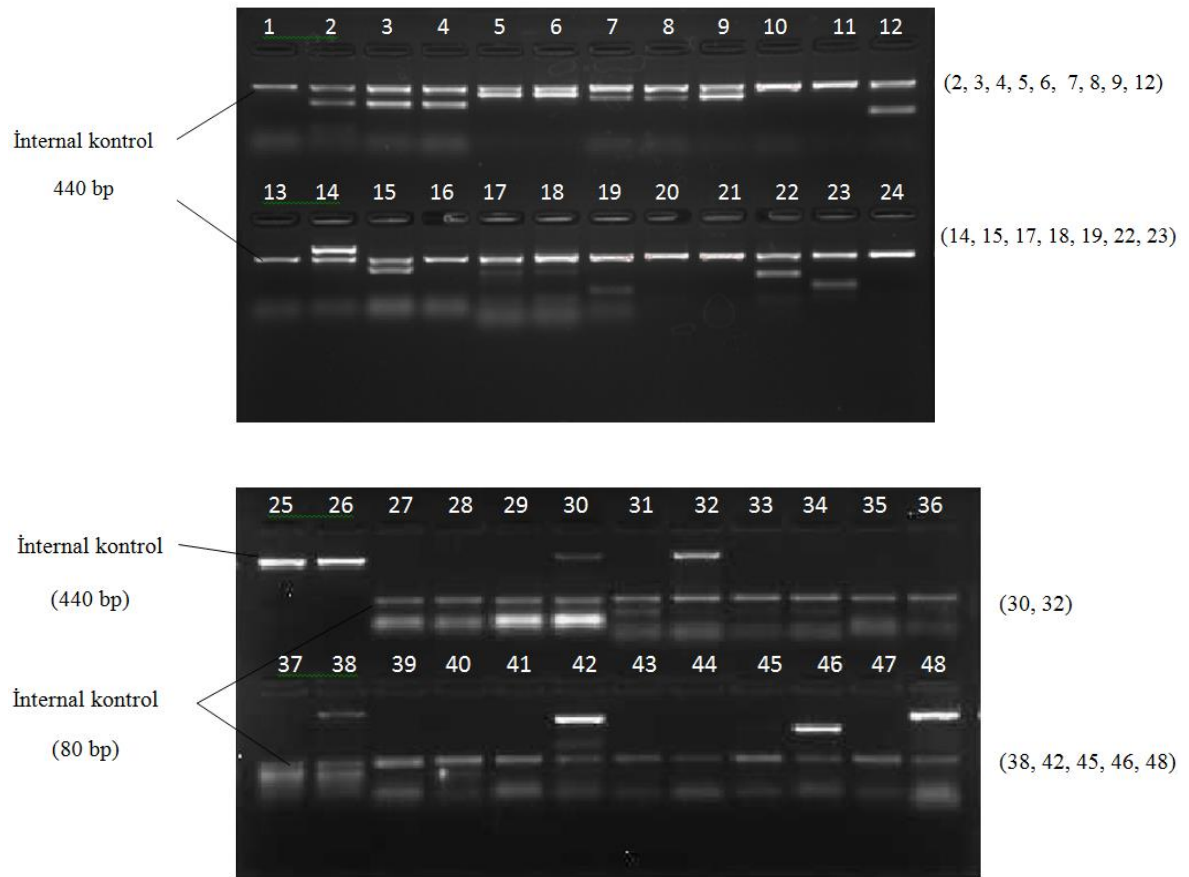
İnterlökin-10'un -1082 gen bölgesinde AA, GA, GG genotiplerinin pozitiflik oranları Şekil 29'da gösterilmiştir. GA genotipinde kronik aktif hepatitli grup lehine olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p= 0.014$). Yine aynı bölgede GG genotipinde doğal bağışık grup lehine olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p= 0.015$). AA genotipinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p= 0.560$).



Şekil 29. IL-10 Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Kronik Aktif Hepatitli (KAH) Grup ile Doğal Bağışık (DB) Grup Arasında Genotiplere Göre Pozitiflik Oranlarının Dağılımı

İnterlökin-10'un -592 gen bölgesindeki AA, CA, CC genotiplerinin pozitiflik oranları Tablo 11'de gösterilmiştir. Bu genotiplerde gruplar arsında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi (sırası ile $p=0.271$, $p=0.330$, $p=0.250$).

Sitokin gen polimorfizmlerinin kronik aktif hepatitli grup ile doğal bağışık grup arasındaki pozitiflik oranlarının dağılımı Şekil 30'da verilmiştir. Sitokin gen polimorfizminin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü Resim 4 ve Resim 5'te gösterildi.



Resim 2. Sitokin Gen Polimorfizminin %2'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü (Çift Bantlar Pozitifdir)

Tablo 10. HBV'ye Karşı Doğal Bağışık Grup ile Kronik Aktif Hepatitli Hastalarının Sitokin GenPolimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması

Sıra	Sitokin Geni	Allelik Özellik	bp	Doğal Bağışık		Kronik Aktif Hepatit		P değeri
				n/34	%	n/33	%	
1	IL-1 α	T at pos -889	220	9	26.5	24	72.7	<0.001
2	IL-1 α	C at pos -889	220	19	56.9	27	81.8	0.042
3	IL-1 β	C at pos -511	215	26	76.5	28	84.8	0.576
4	IL-1 β	T at pos -511	215	16	47.0	19	57.5	0.537
5	IL-1 β	T at pos +3962	336	14	41.2	20	60.6	0.178
6	IL-1 β	C at pos +3962	336	25	73.5	25	75.8	0.943
7	IL-1R	C at pos pst1 1970	288	25	73.5	28	84.8	0.401
8	IL-1R	T at pos pst1 1970	288	10	29.4	16	48.5	0.176
9	IL-1RA	T at pos mspa1 11100	297	27	79.4	32	97.0	0.054
10	IL-1RA	C at pos mspa1 11100	297	14	41.2	15	45.5	0.914
11	IL-4R α	G at pos +1902	143	7	20.6	9	27.3	0.219
12	IL-4R α	A at pos +1902	143	29	85.3	30	90.9	0.709
13	IL-12	C at pos -1188	802	8	23.5	16	48.5	0.060
14	IL-12	A at pos -1188	802	17	50.0	25	75.8	0.054
15	IFN- γ	A at pos +874	277	14	41.2	28	84.8	<0.001
16	IFN- γ	T at pos +874	277	18	52.9	24	72.7	0.155
17	TGF- β 1	C at Codon 10; G at Codon 25	80	5	14.7	20	60.6	<0.001
18	TGF- β 1	C at Codon 10; C at Codon 25	80	5	14.7	9	27.3	0.334
19	TGF- β 1	T at Codon 10; G at Codon 25	80	4	11.8	17	51.5	0.001
20	TGF- β 1	T at Codon 10; C at Codon 25	80	1	2.9	0	0	1.000
21	TGF- β 1	C at Codon 10	195	18	52.9	24	72.7	0.155
22	TGF- β 1	T at Codon 10	195	23	67.6	24	72.7	0.851
23	TNF- α	G at pos -308; G at pos -238	110	28	82.4	31	93.9	0.258
24	TNF- α	A at pos -308; G at pos -238	110	3	8.8	2	6.0	1.000
25	TNF- α	G at pos -308; A at pos -238	110	5	14.7	1	3.0	0.197
26	TNF- α	A at pos -308; A at pos -238	110	1	2.9	0	0	1.000
27	IL-2	T at pos -330; G at pos +166	562	19	55.9	24	72.7	0.236
28	IL-2	G at pos -330; G at pos +166	564	22	64.7	25	75.8	0.470
29	IL-2	G at pos -330; T at pos +166	569	0	0	6	18.2	0.011
30	IL-2	T at pos -330; T at pos +166	569	14	41.2	14	42.4	0.885
31	IL-4	T at pos -1098; T at pos -590	557	8	24.2	14	42.4	0.165
32	IL-4	T at pos -1098; C at pos -590	557	22	64.7	26	78.8	0.313
33	IL-4	G at pos -1098; T at pos -590	557	4	11.8	6	18.2	0.511
34	IL-4	G at pos -1098; C at pos -590	557	5	14.7	18	54.5	0.001
35	IL-4	T at pos -590; T at pos -33	610	6	17.6	12	36.4	0.146
36	IL-4	T at pos -590; C at pos -33	610	1	2.9	8	24.2	0.013
37	IL-4	C at pos -590; T at pos -33	610	4	11.8	10	30.3	0.117
38	IL-4	C at pos -590; C at pos -33	610	15	44.1	25	75.6	0.016
39	IL-6	G at pos -174; G at pos nt565	427	25	73.5	28	84.8	0.401
40	IL-6	C at pos -174; G at pos nt565	426	3	8.8	5	15.2	0.476

Tablo 10'un devamı

Sıra	Sitokin Geni	Allelik Özellik	bp	Doğal Bağışık		Kronik Aktif Hepatit		P değeri
				n/34	%	n/33	%	
41	IL-6	G at pos -174; A at pos nt565	428	2	5.9	0	0	0.492
42	IL-6	C at pos -174; A at pos nt565	428	13	38.2	13	39.4	0.878
43	IL-10	G at pos -1082; C at pos -819	305	20	8.8	22	66.7	0.681
44	IL-10	G at pos -1082; C at pos -592	530	19	55.9	25	75.8	0.145
45	IL-10	A at pos -1082; C at pos -819	305	17	50.0	27	81.8	0.012
46	IL-10	A at pos -1082; T at pos -819	305	14	41.2	19	55.9	0.272
47	IL-10	A at pos -1082; C at pos -592	530	12	35.3	23	69.7	0.010
48	IL-10	A at pos -1082; A at pos -592	530	13	38.2	16	48.5	0.548

Tablo 11.HBV'ye Karşı Doğal Bağışık (DB) ve Kronik Aktif Hepatitli (KAH)Grubun Sitokin GenPolimorfizm Sonuçlarının Genotiplerine Göre Karşılaştırılması

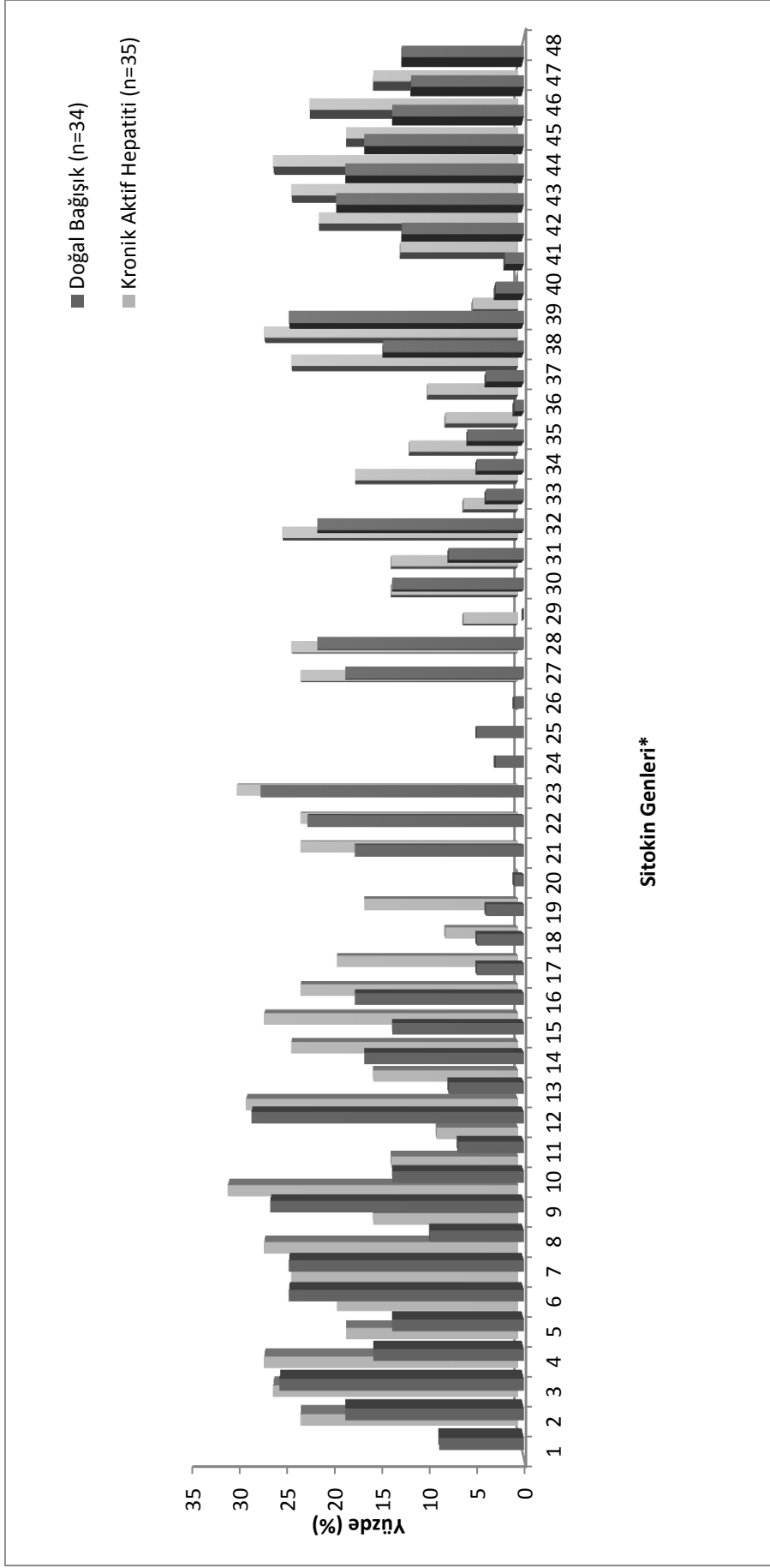
Sitokin	Gen bölgesi	Genotip	DB	%	KAH	%	χ^2	P
IL-1 α	-889	CC	17	65.4	4	13.3	16.101	< 0.001
		CT	5	19.2	22	73.4	16.329	< 0.001
		TT	4	15.4	4	13.3		0.28
IL-1 β	-511	CC	13	43.3	11	34.4	0.524	0.460
		CT	11	36.7	16	50.0	0.120	0.280
		TT	6	20.0	5	15.6	0.203	0.650
	-3962	CC	10	40.0	10	34.5	0.175	0.670
		CT	14	56.0	16	55.2	0.004	0.950
		TT	1	4.0	3	10.3		0.288
IL-1R	pst1 1970	CC	16	57.1	13	40.6	1.632	0.200
		CT	8	28.6	16	50.0	2.857	0.090
		TT	4	14.3	3	9.4		0.260
IL-RA	mspa1 11100	CC	2	6.9	1	3.0		0.354
		CT	14	48.3	16	48.5	0.018	0.890
		TT	13	44.8	16	48.5	0.163	0.680
IL-4R α	+1902	AA	23	74.2	19	61.3	1.181	0.280
		GA	5	16.1	10	32.3	2.199	0.140
		GG	3	9.7	2	6.5		0.320

Tablo 11'in devamı

Sitokin	Gen bölgesi	Genotip	DB	%	KAH	%	χ^2	P
IL-12	-1188	AA	11	55.0	10	37.0	0.001	0.970
		AC	6	30.0	14	51.9	2.244	0.130
		CC	3	15.0	3	11.1		0.310
IFN-γ	+874	TT	11	42.3	11	34.4	0.383	0.536
		TA	9	34.6	21	65.7	5.524	0.018
		AA	6	23.1	7	21.9	0.012	0.910
TGF-β1	Codon 25	CC	1	14.2	1	3.9		0.344
		GC	4	57.2	9	34.6		0.190
		GG	2	28.6	16	61.5		0.107
	Codon 10	TT	7	26.9	9	27.3	0.010	0.974
		CT	15	57.7	18	54.5	0.158	0.809
		CC	4	15.4	6	18.2		0.260
TNF-α	-308	GG	24	80.0	30	93.7		0.087
		GA	6	20.0	2	6.3		0.087
		AA	0	0.00	0	0.0		
	-238	GG	24	80.0	28	90.4		0.153
		GA	3	10.0	2	6.4		0.317
		AA	3	10.0	1	3.2		0.241
IL-2	-330	GG	4	14.3	4	13.3		0.292
		GT	17	60.7	22	73.4	1.047	0.306
		TT	7	25.0	4	13.3	1.283	0.260
	+166	GG	18	62.1	17	56.7	0.178	0.670
		GT	10	34.5	12	40.0	0.192	0.660
		TT	1	3.4	1	3.3		0.508
IL-4	-1098	GG	4	15.4	1	3.7		0.140
		GT	3	11.5	18	66.7	16.826	<0.001
		TT	19	73.1	8	29.6	10.005	0.0015
	-590	TT	2	7.1	2	6.7		0.380
		CT	11	39.3	16	53.3	1.149	0.280
		CC	15	53.6	12	40.0	1.072	0.300
	-33	CC	9	45.0	13	46.4	0.01	0.920
		CT	5	25.0	11	39.3	1.071	0.300
		TT	6	30.0	4	14.3		0.121

Tablo 11'in devamı

Sitokin	Gen bölgesi	Genotip	DB	%	KAH	%	χ^2	P
IL-6	-174	CC	1	3.7	3	9.7		0.286
		GC	12	44.5	12	38.7	0.196	0.650
		GG	14	51.8	16	51.6	0.000	1.000
	nt565	AA	2	7.4	3	9.7		0.344
		GA	12	44.4	10	32.2	0.910	0.340
		GG	13	48.2	18	58.1	0.570	0.450
IL-10	-1082	AA	11	31.4	8	24.2	0.340	0.560
		GA	16	45.7	24	72.7	5.959	0.014
		GG	8	22.9	1	3.1		0.015
	-819	CC	19	59.3	10	31.2	5.107	0.023
		CT	10	31.3	20	63.5	6.275	0.012
		TT	3	9.4	2	6.3		0.322
	-592	AA	4	12.9	5	15.6		0.271
		CA	9	29.1	13	40.6	0.931	0.330
		CC	18	58.0	14	43.8	1.291	0.250



Şekil 30. HBV'ye Karşı Doğal Bağışık ve Kronik Aktif Hepatitli Gruplarda Sitokin Gen Polimorfizmlerinin Dağılımı

*Tablo 10'daki polimorfizm sıra numaralarına göre düzenlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Hepatit B hastalığı, bir DNA virüsü olan HBV'nin neden olduğuyaşamı tehdit eden karaciğer enfeksiyonudur. Dünya çapında 360 milyon insanın HBV ile enfekte olduğu düşünülmektedir. Hepatit B'nin klinik seyri akut kendini sınırlayan enfeksiyon, inaktif taşıyıcılık, fulminan karaciğer yetmezliği, kronik siroz progresyonu ve hepatosellüler karsinom (HCC) olmak üzere oldukça değişkendir (40).

Hepatit B'ye karşı yetersiz primer immün cevabı olan kişiler kronik HBV gelişimi açısından artmış risk altında bulunmaktadır. Çünkü konağın immün cevabı, akut viral hastalığın iyileşmesinden ya da hastalığın kronikleşmesinden sorumludur (87-89). HBV ile enfekte bireylerin %5-10'u karaciğer hastalığı olsun ya da olmasın kronik taşıyıcılığa sebep olacak şekilde virüsü temizleyemezler (90). Kronik HBV ile ilişkili önemli risk faktörlerinden birisi de yaştır. HBV'ye maruziyet sonrası infantların %90'ında, çocukların %20-50'sinde ve yetişkinlerin %5-10'unda kronik HBV enfeksiyonu meydana gelir (91).

HBV'nin temizlenmesi immün cevabın (humoral ve hücrel) koordineli olarak, doğal ve yeterli şekilde oluşması ile mümkündür. HBV taşıyıcılarında karaciğer histolojisinin normal bulunması, akut veya kronik hastalıktaki karaciğer hasarından virüsün sitopatik etkisinin değil immün sistemin sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Sitokinler immün sistem hücreleri tarafından üretilen, hücreler arası iletişimi sağlayan, immün cevabın şiddetini ve sürekliliğini düzenleyen glikoprotein yapısındaki salgısal proteinlerdir (91, 92). Viral hepatitlerde immün cevabın başlamasında ve kronikleşmesinde sitokinlerin önemli rolleri vardır. Sitokin gen polimorfizmlerinin, sitokinlerin immün yanıtta fonksiyonlarını etkileyebilecekleri düşünülmektedir (92).

Bu çalışmada kronik aktif hepatit B enfeksiyonu bulunan 33 hasta ile HBV enfeksiyonu geçirerek iyileşen ve doğal bağışıklık geliştiren 34 hastada IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, IL-1RA, IL-4R α , IL-12, IFN- γ , TGF- β , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 sitokinlerinin kırksekiz polimorfik bölgesi PZR-SSP yöntemi ile incelenmiştir.

Çalışmamızın sonucunda gruplar arasında **IL-1 α** (T at pos -889), (C at pos -889), **IFN- γ** (A at pos +874), **TGF- β 1** (C at Codon 10; G at Codon 25), (Tat Codon 10; G at Codon 25), **IL-2**(G at pos -330; T at pos +166), **IL-4**(G at pos -1098; C at pos -590), (T at pos -590; C at pos -33), (C at pos -590; C at pos -33), **IL-10** (A at pos -1082; C at pos -819), (A at pos -1082; C at pos -592) gen polimorfizmlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir (Tablo 10).

Genotipik olarak değerlendirdiğimizde ise **IL-1 α** 'nın -889 promotor gen bölgesinde bulunan CC genotipi, **IL-4**'ün -1098 promotor gen bölgesinde TT genotipi **IL-10**'un -1082 gen bölgesinde bulunan GG genotipi ve -819 gen bölgesindeki CC genotipi doğal bağışık grup lehine olmak üzere anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür.

Genotipik olarak kronik aktif hepatitli hasta grubu lehine anlamlı olan farklar da tespit edilmiştir. **IL-1 α** 'nın -889 promotor gen bölgesindeki CT genotipi, **IFN- γ** 'nın +874 gen bölgesindeki TA genotipi, **IL-4**'ün -1098 promotor gen bölgesindeki GT genotipi **IL-10**'un -1098 promotor gen bölgesindeki GA genotipi ile -819 promotor gen bölgesindeki CT genotipi kronik aktif hepatitli grupta istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir.

Çalışmamızda **IL-1 α** 'nın -889 promotor gen bölgesinde bulunan T allel polimorfizmini değerlendirdiğimizde kronik aktif hepatitli grupta %73,doğal bağışık grupta%26oranında pozitif sonuç elde edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur($p<0.001$).Yine aynı bölgedeki C allelini incelediğimizde kronik aktif hepatitli grupta %82, doğal bağışık grupta %56 oranında pozitiflik saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p= 0.042$).Genotipik olarak incelediğimizde de CC genotipi doğal bağışık grup lehine olmak üzere anlamlı sonuçlar bulunmuş ($p< 0.001$), CT genotipi ise kronik aktif hepatitli grupta anlamlı artış göstermiştir ($p< 0.001$).

Javan ve ark (93), kronik hepatit B'li213hasta ile sağlıklı 291 kontrol ileİran'da PZR -SSP (*single strand polymorphism-polymerase chain reaction*) yöntemi ile yaptıkları çalışmada IL-1 α 'nın-899 promotor gen bölgesinde bulunan TT genotipinin kronik hepatit B enfeksiyonu ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Hastalarda; %25.35, kontrol grubunda; %9.31, $p< 0.001$). Ancak CC ve CT genotiplerindegruplar arasında anlamlı fark bulamamışlardır. Bizim çalışmamızla bu çalışmanın benzer yanı IL-1 α 'nın-899 promotor gen bölgesinde görülen polimorfizmlerin kronik HBV enfeksiyonu ile ilişkisini göstermiş olmasıdır. Ancak her iki çalışmada ilişkili olduklarıbulunan genotiplerin farklılık

göstermelerinin nedenleri araştırılabilir. Biz bu farklılığın coğrafik koşullar, genetik faktörler gibi değişik sebeplere bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Ek olarak çalışmamızda hasta sayımızın Javan ve ark'nın çalışmasına göre az olması nedeni ile örnek sayımızı artırarak yeniden genotiplerin belirlenmesi ve her iki çalışmanın tekrar karşılaştırılması uygun olacaktır.

Mehmedovic ve ark (94) hepatitli hastalar (infeksiyöz ve infeksiyöz olmayan) ve kontrol grubundan oluşan 150 kişi üzerinde IL-1 α 'nın serum düzeylerini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda aktif genetik materyal replikasyonu bulunan hastalarda (HBV-DNA ve HCV-RNA PZR pozitif) oldukça yüksek IL-1 α düzeyleri saptamışlardır. Bu şekilde aktif HBV enfeksiyonu sırasında IL-1 α düzeylerinin yükseldiğini göstermişlerdir.

Literatürde Alzheimer, osteoartrit, kronik böbrek hastalıkları, iskemik felçler gibi birçok hastalığın IL-1 α polimorfizmleri ile ilişkisini inceleyen çalışma bulunmaktadır (95-98). IL-1 güçlü proinflatuar özelliği olan bir sitokindir. Hepatosit hasarının oluşmasında başrolleri oynamaktadır. Bu bağlamda IL-1 polimorfizmlerin kendi fonksiyonlarını etkilemesi ve hücre hasarını artırıcı etkileri ile hepatit gelişimine eğilimi artırması olasıdır. Hastalık gelişimine neden olabilen bu sitokinin tedavi sırasındaki etkileri, siroz ve karsinom gelişimine yol açıp açmadığı araştırılması gereken önemli konulardır. Bu çalışmalar tamamlandığında hastalığın prognozunda yol gösterici bir parametre olarak kullanılması mümkündür. Ancak IL-1 α polimorfizmlerinin kronik HBV enfeksiyonu ile olan ilişkisini gösteren az sayıda çalışma mevcuttur. Bizim çalışmamız bu anlamda hepatit B enfeksiyonu ile IL-1 α polimorfizmlerinin ilişkisini araştıran sayılı çalışmalar arasında yer almaktadır. Bu konu üzerinde ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda IL-1 β 'nin -511 gen bölgesindeki C ve T allelerini ve +3962 gen bölgesindeki T ve C allelerini değerlendirdiğimizde kronik aktif hepatitli grup ile doğal bağışık grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir (sırası ile $p=0.576$, $p=0.537$, $p=0.178$, $p=0.943$). Bu bölgelerdeki CC, CT, TT genotiplerini incelediğimizde hepatit B enfeksiyonu ile ilişki bulunmamıştır.

Zhang ve ark (99) kronik hepatit B'li 190 hasta ile 249 sağlıklı kontrolde IL-1 β 'nin -511 promotor gen bölgesindeki C ve T allelleri ile CC, CT, TT genotiplerini PZR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction*) yöntemi ile ayrı ayrı değerlendirdikleri çalışmada, gruplar arasında anlamlı fark bulamamışlardır. Bizim çalışmamız Zhang ve ark'nın çalışması ile uygunluk göstermektedir.

Migita ve ark (100), 65'i asemptomatik taşıyıcı, 58'i kronik hepatitli, 65'i sirozlu, 49'u hepatosellüler karsinomlu toplam 237 hasta ve 63 sağlıklı kontrolde IL-1 β 'nin-511 ve -31 promotor gen bölgelerindeki polimorfizmleri PZR-RFLP yöntemi ile incelemişlerdir. Bu lokuslar arasında bağlantı dengesizliği olduğunu belirtmişlerdir. IL-1 β 'nin -31 gen bölgesindeki TT ve TC genotiplerinin sirozlu hastalarda anlamlı bir artış gösterdiğini bulmuşlardır (sirozlularda; %86.1, sirozlu olmayanlarda; %72.1, $p=0.009$). Ancak -511 gen bölgesinde CC, CT, TT genotiplerinde hepatit B enfeksiyonu ile anlamlı bir ilişki gösterememişlerdir. Biz de çalışmamızda -511 promotor gen bölgesinin CC, CT, TT genotiplerinde kronik aktif hepatitli grup ve doğal bağışık grup arasında fark bulamamamız nedeniyle Migata ve arkadaşlarının çalışması ile uygunluk göstermektedir.

Saxena ve ark (101) 67'si inaktif HBV taşıyıcıları, 65'i kronik aktif HBV'li, 62'si sirozlu ve 59'u hepatosellüler karsinomlu hasta ile 153 sağlıklı kontrolde, PZR-RFLP yöntemi ile yaptıkları çalışmada IL-1 β 'nin-511 promotor gen bölgesinde bulunan CT ve TT genotiplerinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını rapor etmişlerdir. Bizim sonuçlarımızda bu çalışmanın sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

IL-1RA'nın (T at pos msp1 11100) ve (C at pos msp1 11100) polimorfizmlerini değerlendirdiğimizde sırası ile $p=0.054$ ve $p=0.914$ değerlerini elde ettik. Kronik aktif hepatit B'li hastalar ve doğal bağışık grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Genotipik olarak değerlendirdiğimizde ise CC, CT, TT genotipleri ile hepatit B enfeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.

Zhang ve ark (99) kronik hepatit B'li 190 hasta ile 249 sağlıklı kontrolde, IL-1RA'nın intron 2 bölgesindeki VNTR polimorfizmlerini değerlendirdikleri çalışmada bazı allellerin kronik hepatit B ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Migita K ve ark (100), 65 asemptomatik taşıyıcı, 58 kronik hepatitli, 65 sirozlu, 49 hepatosellüler karsinomlu toplam 237 hastada PZR-RFLP yöntemi ile IL-1RA'nın VNTR polimorfizmlerini incelemişlerdir. IL-1RA'nın genotiplerinin dağılımında anlamlı bir farklılık bulamamışlardır.

Saxena R ve ark (101) 67'si inaktif HBV taşıyıcı, 65'i kronik aktif HBV'li, 62'si sirozlu ve 59'u hepatosellüler karsinomlu hasta ile 153 kontrolde yaptıkları çalışmada IL-1RA (VNTR) 1/2 genotipinin hepatosellüler karsinom gelişimi için risk oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmanın sonucunda proinflatuar özelliği olan IL-1'i antagonize eden IL-1RA'nın msp1 11100 gen bölgesinde T ve C allelleri ile CC, CT,

TT genotiplerini değerlendirdik ve bupolimorfizmlerinin kronik hepatit B enfeksiyonu gelişimi ile ilişkisi bulunmadığı sonucunu elde ettik.IL-1RA'nın mspal 11100 gen bölgesinin polimorfizmlerinin, multipl skleroz ve multipl myelom gibi diğer hastalıklarda incelenmiş olmasına rağmen hepatit B ile ilgili literatür bilgisine rastlanmamıştır (102, 103). Bu nedenle çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin ayrıca önem taşıdığını dūřünmekteyiz.

Çalışmamızda **TNF- α** 'nın -308 ve -238 promoter gen bölgelerindeki polimorfizmlerin değerlendirilmesi sonucu kronik aktif hepatit hastaları ile doğal bağışık grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (G at pos -308; G at pos -238; $p= 0.258$, A at pos -308; G at pos -238; $p= 1.000$, G at pos -308; A at pos -238; $p= 0.197$, A at pos -308; A at pos -238; $p= 1.000$). Gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiş olmasına rağmen her iki grupta da (G at pos -308; G at pos -238) polimorfizmi %80'in üzerinde görülmüş, diğer bölgelerdeki polimorfizm oranları %15'in altında bulunmuştur. Genotipik olarak değerlendirdiğimizde GG, GA ve AA genotiplerinin gruplar arasında anlamlı farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Ancak GG genotipinin her iki gen bölgesinde de %80'in üzerinde pozitif olarak bulunduğunu özellikle ifade etmekteyiz.Yine hastanemizde 2007 yılında 25 nonülser dispepsi ve 25 peptik ülser hastası olmak üzere 50 hastada yapılan sitokin gen polimorfizmlerinin incelendiği tez çalışmasında da (G at pos -308; G at pos -238) gen bölgesinde %100'lere varan oranda pozitiflik saptamış olmaları bizim çalışmamızla uyumlu bulunmuştur. Bu durum bize bu polimorfizmin bölgemizde sık bulunan bir polimorfizm olabileceğini dūřündürmektedir. Ancak bunu kanıtlamak için sağlıklı kişilerden oluşan çok sayıda örnekte bölgemize ait polimorfizm haritalarının oluşturulması ve bu durumun tekrar değerlendirilmesi gerekmektedir. Hap-Map projesi kapsamında gerçekleştirilmiş olan SNP'lerin coğrafi olarak dağılımının belirlendiği büyük çalışmalarda olduğu gibi ölkemizde de benzer çalışmaların yapılması oldukça önemlidir (104).

Kao ve ark(100)kronik HBV enfeksiyonu bulunan 274 hasta ve HBV enfeksiyonunu iyileşerek geçiren 194 kontrol ile,TNF- α 'nın-1031,-857, -308 ve -238 promoter gen bölgelerindekipolimorfizmleri değerlendirdikleri çalışmada -863 promoter bölgesinde A alleli ilekronik HBV enfeksiyonunun ilişkili olduğunurapor etmişlerdir ($p= 0.03$).Ancak TNF- α diğer polimorfizmlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır. Bu

anlamda Kao ve ark'nın yaptığı çalışma ile bizim çalışmamızın sonuçları uyumlu bulunmuştur.

Takakura ve ark (106) fulminan hepatitli 42 hasta, akut hepatitli 78 hasta ve 149 sağlıklı kontrolde yaptıkları çalışmada TNF- α 'nın -1031, -863, -857, -308 ve -238 promotor gen bölgelerindeki polimorfizmleri incelemişlerdir. Bu polimorfizmlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulmadıklarını rapor etmişlerdir.

Xia ve ark (107) on iki çalışmayı irdelerek yaptıkları meta-analizde kronik HBV'li 2754 hasta ile 1630 doğal bağışık kontrolde -1031, -863, -857, -308 and -238 gen bölgelerini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda TNF- α 'nın -863 promotor gen bölgesinde bulunan CC genotipinin HBV doğal bağışıklığı ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır ($p=0.04$). TNF- α 'nın -308 promotor gen bölgesinde bulunan GG genotipini ise kronik HBV enfeksiyonu ile ilişkilendirmişlerdir. Diğer TNF- α polimorfizmlerin HBV enfeksiyonu ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda ise -308 promotor gen bölgesinde bulunan polimorfizmleri ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamamız nedeni ile bu çalışma ile uygun sonuçlar elde edilmiştir.

Yang ve ark (108) hepatosellüler karsinomlu 2763 hasta ve sağlıklı 4152 kişi ile yaptıkları meta-analiz çalışmasında ise TNF- α 'nın -308 promoter gen bölgesinde GA genotipi bulunanlarda, hepatosellüler karsinom gelişim riskinde artış saptamışlardır. Ancak değerlendirdikleri diğer polimorfizmlerle (TNF- α 'nın -238'de GA, IL-1 β 'nin -31'inde TC, -511'inde CT ve IL-10'un -1082'de GA) hepatosellüler karsinom gelişimi arasında ilişki saptamamışlardır.

Cheong ve ark (109) 72'si inaktif taşıyıcı, 261'i kronik hepatitli, 79'u sirozlu olmak üzere Kore'li 412 hasta ve HBV enfeksiyonu geçirerek iyileşen sağlıklı 204 kontrolde TNF- α 'nın -308 ve -238 gen promoter bölgelerindeki polimorfizmleri incelemişlerdir. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit etmemişlerdir. Bizim çalışmamızda da Cheong ve arkadaşlarının çalışmasıyla benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Zhu ve ark (110) intrauterin HBV enfeksiyonu geçiren immunsuprese 46 çocuk, normal immun cevaba sahip olan 120 çocuk ve 127 kontrol grubunda yaptıkları çalışmada TNF- α 'nın -238 gen bölgesinde bulunan polimorfizmleri incelemişlerdir. Bu gen bölgesinde bulunan A allelinin HBV intrauterin enfeksiyonu ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Ben-Ari ve ark (90) kronik HBV enfeksiyonu bulunan 77 hastada (HBV taşıyıcısı 46 hasta, dekompanse karaciğer nakli adayı 21 hasta ve hepatosellüler karsinomlu 10 hasta), akut HBV enfeksiyonu geçirerek iyileşen 48 hasta ve 10 sağlıklı kontrol ile yaptıkları çalışmada TNF- α 'nın -308 promotor gen bölgesinde bulunan polimorfizmi incelemişler ancak bizim çalışmamıza uygun şekilde gruplar arasında anlamlı fark tespit etmemişlerdir.

Ülkemizde Akkiz ve ark (111) tarafından yapılan bir vaka-kontrol çalışmasında HBV ya da HCV enfeksiyonu bulunan hepatosellüler karsinomlu 110 hasta ile sağlıklı 110 gönüllüyü incelemişlerdir. PZR-RFLP yöntemi ile yapılan çalışmada TNF- α 'nın -308 promotor gen bölgesini incelemişler, A allelinin (AA ya da GA genotipinin) hepatosellüler karsinomlu hastalarda istatistiksel olarak anlamlı bir risk faktörü olduğunu rapor etmişlerdir ($p < 0.001$).

Ribeiro ve ark'nın (112) kronik hepatit B hastası olan 30 kişi ve doğal bağışık 41 kişi ile yaptıkları çalışmada TNF- α 'nın -308 pozisyonundaki GG, GC, CC genotiplerini değerlendirmişler ancak hastalıkla ilişkili bulmamışlardır.

Zheng ve ark (113) yaptıkları meta-analizde, 1966-2010 yılları arasında 11 çalışmayı değerlendirerek 3576 kronik hepatit B'li hasta ve 2044 kontrolde TNF- α 'nın -238 gen bölgesindeki A allelini incelemişler ve GA ve AA genotipini taşıyan Avrupa'lılarda kronik HBV gelişimi için risk artışı olduğunu göstermişlerdir ($p = 0.032$ ve $p = 0.002$). Ancak Asyalılarda -238 ve -863 gen bölgelerindeki polimorfizmlerde kronik HBV gelişimi ile anlamlı bir ilişki tespit etmemişlerdir. Bu meta-analiz çalışmasına göre bizim çalışmamızı değerlendirdiğimizde bizim bulgularımızın Asya'lıların polimorfizm sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Güçlü proinflatuar özelliği olduğunu bildiğimiz ayrıca hepatosit nekrozunda oldukça etkili olan TNF- α 'nın polimorfizmlerinin coğrafi bölgelere göre değişiklik gösterdiğini analiz eden Zheng ve ark'nın bu çalışmalarından sonra bizim çalışmamız da ülkemizin benzerlik gösterdiği coğrafi bölgenin tespitini sağlamış olması açısından oldukça önemlidir.

Çalışmamızda **IL-6**'nın -174 gen bölgesindeki CC, CG, GG ve nt565 gen bölgesindeki GG, GA, AA polimorfizmlerini değerlendirdiğimizde kronik aktif hepatitli grup ile doğal bağışık grup arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmemiştir.

Ben-Ari ve ark (90) kronik HBV enfeksiyonu bulunan 77 hastada (HBV taşıyıcısı 46 hasta, dekompanse karaciğer nakli aday 21 hasta ve hepatosellüler karsinomlu 10 hasta), akut HBV enfeksiyonu geçirerek iyileşen 48 hasta ve 10 sağlıklı kontrol ile yaptıkları

çalışmada IL-6'nın -174 promotor gen bölgesindeki sitokin gen polimorfizmlerini incelemişler ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit etmemişlerdir. IL-6 polimorfizm bulgularımız Ben-Ari ve arkadaşlarının sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Migita ve ark (114) HBV ile enfekte olan 236 Japon hastada yaptıkları çalışmada IL-6'nın -174 promotor gen bölgesini incelemişler ve hastalarının tamamında GG genotipini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte GC ve CC genotipine hiç rastlamadıklarını belirtmişlerdir.

Park ve ark (115) ise HBV ile enfekte 1046 hastada IL-6'nın -174 gen bölgesinde bulunan polimorfizmleri değerlendirdiklerinde hastaların büyük çoğunluğunda GG genotipini tespit etmişler ($p=0.002$), CC genotipini ise hiçbir hastada bulamamışlardır.

Fabris ve ark (116) HBsAg inaktif taşıyıcı 27 kişi, kronik hepatit B'li 80 hasta ve kontrol grubu olarak 156 gönüllü (anti-Hbc negatif 131 kişi ve anti-Hbc pozitif 25 kişi) üzerinde yaptıkları çalışmada IL-6'nın -174 promotor gen bölgesinde bulunan polimorfizmleri incelemişlerdir. GG ve GC genotipi bulunan hastalarda IL-6 serum seviyelerinin yüksek olduğunu, CC genotipi bulunan hastalarda ise IL-6 düzeylerinin düşük olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma IL-6 polimorfizmlerinin fenotipik olarak etkilerini göstermesi bakımında oldukça önemlidir. Biz de çalışmamızın devamında sitokinlerin polimorfizmleri ile serum seviyelerinin eş zamanlı olarak çalışılması ve aralarındaki ilişkinin gözle görülür hale getirilmesini hedeflemekteyiz.

Ribeiro ve ark (112) kronik hepatit B hastası olan 30 kişi ve doğal bağışık 41 kişi ile yaptıkları çalışmada IL-6'nın -174 pozisyonundaki GG, GC, CC genotiplerini incelemişler ve gruplar arasında anlamlı fark bulamamışlardır. Yapılan bu çalışmaların bir kısmı ve bizim çalışmamız IL-6 polimorfizmlerinin HBV enfeksiyonu ile ilişkisini gösterememiştir. Diğer bir kısmı ise özellikle GG genotipini ilişkili bulmalarına rağmen CC genotipini ilişkili bulmamışlardır. IL-6 hepatositleri aktive ederek akut faz proteinlerinin sentezlenmesine neden olmaktadır (oppenheim). Karaciğer dokusu üzerine etkileri olduğunu bildiğimiz IL-6'nın, gen bölgelerindeki polimorfizmlerin hepatosit hasarı ile seyreden HBV enfeksiyonu ile ilişkili olması olasıdır. Çalışmalar arasındaki bu farklılığın sebepleri araştırılmalı gerekirse daha büyük hasta gruplarında tekrar test edilmelidir.

TGF- β 1 sitokininde ise (C at Codon 10; G at Codon 25) ve (T at Codon 10; G at Codon 25) bölgelerindeki polimorfizmleri sırası ile doğal bağışık grupta %15, %12, kronik

aktif hepatitli grupta sırası ile %61, %52 pozitiflik oranları ile her ikisinde de $p<0.001$ değerini elde ettik. Her iki polimorfik bölgenin incelenmesi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur. Ancak codon 10 ve codon 25 gen bölgelerinde bulunan genotipleri değerlendirdiğimizde anlamlı farklar bulunamadı. Bu durum genotiplerin belirlenmesi sırasında bazı hastaların anlamlı sonuç vermemesi nedeni ile çalışma dışı bırakılmasına bağlı olabilir. Bu nedenle diğer çalışmalarla birlikte değerlendirmelerimizi yaparken allel pozitifliklerimizi kullandık.

Mehmedovic ve ark (94) yaptıkları çalışmada (enfeksiyöz ve nonenfeksiyöz) hepatitli hastalar ve kontrol grubundan oluşan 150 kişide TGF- β 1'nin serum düzeylerini incelemiştir. TGF- β 1 düzeylerinin ise maligniteli ve toksik hepatitli gruplarda yüksek konsantrasyonlarda olduğunu rapor etmişlerdir.

Ben-Ari ve ark (90) kronik HBV enfeksiyonu bulunan 77 hastada (HBV taşıyıcısı 46 hasta, dekompanse karaciğer nakli adayı 21 hasta ve hepatosellüler karsinomlu 10 hasta), akut HBV enfeksiyonu geçirerek iyileşen 48 hasta ve 10 sağlıklı kontrol ile yaptıkları çalışmada TGF- β 1 (+10 ve +25 gen bölgeleri) sitokin gen polimorfizmlerini incelemişler ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmadıklarını rapor etmişlerdir. Bu anlamda bizim çalışmamız ile Ben-Ari ve ark'nın çalışması paralellik göstermemektedir.

Wu ve ark (117) yaptıkları meta-analiz çalışmasında Asya ve Kafkas toplumlarında yapılan sekiz çalışmayı incelemiştir. Çalışmalarının sonucunda TGF- β 1'nin 509promotor gen bölgesinde CT ve +869'da TC genotiplerinin HBV ve HCV ile enfekte hastalarda siroz gelişimi için risk oluşturduğunu göstermişlerdir.

Baştürk ve ark (118) son evre karaciğer yetmezliği bulunan 27 hasta, HBV taşıyıcısı 23 kişi ve 60 sağlıklı kontrolde TGF- β 1(codon 10–25) polimorfizmlerini incelemişler ve TC–GG genotiplerinin hasta ve taşıyıcı grupta %66, kontrol grubunda %45 ($p= 0.028$) bularak belirgin şekilde ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamız da Baştürk ve ark'nın çalışmalarını doğrular şekilde uygunluk göstermektedir. Genel olarak immünitinin negatif kontrolünde yer alan ancak bazen de proinflamatuvar özelliği olan TGF- β 'nın HBV enfeksiyonunun prognozu ile ilişkili olduğu yapılan bu çalışmalar sonucunda aşıkardır. Ancak bu konuda daha kapsamlı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Yaptığımız çalışmada IFN- γ 'nın +874 gen bölgesinde bulunan polimorfizmleri değerlendirdiğimizde doğal bağışık 14 kişide (%41), kronik aktif hepatitli 28 (%85) olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p<0.001$). Genotipik olarak

değerlendirdiğimizde ise AT genotipinin kronik aktif hepatitli grupta oldukça artmış olduğu tespit edilmiştir ($p=0.018$).

Ben-Ari ve ark (90) kronik HBV enfeksiyonu bulunan 77 hastada (HBV taşıyıcısı 46 hasta, dekompanse karaciğer nakli aday 21 hasta ve hepatosellüler karsinomlu 10 hasta), akut HBV enfeksiyonu geçirerek iyileşen 48 hasta ve 10 sağlıklı kontrol ile yaptıkları çalışmada IFN- γ 'nın +879 gen bölgesindeki sitokin gen polimorfizmlerini incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda kronik HBV enfeksiyonu olan hastalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit etmemişlerdir ($p=0.003$).

Baştürk ve ark (118) son evre karaciğer yetmezliği bulunan 27 hasta, HBV taşıyıcısı olan 23 hasta ve 60 sağlıklı kontrolde yaptıkları çalışmada IFN- γ 'nın +874 gen bölgesinde bulunan polimorfizmlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır. Aynı coğrafi bölgede ve benzer örnek sayısı ile yapılan bu iki çalışmanın farklılık göstermesi ilgi çekicidir. Bu konuda daha fazla sayıda örnek ile IFN- γ polimorfizmlerinin değerlendirilmesi uygun olacaktır.

Gao Wu ve ark (119) HBV/HCV ile enfekte 203 kronik hasta ve 74 kontrolde yaptıkları bir araştırmada IFN- γ 'nın +874 gen bölgesinde bulunan AA genotipinin persistan HBV ve HCV enfeksiyonu gelişimi ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Arababadi ve ark (120) okült hepatit B'li 57 hasta ve sağlıklı 100 kontrolde IFN- γ 'nın +874 gen bölgesinde bulunan polimorfizmleri incelemişlerdir. AA, AT, TT genotiplerinin okült hepatit B enfeksiyonu ile ilişkisi olmadığını göstermişlerdir.

Zhu ve ark (110) intrauterin HBV enfeksiyonu geçiren immunsuprese 46 çocuk, normal immun cevaba sahip olan 120 çocuk ve 127 kontrol grubunda yaptıkları çalışmada IFN- γ +874 gen bölgesini inceledikleri çalışmada A allelinin HBV intrauterin enfeksiyonu ile ilişkili olduğu bulmuşlardır.

Zhang ve ark (121) kronik hepatit B'li 231 hasta ile HBV enfeksiyonundan spontan olarak iyileşen 165 kişide IFN- γ 'nın +874 gen bölgesinde bulunan polimorfizmlerini incelemişlerdir. AA genotipinin kronik HBV ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda ise AT genotipini ilişkili bulmamız coğrafi farklılıkları düşündürmektedir. Ancak her iki çalışmada IFN- γ 'nın polimorfizmlerinin kronik HBV enfeksiyonu ile ilişkili olduğunu göstermeleri nedeni ile birbirleri ile uyumludur. Sonuç olarak çok önemli bir

proinflamatuvar sitokin olan IFN- γ 'nın polimorfizmlerinin tespit edilmesinin, kronik hepatit B gelişimi için kişisel duyarlılığının belirlenmesinde çok önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda **IL-2** (T at pos -330; G at pos +166), (G at pos -330; G at pos +166), (G at pos -330; T at pos +166), (T at pos -330; T at pos +166) polimorfizmleri incelenmiştir. G at pos -330; T at pos +166 polimorfizminde kronik aktif hepatitli grupta 18 hastada pozitiflik bulunurken doğal bağışık grupta hiç pozitiflik saptanamamıştır. Sonuç olarak $p= 0.011$ bulunarak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir. IL-2'nin diğer polimorfik bölgelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark elde edilememiştir. Genotipik olarak değerlendirdiğimizde her iki gen bölgesinde de görülebilen GG, GT, TT genotiplerinde gruplar arasında anlamlı ilişki saptanamamıştır.

Gao ve ark (122) 79 kronik HCV ve HBV enfeksiyonlu hasta, 55 kronik HCV enfeksiyonlu hasta, 69 kronik HBV enfeksiyonlu hasta ve 74 kontrolden oluşan 277 kişide IL-2'nin-330 promotor gen bölgesinde bulunan polimorfizmleri incelemişlerdir. T allelinin kronik HBV ve HCV gelişimi için risk faktörü olduğunu, G allelinin ise ciddi klinik seyir ve siroz riskinin azalması ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Gao ve ark (118) HBV ya da HCV ile enfekte 203 kronik hasta ve 74 kontrolde yaptıkları diğer bir araştırmada IL-2'nin -330 gen bölgesindeki TT genotip ve T allelinin persistan HBV ve HCV enfeksiyonu gelişimi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda **IL-4**'ün -1098, -590 ve -33 promotor gen bölgelerini değerlendirdiğimiz çalışmamızda -1098 gen bölgesinde doğal bağışık grup lehine olmak üzere GT genotipinde, kronik aktif hepatitli grup lehine de TT genotipinde anlamlı artışlar saptanmıştır (sırası ile $p < 0.001$, $p = 0.0015$). Diğer gen bölgelerinin HBV enfeksiyonu ile ilişkisi olmadığı görülmüştür.

Gao ve ark (119) HBV/HCV ile enfekte 203 kronik hasta ve 74 kontrolde yaptıkları araştırmada IL-4 -589 CC, TT, CT, C, T polimorfizmlerinin pozitiflik oranlarında gruplar arasında farklılık bulamamışlardır ancak CC, CT genotipine C allel polimorfizmlerinin anormal serum ALT düzeyleri ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle bizim çalışmamızın sonuçları Gao ve ark'nın sonuçları ile uyumlu bulunmamıştır .

Zhu ve ark (110) intrauterin HBV enfeksiyonu geçiren immun yetmezlikli 46 çocuk, normal immun cevaba sahip 120 çocuk ve 127 kontrol grubu arasında yaptıkları çalışmada IL-4'ün -590 promotorgen bölgesinde bulunan polimorfizmleri incelemişler ve C/T allellerinden birisine sahip çocuklarda intrauterin HBV enfeksiyonuna yatkın olduğunu

göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda ise -590 gen bölgesi polimorfizmleri ile HBV enfeksiyonu arasında ilişki bulamamamız nedeni ile bu çalışma ile uyumlu görülmemekte ancak IL-4'ün -1098 gen bölgesinin HBV ile ilişkisini göstermemiz HBV enfeksiyonlarında IL-4'ün önemli rolü olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda IL-4R α 'nın +1902 gen bölgesinde bulunan GG, GA ve AA genotiplerini değerlendirdiğimizde HBV enfeksiyonu ile anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Lin ve ark (123) IL-4R'nin Q576R gen bölgesindeki polimorfizmleri inceledikleri çalışmalarında HBV aşısı ile immünize edilen 183 çocuğu, anti-HBs düzeyleri ≥ 1000 mIU/mL ve 10-1000 mIU/mL olan iki gruba ayırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda AA genotipinde olan çocukların yüksek antikor titresine sahip olduklarını göstermişlerdir.

Literatürde IL-4R α polimorfizmlerinin HIV enfeksiyonu ile ilişkisini irdeleyen çalışmalar bulunmakla birlikte HBV enfeksiyonu ile ilişkisini gösteren az sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızda IL-4R α polimorfizmlerinin de araştırılmış olmasının bu konudaki açığın kapatılmasında önemli olacağını düşünmekteyiz (123).

Çalışmamızda **IL-12**'nin -1188 promotor gen bölgesinde bulunan A ve C allelleri ile AA, AC, CC genotiplerini değerlendirdiğimizde gruplar arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p= 0.060$ ve $p= 0.054$)

Arababadi ve ark (120) okült hepatit B'li 57 hasta ve sağlıklı 100 kontrolde IL-12'nin -1188 gen bölgesindeki polimorfizmleri incelemişlerdir. AA, AC, CC polimorfizmlerinde gruplar arasında sırası ile $p>0.90$, $p> 0.24$, $p< 0.033$ değerlerini elde etmişlerdir. Sonuç olarak sadece CC genotipinin okült hepatit B ile anlamlı bir ilişkisi olduğunu saptamışlar AA ve AC polimorfizmlerinde anlamlı ilişki gösterememişlerdir.

Liu ve ark (79) 869 hepatosellüler karsinomlu hasta ile 891 kanser bulunmayan kontrol grubunda IL-12A ve IL-12B sitokin gen polimorfizmlerini incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda IL-12A (rs568408) GA ya da AA genotiplerinin hepatosellüler karsinom gelişimi için risk oluşturduğunu bulmuşlardır ($p< 0.001$). IL-12A (rs2243115) TG, IL-12B (rs3212227) AC genotipi ile ilişki bulamamışlardır. IL-12 IFN- γ üretimi ve T lenfositlerine etkisi nedeniyle hücresel yanıtın önemli bir düzenleyicisidir. Hepatit tablosu gelişiminde hücresel yanıtın önemini düşündüğümüzde IL-2 gen polimorfizmlerinin HBV enfeksiyonu ile ilişkili olması beklenirken bizim sonuçlarımıza baktığımızda anlamlı ilişki bulamamamız oldukça ilgi çekicidir. Hasta sayımızın az olması bu sonuca ulaşmamıza

neden olmuş olabilir. Bu nedenle daha hassas sonuçlar elde edebilmemiz için daha fazla sayıda hasta üzerinde çalışılarak çalışmamızın verilerini güçlendirmemiz uygun olacaktır.

Çalışmamızda **IL-10**, -1082 gen bölgesinde GG genotipinde ve -819 gen bölgesinde CC genotipinde doğal bağışık grup lehine anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (sırası ile $p=0.015$, $p=0.023$). Yine -1082 gen bölgesinde GA genotipinde ve -819 gen bölgesinde CT genotipinde kronik aktif hepatitli grup lehine anlamlı ilişki bulunmuştur (sırası ile $p=0.014$, $p=0.012$).

Truelove ve ark(120) kronik HBV enfeksiyonu bulunan 45 hasta ve akut hastalıktan iyileşmiş 76 kontrolden oluşan 121 Afrikakökenli Amerikalı ve 179 kronik enfeksiyonlu hasta ile 313 iyileşmiş kontrolden oluşan 492 Avrupa kökenli Amerikalı'da yaptıkları çalışmada IL-10, IL-19 ve IL-20 sitokin gen bölgelerini incelemişlerdir. IL-10'un -1353, -1082, +954 gen bölgelerinde bulunan polimorfizmleri değerlendirdiklerinde Afrika kökenli Amerikalı'larda istatistiksel olarak anlamlı farklar bulmuşlardır. Bunlardan -1082 promotor gen bölgesinde A allelinde ($p=0.01$) ve AA genotipinde ($p=0.02$) anlamlı değerler elde etmişlerdir. Avrupa kökenli Amerikalı'larda ise IL-20 polimorfizmlerinin HBV enfeksiyonunu geçirerek iyileşen grupla ilişkili olduğunu bulmuşlardır ($p=0.01$). Bizim çalışmamızda da -1082 gen bölgesinde GG ve GA genotiplerinde HBV enfeksiyonu arasında ilişki bulmuş olmamız nedeni ile Truelove ve ark' nın çalışmasından farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Cheong ve ark (109) 72'si inaktif taşıyıcı, 261'i kronik hepatitli, 79'u sirozlu olmak üzere 412 Kore'li hasta ve 204 HBV enfeksiyonu geçirerek iyileşen sağlıklı kontrolde IL-10'un -1082, -819 ve -592 gen promoter bölgelerindeki polimorfizmleri incelemişlerdir. -592 promoter gen bölgesindeki CC genotipinde, HBV enfeksiyonu geçirerek iyileşen grup lehine olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı fark bulmuşlardır ($p=0.036$). Diğer polimorfizmler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamamışlardır.

Gao ve ark (114) HBV/HCV ile enfekte 203 kronik hasta ve 74 kontrolde yaptıkları bir araştırmada IL-10'un -1082 promotor gen bölgesinde bulunan AA genotipinin persistan HBV ve HCV enfeksiyonu gelişimi ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Ben-Ari ve ark (90) kronik HBV enfeksiyonu bulunan 77 hastada (HBV taşıyıcısı 46 hasta, dekompanse karaciğer nakli adayı 21 hasta ve hepatosellüler karsinomlu 10 hasta), akut HBV enfeksiyonu geçirerek iyileşen 48 hasta ve 10 sağlıklı kontrol ile yaptıkları çalışmada IL-10'un -1082, -819 ve -592 promoter gen bölgelerindeki sitokin gen

polimorfizmlerini incelemişler ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit etmemişlerdir.

Baştürk ve ark (118) son evre karaciğer yetmezliği bulunan 27 hasta, HBV taşıyıcısı 23 kişi ve 60 sağlıklı kontrolde yaptıkları çalışmada IL-10'un -1082 promotor gen bölgesindeki polimorfizmleri incelemişler ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır. Çalışmamız da GA ve GG genotiplerinin HBV enfeksiyonu ve doğal bağışıklığı ile ilişkili olduğunu bulduğumuz için Baştürk ve ark' nın çalışması ile paralellik göstermemektedir (sırası ile $p= 0.012$, $p= 0.010$).

Zhu ve ark (110) intrauterin HBV riski yüksek olan immün yetmezlikli 46 çocuk ile normal immün cevaba sahip olan 120 çocuk ve 127 kontrol grubunda yaptıkları çalışmada IL-10'un -1082 promotor gen bölgesini incelemişler ve G allellinin, HBV intrauterin enfeksiyonunu önleyici etkinlikte olduğunu göstermişlerdir. Bizim sonuçlarımız ise -1082 gen bölgesindeki polimorfizmin kronik HBV ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Sitokin genleri üzerindeki bu polimorfizmlerin, onların fonksiyonlarını olumlu ya da olumsuz etkileyebilecekleri yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda kuvvetle muhtemeldir. Mikroorganizmaya ait virulans faktörlerinin yanında konak faktörlerinin ve özellikle konak genetik polimorfizmlerinin hastalığın kliniğine olan etkileri kanıtlandığı takdirde, günümüzde kullanılmakta olan parametrelerle birlikte yeni tanı ve tedavi belirteçleri olarak kullanılması mümkün olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mart 2012- Şubat 2013 tarihleri arasında hepatit B virusu ile enfekte olduktan sonra iyileşen ve doğal bağışıklık gelişen 34 kişi ile akut enfeksiyon sonrasında kronik aktif hepatit gelişen 33 hastada PZR metodunu kullanarak sitokin gen polimorfizmlerini araştırdığımız çalışmada hastaların yaş ortalamaları 42,91 olarak saptanmıştır. Cinsiyete göre ayırımında ise kadın doğal bağışık grubun yaş ortalaması 39,23, erkeklerin 43,29 bulunurken kronik aktif hepatit hasta grubunda kadınların yaş ortalaması 37,28 ve erkeklerinki 49,78 olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızın sonucunda kronik aktif hepatitli hasta grubu ile doğal bağışık grup arasında **IL-1 α** (T at pos -889), (C at pos -889), **IFN- γ** (A at pos +874), **TGF- β 1** (C at Codon 10; G at Codon 25), (Tat Codon 10; G at Codon 25), **IL-2** (G at pos -330; T at pos +166), **IL-4** (G at pos -1098; C at pos -590), (T at pos -590; C at pos -33), (C at pos -590; C at pos -33), **IL-10** (A at pos -1082; C at pos -819), (A at pos -1082; C at pos -592) polimorfizmlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur. Genotipik olarak değerlendirildiğimizde ise IL-1 α 'nın -889 promotor gen bölgesinde bulunan CT genotipi (%73.4 ve %19.2, $p < 0.001$), IL-4'ün -1098 promotor gen bölgesinde bulunan GT genotipi (%66.7 ve %11.5, $p < 0.001$), IL-10'un -1082 promotor gen bölgesinde bulunan GA genotipi (%72.0 ve %45.7, $p = 0.014$), IL-10'un -819 promotor gen bölgesinde bulunan CT genotipi (%63.5 ve %31.3, $p = 0.023$) ve IFN- γ 'nın +874 gen bölgesinde bulunan TA genotipi kronik aktif hepatitli grupta doğal bağışık gruba göre daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Diğer taraftan IL-1 α 'nın -889 promotor gen bölgesinde bulunan CC genotipi (%65.4 ve %13.3, $p < 0.001$), IL-4'ün -1098 promotor gen bölgesinde bulunan TT genotipi (%73.1 ve %29.6, $p = 0.0015$), IL-10'un -1082 promotor gen bölgesinde bulunan GG genotipi (%22.9 ve %3.1, $p = 0.015$) ve IL-10'un -819 promotor gen bölgesinde bulunan CC genotipi (%59.3 ve %31.2, $p = 0.023$) doğal bağışık grupta kronik aktif hepatitli gruba göre daha yüksek oranda bulunmuştur. **IL-1 β** , **IL-1R**, **IL-1RA**, **IL-4R α** , **IL-12**, **IL-6**,

TNF- α sitokin polimorfizmlerinin ise gruplar arasında anlamlı farklılık göstermediği görülmüştür.

Sonuç olarak, yukarıda belirtilen sitokinlerin bir kısmında saptanan polimorfizmlerin akut HBV enfeksiyonunun tam şifa ile atlatılarak doğal bağışıklık gelişiminde oldukça önemli rolü olduğu, diğer taraftan da yine yukarıda belirtilen sitokin polimorfizmlerinin bir kısmının da hastalığın kronikleşmesine yatkınlık oluşturduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamız çok sayıda sitokinin birçok polimorfik bölgesini aynı anda incelediği için farklı bir önem taşımaktadır. Literatürü incelediğimizde sitokinlerin bir ya da birkaçının değerlendirildiği birçok çalışma bulmak mümkündür. Ancak aynı hasta grubunda bu kadar çok sayıda sitokinin bir arada değerlendirildiği çalışmalar bulunmamaktadır. Araştırma sırasında kullandığımız kit (Invitrogen, USA) ile yapılan literatürdeki diğer çalışmaları araştırdığımızda, kitin hasta gruplarında değil de rastgele toplumdan seçilen kişiler ile çalışılarak bölgesel polimorfizm haritalarının çıkarılmasında kullanıldıkları görülmüştür (126). Çalışmamızda çok sayıda sitokini aynı anda inceleyebilmemize rağmen kit maliyetinin yüksek olması nedeni ile 67 örnek ile çalışılabilmektedir. Gerekli kaynak sağlandığında çalışmamızın genişletilmesi mümkün olursa elde ettiğimiz sonuçların değeri daha da artacaktır.

Yeni yapılacak çalışmalarda bizim çalışmamıza farklı sitokinlerin polimorfizmlerinin de eklenmesi ile yeni değerli bulgulara ulaşılabilecektir. Literatürde HBV enfeksiyonu ve özellikle heptosellüler karsinomlu hastalarda IL-28B, IL-16 gibi farklı sitokinlerin polimorfizmlerini inceleyen yeni çalışmalar mevcuttur (127, 128).

Günümüzde hepatit C hastalarının tedaviye yanıtını önceden belirlemek amacı ile IL-28B polimorfizmi kullanılmaktadır. Hastaların sahip oldukları iyi ya da kötü genotipe göre ilaç tedavisi gerekip gerekmediği, gerekiyorsa ikili/üçlü tedavi seçenekleri düzenlenmekte olup, ayrıca interferon tedavisine verecekleri yanıtlar önceden tahmin edilebilmektedir. Hatta anti-viral ilaçların interferonlarla kombine edilmesi kararı bu genotipler dikkate alınarak verilmektedir (129). Bizim yaptığımız çalışma ile literatürdeki diğer çalışmaların hedefinde hepatit B tedavisi için de sitokin polimorfizmlerinin bu şekilde kullanımı mümkün kılmak vardır (130).

İleride Pan ve ark (131) çalışmasında olduğu gibi HBV aşısına karşı oluşan immün cevabı değerlendirmede de polimorfizmlerin kullanılması gündeme gelebilecektir.

Sitokinlerin aşılama çalışmalarında yol gösterici olarak kullanılması bilim adamlarının yeni hedefleri arasındadır.

Siroz ve hepatosellüler karsinom gelişim riski kronik hepatit B'li hastalar için oldukça önemlidir. Hastalığın seyrinin önceden tahmin edilmesi ve gerekli önlemlerin alınması hayat kurtarıcı olabilir. Çalışmamıza dahil ettiğimiz hastaları sirozlu ve hepatosellüler karsinomlu olarak gruplandırmamız mümkün olmamıştır. Ayrıca hastaların patolojik değerlendirme sonuçlarının tamamına ulaşamadığımız için karaciğer histolojisi ile sitokin polimorfizmlerinin ilişkisi değerlendirilememiştir. Daha sonraki çalışmalarımızda sirozlu ve hepatosellüler karsinomlu hastaların ayrıca değerlendirilerek sitokin gen polimorfizmlerinin gösterilmesi eğer varsa hastalık ilişkisinin ortaya konması, karaciğer histolojisininde birlikte değerlendirilmesi oldukça önemlidir ve bu hastaların takibinde daha güvenilir yeni parametrelerin bulunmasını sağlayacaktır.

Literatürde sitokinlerin serum seviyeleri ile polimorfizmlerini ilişkilendiren birçok çalışma mevcuttur. Çalışmamızda sitokinlerin polimorfizmleri saptanırken serum seviyelerinin tespiti yapılamamıştır. Sonraki adımda sitokinlerin serum seviyelerinin de birlikte incelenmesi, genotipik ve fenotipik olarak eş zamanlı değerlendirmelerin yapılabilmesine olanak sağlayacaktır. Ayrıca viral yük, karaciğer enzimleri gibi diğer parametrelerinde değerlendirilmesi oldukça önemli verilerin elde edilmesini mümkün kılacaktır.

Enfeksiyon hastalıklarının prognozunun belirlenmesinde konak faktörlerinin önemini bilmekteyiz. Bu konak faktörleri içinde genlerimiz ve bu genlere ait mutasyonlar, polimorfizmler oldukça önemlidir. Bireye ait kişisel farklılıkları oluşturan polimorfizmler son yıllarda en çok ilgi duyulan konular arasındadır. Hepatit tablosu gelişiminde başlıca rolü oynayan sitokinler hastalığın prognozunun şekillenmesinde oldukça etkilidirler. Bizim çalışmamız da sitokin gen polimorfizmlerini inceleyen ve HBV enfeksiyonu ile ilişkilerini araştıran önemli bir çalışmadır. Gelecekte sitokin gen polimorfizmlerinin birçok hastalığın önleminde, tanıda ve tedavi takibinde kullanılacak çok önemli belirteçler olacağı muhakkaktır. Çalışmamızın da bu gelişmelere zemin oluşturacağını umut ediyoruz.

7. ÖZET

KRONİK AKTİF HEPATİT B ENFEKSİYONU OLAN HASTALAR İLE HEPATİT B VİRÜSÜNE KARŞI DOĞAL BAĞIŞIKLIK GELİŞTİREN BİREYLERİN SİTOKİN GEN POLİMORFİZMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Hepatit B virusunun kronik enfeksiyon oluşturmamasının nedenleri bilinmemektedir ancak muhtemelen bu durum konak immün faktörleri ile ilişkilidir. Bunlardan sitokinler immün yanıtta önemli bir rol oynamaktadır.

Bu çalışma, HBV enfeksiyonu ve interlökin (IL)-1 α , IL-1 β , interlökin-1 reseptör (IL-1R), interlökin-1 reseptör antagonist (IL1-RN), IL-4 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, interferon (IFN)- γ , tümör gelişim faktörü (TGF)- β , tümör nekrozis faktör (TNF)- α gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırmak amacı ile yapılmıştır.

Çalışma, kronik HBV enfeksiyonu bulunan 33 hasta ve HBV enfeksiyonundan iyileşerek doğal bağışıklık geliştiren 34 sağlıklı kişiye ait toplam 67 kişinin periferik kanından elde edilen mononükleer hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Sitokin genotipleri polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı ticari bir kit (Invitrogen, USA) kullanılarak belirlenmiştir.

Kronik HBV enfeksiyonu bulunan grupta doğal bağışıklık geliştiren gruba göre, IL-1 α 'nın -889 promotor gen bölgesinde bulunan CT genotipi (%73.4 ve %19.2, $p=0.000044$), IL-4'ün -1098 promotor gen bölgesinde bulunan GT genotipi (%66.7 ve %11.5, $p=0.001328$), IL-10'un -1082 promotor gen bölgesinde bulunan GA genotipi (%72.0 ve %45.7, $p=0.014$), IL-10'un -819 promotor gen bölgesinde bulunan CT genotipi (%63.5 ve %31.3, $p=0.023$) ve IFN- γ 'nın +874 gen bölgesinde bulunan TA genotipi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Diğer taraftan, IL-1 α 'nın -889 promotor gen bölgesinde bulunan CC genotipi (%65.4 ve %13.3, $p=0.0003579$), IL-4'ün -1098 promotor gen bölgesinde bulunan TT genotipi (%73.1 ve %29.6, $p=0.0015$), IL-10'un -1082 promotor gen bölgesinde bulunan GG genotipi (%22.9 ve %3.1, $p=0.015$) ve IL-10'un -819 promotor gen bölgesinde bulunan CC genotipi (%59.3 ve %31.2, $p=0.023$) doğal bağışıklık geliştiren grupta kronik HBV enfeksiyonu bulunan gruba göre istatistiksel olarak daha yüksek oranda bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışmada araştırılan on üç sitokinden IL-1 α , IL-4, IL-10 ve IFN- γ 'nın promotor gen bölgelerindeki polimorfizmlerin HBV enfeksiyonunun seyri ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Bu sitokinlerdeki polimorfizmlerin ortaya konmasının HBV ile enfekte olan bireylerin iyileşerek enfeksiyona karşı doğal bağışıklık mı geliştireceği veya enfeksiyonun kronikleşmesi ile mi sonuçlanacağını tespitinde önemli belirteçler olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

8. SUMMARY

COMPARISON OF CYTOKINE GENE POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH CHRONIC ACTIVE HEPATITIS B INFECTION AND THOSE IN INDIVIDUALS DEVELOPED PROTECTIVE IMMUNITY TO HEPATITIS B VIRUS

The reasons for the viral persistence of hepatitis B virus (HBV) infection are unknown, but are probably related to host immune factors. Among these, cytokines play a significant role in immune defense.

The present study was undertaken to investigate the association between HBV infection and polymorphisms of interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-1 receptor (IL-1R), IL-1 receptor antagonist (IL-1RN), IL-4 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, interferon (IFN)- γ , transforming growth factor (TGF)- β , tumor necrosis factor (TNF)- α genes.

The study was performed with peripheral blood mononuclear cells obtained from a total of 67 subjects, 33 with chronic HBV infection, and 34 healthy individuals with protective immunity who recovered from HBV infection. Cytokine genotypes were determined using a polymerase chain reaction-based commercial kit (Invitrogen, USA).

The frequency of CT genotype at position -889 of IL-1 α gene promoter region (73.4% vs. 19.2%, $p=0.000044$), GT genotype at position -1098 of IL-4 gene promoter region (66.7% vs. 11.5%, $p=0.001328$), GA genotype at position -1082 of IL-10 gene promoter region (72.0% vs. 45.7%, $p=0.014$), CT genotype at position -819 of IL-10 gene promoter region (63.5% vs. 31.3%, $p=0.023$) and TA genotype at position +874 of IFN- γ gene were statistically higher in the chronic HBV group than those of HBV infection recovered group. In addition, the frequency of CC genotype at position -889 of IL-1 α gene promoter region (65.4% vs. 13.3%, $p=0.0003579$), TT genotype at position -1098 of IL-4 gene promoter region (73.1% vs. 29.6%, $p=0.0015$), GG genotype at position -1082 of IL-10 gene promoter region (22.9% vs. 3.1%, $p=0.015$), and CC genotype at position -819 of IL-10 gene promoter region (59.3% vs. 31.2%, $p=0.023$) were significantly higher in the chronic HBV group than those of HBV infection recovered group.

In conclusion, among thirteen cytokines that were investigated in this study, polymorphisms in the promoter regions of IL-1 α , IL-4, IL-10 and IFN- γ were found to be associated with the prognosis of the HBV infection. Determination of these polymorphisms could be used to predict whether the individuals infected with HBV will develop a protective immunity or end up with a chronic infection.

9. KAYNAKLAR

1. Özacar T: Hepatit B Virüsü, “Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi” içinde, Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (Ed.), Üçüncü baskı. Nobel Tıp Kitabevi, Bursa, 2008, s. 1882-1904.
2. Nebbia G, Peppia D, Maini MK: Hepatitis B infection: current concepts and future challenges. QJM: An International Journal of Medicine. 105(2): 109-113, 2012.
3. Toy M, Önder FO, Wörmann T, Bozdayı AM, Schalm SW, Borsboom GJ, van Rosmalen J, Richardus JH, Yurdaydin C: Age-and region-specific hepatitis B prevalence in Turkey estimated using generalized linear mixed models: a systematic review. BMC Infectious Diseases. 12(11): 337, 2011.
4. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. Roitt’s Temel İmmünoloji. İlman MN, Yıldız M (Ed.), Atlas kitapçılık, 11. Baskı, Ankara, 2008, s. 185-210.
5. Zhang G, Li Z, Han Q, Li N, Zhu Q, Li F, Lv Y, Chen J, Liu Z: Altered TNF- α and IFN γ levels associated with PD1 but not TNFA polymorphisms in patient with chronic HBV infection. Infection, Genetic and Evolution. 11: 1624-1630, 2011.
6. Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D: Principles Medical Genetics. Williams&Wilkins, Baltimore, USA, 1998.
7. Zhang TC, Pan FM at al: A meta-analysis of the relation of polymorphism at sites-1082 and -592 of the IL-10 gene promoter with susceptibility and clearance to persistent hepatitis B virus infection in the Chines population. Infection, 39: 21-27, 2011.
8. Mahoney FJ: Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. Journal of Clinical Microbiology. 12: 351–366, 1999.
9. Horvat RT, Tegtmeier GE: Hepatit B ve D Virüsları, Murray RP, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (Eds.): “Klinik Mikrobiyoloji” içinde, Atlas Kitapçılık, Ankara, 2009, s. 1641-1659.
10. Kıyan M. Viroloji. HBV enfeksiyonu epidemiyolojisi. K. Kılıçturgay (Ed.). “Viral Hepatit 98” içinde. 1998, s. 66-94.

11. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S: A "new" antigen in leukemia sera. *The Journal of American Medical Association*. 191: 541-546, 1965.
12. Badur S: Viral Hepatitler (HAV, HBV, HDV). Ustaçelebi Ő, Abacioğlu H, Badur S (Ed.): *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*, Birinci baskı. Gneő Kitabevi, İstanbul, 2004, s. 175-202.
13. Strauss JH, Strauss EG: *Viruses and Human Disease*. 2nd ed. Academic Press, London, 2008, pp. 249-257.
14. Mangisa NP, Smuts HE, Kramvis A. et al: Molecular characterization of duck hepatitis B virus isolates from South African ducks. *Virus Genes*. 28(2): 179-186, 2004.
15. World Health Organization, Department of Communicable Diseases Surveillance and Response. WHO/CDS/CSR/LYO/20002.2:Hepatitis.<http://www.who.int/emc>
16. Schaer S, Tolle T, Lottman S, Gerlich WH: Animal models and experimental systems in hepatitis B virus. In Koshy R, Caselmann WH (Eds.): *Hepatitis B Virus, Molecular Mechanism in Disease and Novel Strategies For Therapy*, Imperial College, London, 1999, pp. 51-75.
17. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA: *Tıbbi Mikrobiyoloji*. 6th ed. (ev. AC Baőustaođlu), Atlas Kitapılık Tic. Ltd. Őti. Ankara, 2010, pp. 645-659.
18. Ganem D: Hepadnaviridae and their replication. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Eds.): *Fields Virology*. 3rd ed. Lippincott-Raven Press, Philadelphia, 1996, pp. 2703-2737.
19. Yenen OŐ: Viral Hepatitler. Topçu AW, Syletir G, Doğanay M (Ed.): "İnfeksiyon Hastalıkları" içinde, Birinci Baskı. Nobel Kitabevi, İstanbul, 1996, s. 641-700.
20. Robinson WS: Hepadnaviridae and their replication. In Fields BN, Knipe DM (Eds.): *Fundamental Virology*, 2nd ed. Raven Press, New York, 1991, pp. 989-1021.
21. <http://www.hepatitisbviruspage.com/hbvparts.htm>
22. Bernard N.F, David M.K (Eds.) *Hepadnaviridae: Fundamental Virology*, 2th ed. Raven Press, New York, 1990, pp. 989-1024.
23. Seeger C, Mason WS: Hepatitis B virus biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(1): 51-68, 2000.
24. Lee WM: Hepatitis B. *Clinics in Liver Disease*. 3(2): 179-428, 1999.
25. Bilgi A, zacar T: Hepatit B ve D virusları, Ustaelebi Ő (Ed.): "Temel ve Klinik Mikrobiyoloji" içinde, Birinci baskı. Gneő Kitabevi, Ankara, 1999; s. 871-880.

26. Fung J, Lai CL, Yuen MF: Hepatitis B and C virus-related carcinogenesis. *Clinical Microbiology And Infection*. 15: 964–970, 2009.
27. Yim HJ, Lok ASF: Natural history of chronic hepatitis B virus infection: What we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology*, 43(2), 173-181, 2006.
28. <http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html>
29. Echevarría JM, Avellón A: Hepatitis B virus genetic diversity. *Journal of Medical Virology*. 78: 36-42, 2006.
30. Robinson WS: Hepatitis B virus and hepatitis D virus. In Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (Eds.): *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4th ed. Churchill Livingstone, New York, 1995, pp. 1406-1439.
31. Thiollais P, Pourcel C, Dejean A: The hepatitis B virus. *Nature*. 317: 489-495, 1985.
32. Serter D: Hepatit virüsleri ve viral hepatitler. “Virus, Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları” içinde, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1997, 175-206.
33. Vyas GN, Yen TSB: Hepatitis B virus-Biology, pathogenesis, epidemiology, clinical description and diagnosis. In *Viral Hepatitis-Diagnosis, Therapy and prevention*, Humana Press, New Jersey, 1999, p. 35.
34. Wang GH, Seeger C: The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* 71: 663–670, 1992.
35. Andrisani OM, Barnabas S: The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *International Journal of Oncology*. 15(2): 373-379, 1999.
36. <http://www.hepatitisbannual.org>
37. Jeong JK, Yoon GS, Ryu WS: Evidence that 5'-end cap structure is essential for encapsidation of hepatitis B virus pregenomic RNA. *Journal of Virology*. 74(12): 5502-5508, 2000.
38. Knutsson M, Kidd-Ljunggren K: Urine from chronic hepatitis B virus carriers: implication for infectivity. *Journal of Clinical Virology*. 60(1): 17-20, 2000.
39. www.cdc.gov
40. Sawai H, et al: No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Medical Genetics*, 2012, <http://www.biomedcentral.com>.

41. Beasley RP: Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 61: 1942-1956, 1988.
42. Toy M, Önder FO, Wörmann T, Bozdayi AM, Schalm SW, Borsboom GJ, van Rosmalen J, Richardus JH, Yurdaydin C: Age- and region-specific hepatitis B prevalence in Turkey estimated using generalized linear mixed models: a systematic review. *BMC Infectious Diseases*. 12(11): 337, 2011.
43. Sırmatel F, Güleç N, Baydar İ, Karaoglu İ: Gaziantep bölgesinde HBV antijen ve antikör taşıyıcılığının yaş gruplarına göre dağılımı. III. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu Program ve Kongre Kitabı, İstanbul, 1996, s.17.
44. Van Hecke E, Paradijs J, Molitor J at al: Hepatitis B virus spesifik cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute and chronic Hepatits B virus infection. *Journal of Hepatology*. 20: 514-523, 1994.
45. Huo TI, Wu JC, Lee PC at al: Sero-clearance of hepatitis B virus surfaca antigen in chronic carriers does not necessarily imply a good prognosis. *Hepatology*. 28: 231-236, 1998.
46. Hatashi N, Mita E: Involvement of Fas system-mediated apoptosis in pathogenesis of viral hepatitis. *Journal of Viral Hepatitis*. 6: 357-365, 1999.
47. Chu CM, Yeh CT, Liaw YF: Low-level viremia and intracellular expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in HBsAg carriers with concurrent hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 36, 2084-2086, 1998.
48. Suk A, Lok F: Hepatitis B infection: pathogenesis and managemen. *Journal of Hepatology*. 32: 89-97, 2000.
49. Değertekin H, Kendal Y: Akut Viral Hepatitler, Tözün N, Şimşek H, Özkan H, Şimşek İ, Göran A (Ed.): “Klinik Gastroenteroloji ve Hepatoloji” içinde, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, 2007, s. 381-393.
50. Lee WM: Hepatitis B virus infection. *New England Journal of Medicine*. 337(24): 1733-1745, 1997.
51. Terrault NA, Wright TL: Viral hepatitis A through G. In Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH (Eds.): *Sleisenger&Fordtran’s Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*, W.B. Saunders Company, New York, 1998, pp. 1123-1155.
52. Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G: Occult hepatitis B infection. *Journal of Hepatology*. 46: 160-170, 2007.
53. Hollinger FB: Hepatitis B virus. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Eds.): *Fields Virology*, 3th ed. Lippincott-Raven Press, Philadelphia, 1996, p.2738.

54. European Consensus Group on Hepatitis B Immunity. Are booster immunisations needed for lifelong Hepatitis B immunity? *Lancet*, 355, 561-565, 2000.
55. Bowden S: Laboratory diagnosis of hepatitis B infection. In Lia CL, Locarnini S.(Eds.): *Hepatitis B virus*, International Medical Press, London, 2002, pp. 145-159.
56. Lunn ER, Hoggarth BJ, CookWJ: Prolonged hepatitis B surface antigenemia after vaccination. *Pediatrics*. 105(6): E81, 2000.
57. Viral Hepatit Savaşım Derneği. Viral Hepatit Tanı ve Tedavi Konsensus Toplantısı Raporu, Antalya, 2005, s. 11-17.
58. Decker RH: Diagnosis. In Zuckerman AJ, Thomas HC (Eds.): *Viral Hepatitis-scientific basis and clinical management*. Churchill Livingstone, New York, 1993, pp.165-184.
59. Chen WN, Oon CJ, Koh S: Horizontal transmission of a hepatitis B virus surface antigen mutant. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 938-939, 2000.
60. Pawlotsky JM: Hepatitis B virus (HBV) DNA assays (methods and practical use) and viral kinetics. *Journal of Hepatology*. 39: 31-35, 2003.
61. Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, Dawson P, Heermann K, Heath A: An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang*. 80: 63-71, 2001.
62. Bowden S: New directions in molecular diagnostic for hepatitis B: serum and tissue-based diagnostics. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 19: 11-13, 2004.
63. O'Brien C, Moonka D: Antiviral chemotherapy for viral hepatitis. In Specter S (Ed.): *Viral hepatitis-diagnosis, therapy, and prevention*. Humana Press, New Jersey, 1999, p. 251.
64. Malik AH, Lee WM: Chronic hepatitis B virus infection: treatment strategies for the next millennium. *Annals of Internal Medicine*. 132(9): 723-731, 2000.
65. Krastev ZA: The "return" of hepatitis B. *World Journal of Gastroenterology*. 12: 7081-7086, 2006.
66. Liaw YF: Impact of therapy on the outcome of chronic hepatitis B. *Liver International*. 33(1): 111-115, 2013.
67. Leblebicioğlu H: Kronik Hepatit B Tedavi Rehberlerinin Gözden Geçirilmesi, Tabak F, Tosun S (Eds): "Viral Hepatit 2013" içinde, Birinci baskı. İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2013; s. 303-307.

68. Tosun S: Hepatit B Aşılması ve Ülkemizde Hepatit Aşılaması Sonuçları, Tabak F, Tosun S (Eds): "Viral Hepatit 2013" içinde, Birinci baskı. İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2013; s. 415-437).
69. Kılıçturgay K: İmmunoloji. Üçüncü baskı. Nobel Güneş Kitabevi, Bursa, 2003, s.113-153.
70. Dinarello CA: Proinflammatory cytokines.Chest, 118(2): 503-508, 2000.
71. Özbal Y: Temel immunoloji. Birinci baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa, 1994, s.103-113.
72. Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C: Cytokines. In Stites DP, Terr AI (Eds.): Basic and Clinical Immunology, 8th ed. Connecticut California,1994, pp. 105-123.
73. Brignola C, Belloli C, Ardizzone S, Astegiano M, Cottone M, Trallori G: The relationship between heritability and smoking habits in Crohn's disease, American Journal of Gastroenterology. 95, 3171-3175, 2000.
74. Arend WP: The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. Cytokine Growth Factor Reviews. 13(4-5): 323-340, 2002.
75. Erganiş O, İstanbulluoğlu E: İmmunoloji. Mimoza Yayınevi, Konya, 1993, s. 79-92.
76. Galun E, Rose-John S: The regenerative activity of interleukin-6. Methods in Molecular Biology. 982: 59-77, 2013.
77. Nororiha IL, NiemirZ, Stein H, Waldher R: Cytokines and growth factors in renal disease. Nephrol Dial Transplant. 10: 775-786, 1995.
78. Baggiolini M, Dewald B, Moser B: Human chemokines: an update. Annual Review of Immunology. 15: 675-700, 1997.
79. Abul KA, Lichtman AH: Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Saunders, 2003, pp. 243-275.
80. Strachan T: Human Molecular genetics. 3th ed. Garland Science/Taylor & Francis Group, 2003, pp.262-263, p.267, p.317, p.10-11, pp.13-26, pp. 488-497.
81. Risch NJ: Searching for genetic determinants in the new millennium. Nature; 405: 847-856, 2000.
82. Ussbaum RL, McInnes RR, Willard HF: Thompson and Thompson Genetics In Medicine. 7th ed. Elsevier, Philadelphia, 2007, pp. 8-33, pp. 175-184, pp. 461-468.
83. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfonso S: Cytokine gene

polymorphism in human disease: on-line databases. sitokin ekspresyon Genes and Immunity. 1(1): 3-19, 1999.

84. Gersen SL, Keagle MB: The Principles of Clinical Cytogenetics. 2nd ed. Humana Press Inc, New Jersey, 2005, pp.1-15, pp. 323-330.
85. Meerbach A, Gruhn B, Egerer R, Reischl U, Zintl F, Wutzler P: Semiquantitative PCR analysis of Epstein-Barr virus DNA in clinical samples of patients with EBV-associated diseases. Journal of Medical Virology. 65(2):348-57, 2001.
86. Peicher MR, Antonarakis SE, Motulsky AG: Vogel and Motulsky's Human Genetics. 4th ed. Springer, New York, 2010, pp. 44-47.
87. Kakumu S, Yata K, Kashio T: Immunoregulatory T-cell function in acute and chronic liver disease: Gastroenterology. 79: 613-619, 1980.
88. Halson RG, Hoofnagle JH, Minuk GY, et al: Cell-mediated immunity to hepatitis B surface antigen in man. Clinical & Experimental Immunology. 57: 257-264, 1984.
89. Saltoğlu N, Çetiner S, Taşova Y, Güler Ö, Alpaslan N, Dündar H: Hepatit B virus ile bazı immun parametrelerinin ilişkisinin değerlendirilmesi. Viral Hepatit Dergisi. 1: 16-21, 1998.
90. Ben-Ari Z, Mor E, Papo O, et al: Cytokine genopolymorphisms in patients infected with hepatitis B virus. The American Journal of Gastroenterology. 98(1): 144- 150, 2003.
91. Wai CT, Fontana RJ. Cytokine gene polymorphisms in chronic hepatitis B. A step up the immunology ladder. The American Journal of Gastroenterology. 98(1): 6-8, 2003.
92. Kocabaş E, Aksaray N, Yıldızdaş D, Özbek S, Şeydaoğlu G: Akut viral hepatitte serum tümör nekroze edici faktör-alfa (TNF- α), interlekin-1 beta (IL-1 β) ve interferon-gama (IFN- γ) düzeyleri. Viral Hepatit Dergisi, 1: 59-62, 1998.
93. Javan B, Kalani M.R, Khosravi A, Shahbazi M: Polymorphisms of interleukin-1 alpha genes in patients with Chronic Hepatitis B (The first report of relationship). The Cell. 12(1): 75-76, 2010.
94. Mehmedovic A, Mesihovic R, Prnjavorac B, Vanis N, Vukobrat-Bijedic Z, Borovac N, ZubcevicN, Pilav A, Gornjakovic S, Kulo-Cesic A, Mujaric E, Saray A: Non-invasive liver fibrosis markers: use of serum levels of cytokines IL 1 α and TGF β 1 in management of chronic liver diseases. Medicinski Glasnik (Zenica). 10(1): 20-27, 2013.

95. Yildiz SH, Ozdemir Erdogan M, Artan S, Solak M, Yaman M, Ozbabalik BD, Arikan Terzi ES: Association of Alzheimer's Disease With APOE and IL-1 α Gene Polymorphisms. *American Journal of Alzheimers Disorder Other Dementias*. 2012.
96. Kaarvatn MH, Jotanovic Z, Mihelic R, Etokebe GE, Mulac-Jericevic B, Tijanic T, Balen S, Sestan B, Dembic Z: Associations of the interleukin-1 gene locus polymorphisms with risk to hip and knee osteoarthritis: gender and subpopulation differences. *Scandinavian Journal of Immunology*. 77(2): 151-161, 2013.
97. Braosi AP, de Souza CM, Luczyszyn SM, Dirschnabel AJ, Claudino M, Olandoski M, Probst CM, Garlet GP, Pecoits-Filho R, Trevilatto PC: Analysis of IL1 gene polymorphisms and transcript levels in periodontal and chronic kidney disease. *Cytokine*. 60(1):76-82, 2012.
98. Olsson S, Holmegaard L, Jood K, Sjögren M, Engström G, Lökvist H, Blomstrand C, Norrving B, Melander O, Lindgren A, Jern C: Genetic variation within the interleukin-1 gene cluster and ischemic stroke. *Stroke*. 43(9):2278-2282, 2012.
99. Zhang PA, Li Y, Xu P, Wu JM: Polymorphisms of interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist genes in patients with chronic hepatitis B. *World Journal of Gastroenterology*. 10(12): 1826-1829, 2004.
100. Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M, Abiru S, Ueki T, et al. : Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection-association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 42: 505-510, 2005.
101. Saxena R, Chawla YK, Verma I, Kaur J: Interleukin-1 polymorphism and expression in hepatitis B virus-mediated disease outcome in India. *Journal of Interferon&Cytokine Research*. 33(2): 80-89, 2013.
102. Sarial S, Shokrgozar MA, Amirzargar A, Shokri F, Radfar J, Zohrevand P, Arjang Z, Sahraian MA, Lotfi J: IL-1, IL-1R and TNFalpha gene polymorphisms in Iranian patients with multiple sclerosis. *Iran Journal of Allergy Asthma Immunology*. 7(1): 37-40, 2008.
103. Abazis-Stamboulieh D, Oikonomou P, Papadoulis N, Panayiotidis P, Vrakidou E, Tsezou A: Association of interleukin-1A, interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms with multiple myeloma. *Leukemia&Lymphoma*. 48(11): 2196-2203, 2007.
104. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>
105. Kao PC, Wu JF, Ni YH, Lin YT, Chen HL, Hsu SH, Hsu HY, Chang MH: Tumour necrosis factor- α promoter region polymorphisms affect the course of spontaneous HBsAg clearance. *Liver International*. 30(10), 1448-1453, 2010.

106. Takakura M, Tokushige K, Matsushita N, Hashimoto E, Shiratori K: Possible involvement of cytokine gene polymorphisms in fulminant hepatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 22(8): 1271-1277, 2007.
107. Xia Q, Zhou L, Liu D, Chen Z, Chen F: Relationship between TNF- α Gene Promoter Polymorphisms and Outcomes of Hepatitis B Virus Infections: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 6(5):19606, 2011.
108. Yang Y, Luo C, Feng R, Bi S: The TNF- α , IL-1 β and IL-10 polymorphisms and risk for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Journal of Cancer Research Clinical Oncology*. 137: 947-952, 2011.
109. Cheong JY, Cho SW, Hwang IL, Yoon SK, Lee JH, Park CS, Lee JE, Hahm KB, Kim JH: Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 21(7): 1163-1169, 2006.
110. Zhu QR, Ge YL, Gu SQ, Yu H, Wang JS, Gu XH, Fei LE, Dong ZQ: Relationship between cytokines gene polymorphism and susceptibility to hepatitis B virus intrauterine infection. *Chinese Medical Journal*. 118(19): 1604-1609, 2005.
111. Akkiz H, Bayram S, Bekar A, Ozdil B, Akgöllü E, Sümbül AT, Demiryürek H, Doran F: G-308A TNF-alpha polymorphism is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma in the Turkish population: case-control study. *Cancer Epidemiology*. 33(3-4): 261-264, 2009.
112. Ribeiro CS, Visentainer JE, Moliterno RA: Association of cytokine genetic polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, 102(4): 435-440, 2007.
113. Zheng MH, Xiao DD, Lin XF, Wu SJ, Peng MM, Yu XY, Liu WY, Li LF, Shi KQ, Fan YC, Chen YP: The tumour necrosis factor-a-238A allele increases the risk of chronic HBV infection in European populations. *Journal of Viral Hepatitis*. 19(2): 11-17, 2012.
114. Migita K, Maeda Y, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Miyazoe S, Nakao K, Yatsuhashi H, Eguchi K, Ishibashi H: Polymorphisms of interleukin-1beta in Japanese patients with hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatol*. 46(3): 381-386, 2007.
115. Park BL, Lee HS, Kim YJ, Kim JY, Jung JH, Kim LH, et al. : Association between interleukin 6 promoter variants and chronic hepatitis B progression. *Exp Mol Med*. 35: 76-82, 2003.

116. Fabris C, Toniutto P, Bitetto D, Fattovich G, Falletti E, Fontanini E, Cussigh A, Minisini R, Occhino G, Pirisi M: Gene polymorphism at the interleukin 6 -174 G>C locus affects the outcome of chronic hepatitis B. *The Journal of infection*. 59(2), 144-145, 2009.
117. Wu XD, Zeng K, Gong CS, Chen J, Chen YQ: Transforming growth factor- β genetic polymorphisms on development of liver cirrhosis in a meta-analysis. *Molecular Biology Reports*. 40(1): 535-543, 2013.
118. Basturk B, Karasu Z, Kilic M, Ulukaya S, Boyacioglu S, Oral B: Association of TNF-alpha -308 polymorphism with the outcome of hepatitis B virus infection in Turkey. *Infection, Genetics and Evolution*. 8(1): 20-25, 2008.
119. Gao QJ, Liu DW, Zhang SY, Jia M, Wang LM, Wu LH, Wang SY, Tong LX: Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*. 28;15(44): 5610-5619, 2009.
120. Arababadi MK, Pourfathollah AA, Jafarzadeh A, Hassanshahi G, Daneshmandi S, Shamsizadeh A, Kennedy D: Non-association of IL-12 +1188 and IFN- γ +874 polymorphisms with cytokines serum level in occult HBV infected patients. *Saudi Journal of Gastroenterology*. 17(1): 30-35, 2011.
121. Zhang PA, Wu JM, Li Y: Relationship between genetic polymorphisms of Interferon-gamma gene intron 1 +874 site and susceptibility of hepatitis B virus infection. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 27(1): 41-43, 2006.
122. Gao QJ, Liu DW, Zhang SY, Wu LH, Jia M: Relations between IL-2-330 polymorphisms and the outcome of hepatitis B and/or hepatitis C virus infection. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 31(9): 1041-1045, 2010.
123. Lin YJ, Lan YC, Huang YC, Lin TH, Huang SM, Lai CC, Liu CS, Lin CW, Chen SY, Tsai FJ: Effects of cytokine and cytokine receptor gene variation on high anti-HB titers: following up on Taiwan's neonatal hepatitis B immunization program. *Clinica Chimica Acta*. 413(15-16): 1194-1198, 2012.
124. Soriano A, Lozano F, Oliva H, García F, Nomdedéu M, De Lazzari E, Rodríguez C, Barrasa A, Lorenzo JI, Del Romero J, Plana M, Miró JM, Gatell JM, Vives J, Gallart T: Polymorphisms in the interleukin-4 receptor alpha chain gene influence susceptibility to HIV-1 infection and its progression to AIDS. *Immunogenetics*. 57(9): 644-54, 2005.
125. Truelove AL, Oleksyk TK, Shrestha S, Thio CL, Goedert JJ, Donfield SM, Kirk GD, Thomas DL, O'Brien SJ, Smith MW: Evaluation of IL10, IL19 and IL20 gene polymorphisms and chronic hepatitis B infection outcome. *International Journal of Immunogenetics*. 35(3): 255-264, 2008.

126. Javor J, Bucova M, Ferencik S, Grosse-Wilde H, Buc M: Single nucleotide polymorphisms of cytokine genes in the healthy Slovak population. *International Journal of Immunogenetics*. 34, 273–280, 2007.
127. Li W, Jiang Y, Jin Q, Shi X, Jin J, Gao Y, Pan Y, Zhang H, Jiang J, Niu J: Expression and gene polymorphisms of interleukin 28B and hepatitis Bvirus infection in a Chinese Han population. *Liver International*. 31(8), 1118-1126, 2011.
128. Li S, Deng Y, Chen ZP, Huang S, Liao XC, Lin LW, Huang L, Peng T, Qin X, Zhao J: Genetic polymorphism of interleukin-16 influences susceptibility to HBV related hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Infection, Genetics and Evolution*. 11, 2083–2088, 2011.
129. Ersöz G: Hepatit C İnfeksiyonu Tedavisinde Konakla İlgili Faktörler, IL28B Polimorfizmi. *ANKEM Dergisi*. 26(Ek 2): 144-149, 2012.
130. Wang S, Huang D, Sun S, Ma W, Zhen Q: Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis B to interferon alfa. *Virology Journal*. 20(8): 28, 2011.
131. Pan LP ve arkadaşları: CD3Z Genetic Polymorphism in Immune Response to Hepatitis B Vaccination in Two Independent Chinese Populations. www.plosone.org.