

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

**Kronik Hepatitis B Virüsü (HBV) Enfeksiyonu Olan ve HBV'ye  
Karşı Doğal Bağışık Bireylerde *Stimulator of Interferon Genes*  
(STING) Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Bünyamin KASAP**

**TRABZON – 2017**

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

**Kronik Hepatitis B Virüsü (HBV) Enfeksiyonu Olan ve HBV'ye  
Karşı Doğal Bağışık Bireylerde *Stimulator of Interferon Genes*  
(STING) Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Bünyamin KASAP**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA**

**TRABZON – 2017**

## ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim boyunca tecrübelerini benimle paylaşan, zorluklarla mücadele etmeyi öğreten, branşımızı tüm platformlarda temsil edip hak ettiği yere gelmesinde büyük rol oynayan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Faruk AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Akademik hayatımda büyük katkıları olan, tez çalışmamın her aşamasında sabırla ve özveriyle destek olan, yoluma ışık tutan danışmanım Sayın Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince yetişmemde emekleri geçen, benden yardım ve desteklerini esirgemeyen, bilgi, birikim ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. A.Osman KILIÇ'a, Sayın Prof. Dr. İlknur TOSUN'a, Sayın Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU'na, Sayın Doç. Dr. C.Kurtuluş BURUK'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Esra ÖZKAYA'ya ayrı ayrı teşekkür ederim.

Örneklerin toplanmasında yardımlarını esirgemeyen KTÜ Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof Dr. Orhan ÖZGÜR'e teşekkür ederim.

Birlikte mutlu ve uyumlu bir şekilde çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve tüm Mikrobiyoloji Laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu günüme kadar büyütüp yetiştiren, ellerinden gelen tüm imkanları seferber edip hayatımdaki tüm kazanımlarımın gizli mimarları olan, maddi manevi tüm desteklerini ve sevgilerini benden esirgemeyen sevgili anneme, babama, kardeşlerime sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Varlıklarını bir nimet olarak gördüğüm, bana her zaman güç veren sevgili eşime ve canım kızlarıma bu zorlu süreçte gösterdikleri sabır ve anlayış için teşekkür ederim.

Dr. Bünyamin KASAP

Trabzon, 2017

## ÖZET

### **Kronik Hepatitis B Virüsü (HBV) Enfeksiyonu Olan ve HBV'ye Karşı Doğal Bağışık Bireylerde *Stimulator of Interferon Genes* (STING) Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması**

Tüm dünyada yaklaşık 350-400 milyon kişinin kronik olarak enfekte olduğu ve her yıl yaklaşık bir milyon kişinin de HBV ile ilişkili hastalıklardan dolayı hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir. Enfeksiyonun kronikleşmesinde virüse ve konağa ait faktörlerin özellikle de konağın bağışıklık sisteminin rol oynadığı ileri sürülmektedir. Stimulator of Interferon Genes (STING) hücre içindeki DNA varlığını algılayan, bir dizi ikinci haberci kullanıp özgül transkripsiyon faktörlerini aktive eden, buna bağlı olarak interferon (IFN) alfa, IFN beta, tümör nekroz faktörü (TNF) alfa ve interleukin (IL)-6 gibi sitokinlerin sentezini arttıran bir "patern tanıma reseptörü (PRR)" üyesi olup, HBV'ye karşı bağışıklık sisteminin önemli bir elemanı olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma HBV'ye karşı doğal bağışık bireylerde, kronik hepatit B hastalarında ve HBV virüsü ile karşılaşmamış normal popülasyondaki bireylerde STING gen ekspresyon düzeyinin araştırılması amacı ile yapılmıştır.

Çalışmaya 18-65 yaş aralığında HBV'ye karşı doğal bağışık 30 kişiden oluşan birinci grup, kronik hepatit B hastası 30 kişiden oluşan ikinci grup, ve HBV virüsü ile karşılaşmamış normal popülasyondaki 30 kişiden oluşan üçüncü grup olacak şekilde üç gruptan toplam 90 kişi dahil edilmiştir. Her bir katılımcıdan tam kan örneği alınıp periferik kan mononükleer hücrelerinin (PKMNH) izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen PKMNH'den total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildikten sonra STING gen ekspresyon düzeyi Real Time Polymerase Chain Reaction (RT PCR) yöntemiyle belirlenmiştir. RT PCR işleminden sonra  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formülü uygulanarak normalizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya katılan HBV'ye karşı doğal bağışıklardan oluşan grubun STING ekspresyon düzeyi ortalama  $0,084 \pm 0,026$ , HBV ile karşılaşmamış gönüllü grubunun

STING ekspresyon düzeyi ortalama  $0,082\pm0,032$ , kronik hepatit B hastalarından oluşan grubun STING ekspresyon düzeyi ise ortalama  $0,075\pm0,022$  şeklindedir.

Çalışmamız HBV enfeksiyonunun kronikleşmesinde STING ekspresyon düzeyinin araştırıldığı bildiğimiz ilk çalışmadır. Doğal bağışıkların ortalama STING ekspresyon düzeyi kronik hepatit B hastalarından yaklaşık %10 daha fazla bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.



## SUMMARY

### **Investigation of Stimulator of Interferon Genes (STING) Expression Levels Among Individuals With Chronic Hepatitis B Infection and Who Have Naturally Acquired Immunity Against HBV**

It has been estimated that currently 350-400 million people have been chronically infected with the Hepatitis B virus (HBV) worldwide, and approximately one million people die each year due to HBV related diseases. It has been suggested that the viral and host factors, especially the host immune system, may play a role in the chronicity of the HBV infection. Stimulator of Interferon Genes (STING) is one of the members of the pattern recognition receptor (PRR) that detects the presence of DNA in a human cell, using a number of second messengers to activate specific transcription factors for synthesis of cytokines such as interferon (IFN) alpha, IFN beta, tumor necrosis factor (TNF) alpha and interleukin (IL)-6 and is thought to be an important member of the immune system against HBV.

The main purpose of this study is to investigate STING gene expression levels in individuals naturally immunized against HBV, in chronic hepatitis B infected patients, and in normal individuals who have not been exposed to HBV.

A total of 90 volunteers have been included in the study from the age of 18 to 65, in which the first group consists of 30 individuals naturally immunized against HBV, the second group consists of 30 chronically hepatitis B infected patients while the third group consists of 30 healthy population members who have not been exposed to HBV. Whole blood samples were taken from each participant and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was isolated afterwards. Total RNA was isolated from PBMC. After cDNA synthesis of the total RNA, STING gene expression levels were determined by real-time polymerase chain reaction (RT PCR) method. After RT PCR, normalization was performed by applying the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formula.

STING expression level of the naturally immunized group was calculated as  $0,084 \pm 0,026$  on average, average STING expression level of healthy population group

was  $0,082 \pm 0,032$ , and STING expression level of chronically infected patients group was  $0,075 \pm 0,022$  on average.

To our knowledge, this is the first study investigating the role of STING expression in chronicity of HBV. Although the average expression level of naturally immunized individuals was calculated as approximately 10% higher than that of hepatitis B infected patients, no significance was found, statistically.



# İÇİNDEKİLER

|                                        |      |
|----------------------------------------|------|
| ÖNSÖZ .....                            | I    |
| ÖZET.....                              | II   |
| SUMMARY .....                          | IV   |
| İÇİNDEKİLER .....                      | VI   |
| KISALTMALAR .....                      | VIII |
| TABLolar DİZİNİ .....                  | XI   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                   | XII  |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                 | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                | 3    |
| 2.1. Hepatit B Virüsü.....             | 3    |
| 2.1.1. Tarihçe.....                    | 3    |
| 2.1.2. Genel Özellikleri .....         | 4    |
| 2.1.3. Epidemiyoloji .....             | 5    |
| 2.1.4. Genom Yapısı.....               | 7    |
| 2.1.5. HBV Genotipleri .....           | 9    |
| 2.1.6. HBV Proteinleri.....            | 10   |
| 2.1.6.1. Yüzey (Zarf) Proteinleri..... | 10   |
| 2.1.6.2. Kor proteinleri .....         | 10   |
| 2.1.6.3. P proteini .....              | 11   |
| 2.1.6.4. X proteini .....              | 11   |
| 2.1.7. Viral Replikasyon.....          | 12   |
| 2.1.8. Patogenez .....                 | 14   |
| 2.1.9. Klinik Seyir .....              | 15   |
| 2.1.10. Tanı.....                      | 18   |

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.10.1. Serolojik Testler .....                                     | 18 |
| 2.1.10.2. Moleküler Testler .....                                     | 20 |
| 2.1.11. Tedavi .....                                                  | 20 |
| 2.1.12. Koruma .....                                                  | 21 |
| 2.2 Stimulator of Interferon Genes (STING) .....                      | 22 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                              | 25 |
| 3.1. Hastaların Seçimi .....                                          | 25 |
| 3.2. Serolojik Analiz .....                                           | 25 |
| 3.3. Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu .....                 | 25 |
| 3.4. PKMNH'den RNA İzolasyonu .....                                   | 26 |
| 3.5. Komplementer DNA ( <i>Complementary</i> DNA, cDNA) Sentezi ..... | 28 |
| 3.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....                 | 29 |
| 3.7. İstatistiksel Analiz .....                                       | 33 |
| 4. BULGULAR .....                                                     | 34 |
| 4.1. Demografik veriler .....                                         | 34 |
| 4.2. Laboratuvar verileri .....                                       | 35 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                     | 44 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....                                            | 53 |
| 7. KAYNAKÇA .....                                                     | 55 |

## KISALTMALAR

**ABD:** Amerika Birleşik Devletleri

**AIDS:** Acquired immune deficiency syndrome (kazanılmış immün yetmezlik sendromu)

**ALT:** Alanin aminotransferaz

**Anti-HBc:** Hepatit B virüsü kor antijenine karşı gelişen antikor

**Anti-HBc IgG:** Hepatit B virüsü kor antijenine karşı gelişen IgG tipi antikor

**Anti-HBc IgM:** Hepatit B virüsü kor antijenine karşı gelişen IgM tipi antikor

**Anti-HBe:** Hepatit B virüsü zarf antijenine karşı gelişen antikor

**Anti-HBs:** Hepatit B virüsü yüzey antijenine karşı gelişen antikor

**ATP:** Adenozin trifosfat

**cDNA:** Complementary DNA (komplementer DNA)

**cccDNA:** Covalently closed circle DNA (sıkı bir şekilde bağlanmış süperkırımlı DNA)

**CD:** Cluster of differentiation

**CDN:** Cyclic di nucleotid (siklik dinükleotid)

**c-di-AMP:** Siklik diadenozin monofosfat

**c-di-GMP:** Siklik diguanozin monofosfat

**cGAMP:** Siklik GMP-AMP

**Cp:** Crossing point (çakışma noktası)

**Ct:** Threshold cycle (eşik döngü değeri)

**DNA:** Deoksiribonükleik asit

**dNTP:** Deoksinükleotid trifosfat

**DR:** Direct repeats (tekrarlayan bölgeler)

**DSÖ:** Dünya sağlık örgütü

**EDTA:** Etyhlene diamine tetraacetate

**EIA:** Enzimimmunoassay

**Enh:** Enhancer (güçlendirici)

**ER:** Endoplazmik retikulum

**GAPDH:** Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz

**GTP:** Guanozin trifosfat

**HBcAg:** Hepatit B virüsü kor antijeni

**HBeAg:** Hepatit B virüsü zarf antijeni

**HBsAg:** Hepatit B virüsü yüzey antijeni

**HBIG:** Hepatit B immünglobulin

**HBV:** Hepatit B virüsü

**HCV:** Hepatit C virüsü

**HSK:** Hepatoselüler karsinom

**IFN:** İnterferon

**IL:** İnterlökin

**IRF:** Interferon regulatory factor (interferon düzenleyici faktör)

**LHBsAg:** Büyük zarf proteini

**LSM:** Lymphocyte separation medium (lenfosit seperasyon medyumu)

**MHBsAg:** Orta zarf proteini

**MHC:** Majör histokompabilite kompleksi

**MÖ:** Milattan önce

**NF-κB:** Nükleer faktör-kappa B

**NK:** Natural killer (doğal öldürücü hücre)

**NLR:** NOD like receptor (NOD benzeri reseptör)

**NTCP:** Sodyum taurokolat kotransport polipeptidi

**ORF:** Open reading frame (açık okuma çerçevesi)

**PBS:** Phosphate buffered saline (fosfat tamponlu tuzlu su)

**PCR:** Polymerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)

**pgRNA:** Pregenomik RNA

**PKMNH:** Periferik kan mononükleer hücresi

**Pol:** Polimeraz

**preC:** Prekor

**PRR:** Pattern recognition receptor (patern tanıma reseptörü)

**rcDNA:** relaxed circular DNA (gevşek sirküler DNA)

**RIA:** Radio immunoassay

**RLR:** RIG-I like receptor (RIG-I benzeri reseptör)

**RNA:** Ribonükleik asit

**RT:** Revers transkriptaz

**SHBsAg:** Küçük zarf proteini

**STING:** Stimulator of interferon genes

**TBE:** Tris-borik asit-EDTA

**TBK:** Tank binding kinase (TANK bağlayıcı kinaz)

**TLR:** Toll like receptor (toll benzeri reseptör)

**Tm:** Melting temperature (erime sıcaklığı)

**TNF:** Tümör nekroz faktörü

**TRAP:** Translocon-associated protein (translokon ilişkili protein)

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> cDNA sentez karışımı içeriği .....                                                    | 28 |
| <b>Tablo 2.</b> RT-PCR karışımının içeriği .....                                                      | 31 |
| <b>Tablo 3.</b> Kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri ve uzunlukları .....                   | 31 |
| <b>Tablo 4.</b> RT PCR döngüsü .....                                                                  | 32 |
| <b>Tablo 5.</b> Çalışma gruplarının cinsiyetlere göre dağılımları ve yüzdeleri .....                  | 34 |
| <b>Tablo 6.</b> Çalışma gruplarının yaş ortalamaları .....                                            | 34 |
| <b>Tablo 7.</b> Katılımcıların cinsiyete göre yaş ortalamaları .....                                  | 35 |
| <b>Tablo 8.</b> Gönüllülerin gruplara göre STING ekspresyon düzeyleri .....                           | 40 |
| <b>Tablo 9.</b> Gönüllülerin yaşa göre oluşturulan gruplarının STING ekspresyon düzeyleri .....       | 41 |
| <b>Tablo 10.</b> Gönüllülerin cinsiyete göre oluşturulan gruplarının STING ekspresyon düzeyleri ..... | 42 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Hepatit B partikül tipleri.....                                                                         | 5  |
| Şekil 2. HBsAg prevalans haritası .....                                                                          | 7  |
| Şekil 3. HBV'nin genom yapısı.....                                                                               | 9  |
| Şekil 4. STING'in aktivasyon ve etki mekanizması .....                                                           | 23 |
| Şekil 5. PCR işlemi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri ve Cp değerleri örneği .....                       | 36 |
| Şekil 6. Erime sıcaklığı ve erime eğrisi analizi örneği .....                                                    | 37 |
| Şekil 7. İki farklı örnekte test edilen GAPDH amplifikasyon eğrileri ve Cp değerleri .....                       | 38 |
| Şekil 8. İki farklı örnekte test edilen GAPDH erime sıcaklığı ve erime eğrisi analizi .....                      | 38 |
| Şekil 9. PCR sonucu elde edilen STING ve GAPDH amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü ..... | 39 |
| Şekil 10. Gönüllülerin gruplara göre STING ekspresyon düzeyleri.....                                             | 40 |
| Şekil 11. Gönüllülerin yaşa göre oluşturulan gruplarının STING ekspresyon düzeyleri.....                         | 41 |
| Şekil 12. Gönüllülerin cinsiyete göre oluşturulan gruplarının STING ekspresyon düzeyleri.....                    | 42 |

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit B virüsü (HBV) tüm dünyada yaklaşık 350-400 milyon kişiyi kronik olarak enfekte ettiği düşünülen hepatotropik, nonsitopatik bir DNA virüsüdür. HBV akut fulminan hepatit, kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinom (HSK) gibi bir dizi karaciğer hastalığına neden olabilir. Her yıl yaklaşık bir milyon kişi fulminan hepatit, dekompanse siroz veya HSK gibi HBV ile ilişkili nedenlerden dolayı kaybedilmektedir (1).

HBV ile enfekte olduktan sonra virüse karşı etkili immün yanıt oluşturan kişiler virüsü vücutlarından temizler ve HBV'ye karşı doğal bağışık hale gelirler. HBV konağın doğal immün sistemi tarafından algılandıktan sonra salınan interferon (IFN) alfa ve IFN beta virüsün çoğalmasını ve protein sentezlemesini baskılar. Doğal immün yanıt bir yandan da edinsel immün yanıtı aktifleştirir. Özellikle *cluster of differentiation* (CD)8 T lenfositler tarafından hem sitolitik hem de nonsitolitik yollarla HBV ile enfekte hepatositler ortadan kaldırılarak enfeksiyon sonlandırılır. Akut enfeksiyon sırasında immün sistem etkin bir şekilde aktifleşip virüsü vücuttan temizlemeyi başaramaz ise kişi kronik olarak enfekte olmaya devam eder (2,3). Kronik enfekte kişiler IFN veya nükleoz(t)id analogları ile uzun süre uygun dozda tedavi alsalar dahi tam kür ancak hastaların %10'unda mümkün olmaktadır. Üstelik tedavinin uzun sürmesi, tedavide kullanılan ilaçlara karşı direnç gelişebilmesi, tedavi tamamlandıktan sonra hastalığın yeniden ortaya çıkabiliyor olması, ilaç yan etkilerinin fazla olması ve yüksek maliyet gibi sorunlar mevcut kullanımdaki tedavi seçeneklerinin kısıtlılıkları arasındadır. Tam kür sağlayacak ve tedavi süresini kısaltacak yeni ilaç hedefleri araştırılmaktadır (4).

*Stimulator of Interferon Genes* (STING) hücre içindeki DNA varlığını algılayan, bir dizi ikinci haberci kullanarak özgül transkripsiyon faktörlerini aktifleştiren, buna bağlı olarak IFN alfa, IFN beta, tümör nekroz faktörü (TNF) alfa ve interleukin (IL)-6 gibi sitokinlerin sentezini arttıran patern tanıma reseptörü (*pattern recognition receptor*, PRR) üyelerinden biridir. Özellikle DNA virüslerine karşı oluşan savunmada önemli rol oynar. Sitokin salınımına ek olarak özgül CD8 sitotoksik T lenfositlerin etkinleştirilmesinde görev alır (5).

Bu bilgiler STING proteininin HBV'ye karşı gelişen immün yanıtta önemli bir bileşen olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda kronik hepatit B hastası olan kişiler, HBV'ye karşı doğal bağışık kişiler ve HBV virüsü ile karşılaşmamış normal popülasyondaki sağlıklı kişilerden oluşan üç grup gönüllüden alınan kan örneklerindeki periferik kan mononükleer hücrelerinin (PKMNH) izole edildikten sonra bu hücrelerdeki STING geninin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi ve bu proteinin HBV'ye karşı oluşan immün yanıtındaki rolünün araştırılması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hepatit B Virüsü

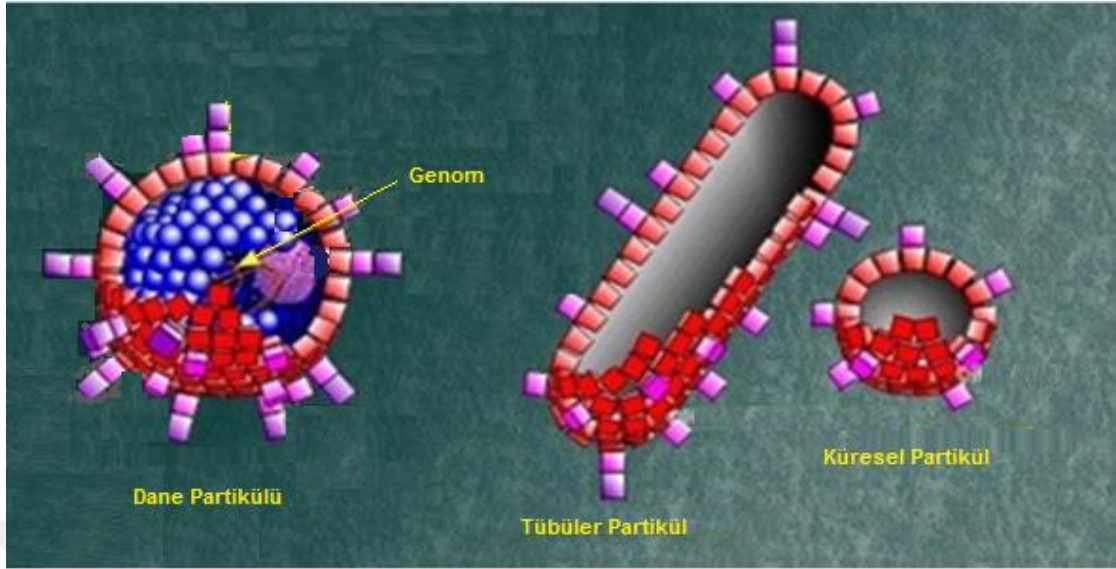
#### 2.1.1. Tarihçe

Takriben 25 asırlık bir geçmişe sahip olan viral hepatitlerin tarihi MÖ 5. yüzyılda Hipokrat'ın "epidemik sarılık" hastalığını tarifi ile başlar. Hipokrat hastalığı tanımlamakla kalmamış, bulaşıcı olabileceğini düşünüp karantina uygulanmasını önermiştir (6,11). 1865 yılında Virchow sarılıklı hastaların otopsilerinde duodenumda ödem ve koledokta mukuslu bir birikinti görmüş ve bunun safranin karaciğerden bağırsağa ulaşmasına engel olduğunu düşünmüştür. Bu yorumdan hareketle de "kataral-nezlevi ikter" teriminden söz etmiştir (7). 1883 yılında Almanya'nın Bremen şehrinde insan lenf sıvısı kullanılarak hazırlanan çiçek aşısı kampanyası sonucunda ortaya çıkan sarılık epidemisi Lurman tarafından gösterilmiştir. II. Dünya Savaşı sırasında aşılardan sonra görülen sarılık vakalarından "serum hepatiti" tanımı ile söz edilmiştir (8). 1965'te Blumberg ve arkadaşları sık kan transfüzyonu yapılan Avustralyalı bir lösemi hastasının kanında tespit ettikleri ve "Avustralya antijeni" olarak isimlendirdikleri oluşumun Hepatit B ile ilişkisini ortaya koymuşlardır. 1970'te Dane ve arkadaşları immun elektron mikroskop kullanarak inceledikleri hasta serumlarında, yüzeylerinde Avustralya antijeni taşıyan "virüs benzeri" partikülleri saptamışlar ve bunların Hepatit B virüsüne ait olduğunu ileri sürmüşlerdir (9). 1971 yılında Krugman ısı ile inaktive edilen hepatit B yüzey antijeni bulunan serumların immünojenik olduğunu ve aşı olarak kullanılabileceğini göstermiştir (10). 1973 yılında ise Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından hepatitin iki farklı enfeksiyöz ajanını birbirinden ayırmak amacı ile "hepatit" ve "hepatit B" terimlerinin kullanılması önerilmiştir. Daha sonra 1979 yılında, HBV'nin DNA'sı klonlanarak tam nükleotid dizisi çıkarılmış, polimeraz zincir reaksiyonu (*polymerase chain reaction*, PCR) yöntemi ile virüs DNA'sı çoğaltılarak HBV'nin moleküler biyolojisi ile ilgili çok önemli gelişmeler kaydedilmiştir (12).

### 2.1.2. Genel Özellikleri

HBV, Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirus cinsinde yer alan, bilinen en küçük hayvan DNA virüsüdür. İnsanlarda hastalık oluşturan tek Hepadnaviridae ailesi üyesidir. HBV genomu yaklaşık 3200 nükleotid uzunluğunda olup kısmi olarak çift sarmallı ve çemberseldir. Genom ikozahedral bir kapsid içerisinde bulunur. İkozahedral kapsidin dışında üç farklı yüzey antijenini taşıyan lipid yapılı zarf yer alır. Çok küçük bir genom yapısına sahip olmasına rağmen sahip olduğu iç içe geçen DNA okuma bölgeleri sayesinde artmış bir sentez kapasitesine sahiptir. İlginç bir şekilde, bir DNA virüsü olmasına rağmen, replikasyonunu sahip olduğu revers transkriptaz enzimi vasıtası ile ve replikasyonun bir aşamasında RNA molekülü üzerinden tamamlar (13-16).

Enfekte hastaların serumları incelendiğinde HBV'nin üç farklı formda bulunabildiği görülür. Birincisi viral DNA'yı da içeren, tam bir virion yapısına sahip, enfektif özellikte, 42 nm çapında "Dane partikülü" dür. İkincisi 22 nm çapında ve boyu 200 nm'ye kadar uzayabilen ve genetik materyal içermediği için enfeksiyon yapma özelliği olmayan "tübüler partiküller" dir. Bu tübüler yapılar hepatitli hastaların serumlarında özellikle virüsün replikasyonunun yüksek düzeyde olduğu dönemlerde bulunmaktadır. Üçüncüsü yine genetik materyal içermeyen, 22 nm çapında, enfeksiyon yapma özelliğine sahip olmayan "küresel partiküller" dir. Küresel partiküller hastaların serumlarında en yüksek oranda bulunan HBV formlarıdır (Şekil 1) (12,17).



Şekil 1. Hepatit B partikül tipleri (18 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).

Her üç formun da yüzeylerinde "Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg)" bulunmaktadır. Bu antijen immünojenik özellikte olup, kendisine karşı oluşan "Anti-HBs" antikorları hastalıktan koruyucu özelliktedir (19). Genel olarak zarflı virüsler çevre şartlarına ve dezenfektanlara duyarlı olmalarına rağmen, HBV'nin ultraviyole, eter ve benzalkonyum kloride diğer zarflı virüslere oranla daha dirençli olduğu belirlenmiştir (20). HBV'nin bu özelliği virüsün kişiden kişiye geçişini kolaylaştıran önemli bir faktördür.

### 2.1.3. Epidemiyoloji

Tüm dünyada yaklaşık iki milyar kişinin HBV ile karşılaşmış olduğu, yaklaşık 350-400 milyon kişinin kronik olarak enfekte olduğu ve her yıl yaklaşık bir milyon kişinin de HBV ile ilişkili sebeplerden dolayı hayatını kaybettiği gerçeği hepatit B enfeksiyonunu önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir (1).

HBV'nin bulaşı perinatal, parenteral ya da horizontal geçiş şeklinde olabilmektedir. Perinatal bulaş anne karnında iken transplasental yolla ya da doğum sırasında bebek doğum kanalından geçerken kan ve sekresyonlar yoluyla olabilir. Parenteral bulaş daha çok intravenöz ilaç bağımlılarının ortak enjektör kullanımı ile

olmaktadır. Başka bir parenteral bulaş yolu kan ve organ nakli ile bulaştır. Günümüzde, kan ve organ donörlerinde HBsAg taraması ile bu yolla geçiş azalsa da devam etmektedir. Horizontal bulaş ise genellikle aile içi yakın temas ve ortak eşya kullanımı sonucu olmaktadır (21).

HBV enfeksiyonunun görülme sıklığı, karşılaşma yaşı ve bulaş şekli dünyanın farklı bölgelerinde farklılıklar göstermektedir. HBsAg pozitifliğinin toplumda görülme oranlarına göre dünya ülkeleri üç grupta incelenmektedir:

**a) Yüksek endemisite ülkeleri:** Toplumdaki HBsAg pozitiflik oranının %8'in üzerinde olduğu ülkelerdir. Dünya nüfusunun yaklaşık %45'i bu ülkelerde yaşamaktadır. Sahra Altı Afrika ülkeleri, Japonya ve Hindistan haricindeki birçok Asya ülkesi ve Çin bu grupta yer almaktadır. Bu ülkelerde HBV ile karşılaşma genellikle kronikleşme ihtimalinin yüksek olduğu erken çocukluk dönemlerinde olur ve en yaygın bulaş şekli perinatal bulaştır. Bu ülkelerde yaşayan kişilerin hayat boyu HBV ile karşılaşma riskleri %60'tan fazladır (22-24).

**b) Orta endemisite ülkeleri:** Dünya nüfusunun yaklaşık %43'ünün yaşadığı, HBsAg pozitifliğinin %2-7 arasında görüldüğü ülkelerdir. Türkiye'nin de içinde yer aldığı Akdeniz ülkeleri, Ortadoğu ülkeleri, Kuzey Afrika ülkeleri, Japonya ve Orta Asya ülkeleri, Doğu Avrupa ülkeleri ve Rusya orta endemisite ülkeleri arasında yer almaktadır. Bu ülkelerdeki kişilerin hayat boyu HBV ile karşılaşma riskleri %20-60 arasındadır (22-24).

**c) Düşük endemisite ülkeleri:** Dünya nüfusunun yaklaşık %12'sinin yaşadığı, HBsAg pozitifliğinin %2'nin altında görüldüğü ülkelerdir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Kanada, Kuzey ve Batı Avrupa ülkeleri düşük endemisite ülkelerindendir. Bu gruptaki ülkelerde HBV ile karşılaşma genellikle erişkin dönemde, parenteral yolla ya da cinsel temas yoluyla olmaktadır. Bu ülkelerdeki kişilerin hayat boyu HBV ile karşılaşma riskleri %20'den azdır (Şekil 2) (22-24).



Şekil 2. HBsAg prevalans haritası (25 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).

Orta endemisite ülkeleri arasında yer alan Türkiye'nin HBsAg pozitiflik oranının %0,8-11,5 arasında olduğu ve coğrafi bölgelere göre farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. Ülkemizin Ege ve Marmara gibi sosyoekonomik anlamda daha gelişmiş olan bölgelerinde %3,4 gibi nispeten daha düşük oranda görülür. Oysa bu oran ülkenin Doğu ve Güneydoğu Anadolu illerinde %8,1-11,5'lere kadar yükselmektedir (26,27).

#### 2.1.4. Genom Yapısı

HBV kısmen çift sarmallı, kendine has bir sirküler yapısı olan, bilinen en küçük hayvan DNA virüsüdür (16). HBV genomu, genotiplere göre farklılıklar göstermekle birlikte yaklaşık 3200 nükleotid taşıyan uzun, negatif polariteli zincir (L zinciri) ile negatif zincirden daha kısa pozitif polariteli zincirden (S zinciri) oluşmaktadır. Bu zincirler ortak baz çiftlerine sahiptir. Her iki zincirdeki ortak baz çiftlerinin birbirlerine hidrojen bağları ile bağlanmasıyla sağlanan yapısal bütünlük sayesinde HBV DNA'sına özgü sirküler bir yapı oluşmaktadır, ancak zincirlerin 3' ve 5' uçları birleşik olmadığından aslında lineer moleküllerdir (12). Her iki sarmal üzerinde “*Direct repeats*” (DR)1 ve DR2 olarak bilinen iki tane tekrarlayan bölge vardır. Negatif sarmalın 5' ucunda DR1 ve 3' ucunda DR2 dizileri yer alır. Pozitif zincir sentezinin DR2'den başlaması nedeniyle DR1 ve DR2 dizileri pozitif zincirin 5' ucunda bulunur.

Negatif zincirin 5' ve 3' uçları arasında kısa bir aralık vardır ve pozitif zincir sayesinde halka şeklinde tutunur. Negatif zincirin iki ucu arasındaki bu bölgede 5' ucundan fosfotirozin bağı ile zincire kovalent olarak bağlanmış viral DNA polimeraz enzimi bulunur. Pozitif zincirin 5' ucunda da yine kovalent olarak bağlanmış 18 nükleotid uzunluğunda, DNA sentezi için kalıp görevi gören RNA oligomeri vardır. Viral genomun bu yapısı, gevşek sirküler DNA (*relaxed circular DNA*, rcDNA) olarak isimlendirilir (16,28).

HBV'deki genler alışlageldiği üzere birbirinden farklı bölgelerde ve sadece arka arkaya dizilmiş halde bulunmazlar. Aksine genom "birbiri içine geçen genler" biçiminde organize olmuştur. HBV'de genetik bilgi negatif zincirde kodlanmış olup, bu sarmal P, S, C ve X kısaltmaları ile gösterilen dört farklı gen bölgesini kodlayan nükleik asit dizisi farklı "açık okuma çerçevesi"ne (*Open Reading Frame*, ORF) sahiptir (17).

Bununla birlikte aynı ORF içerisinde birden fazla başlangıç kodonu bulunması nedeniyle birbiri ile ilişkili, farklı proteinler sentezlenir. HBV genomunda fonksiyonel olarak tanımlanmış 4 adet *promoter* (pre-S1 prom, S prom, X prom ve pre-C prom) ve 2 adet *enhancer* (güçlendirici, Enh1 ve Enh2) bölge bulunmaktadır. ORF'lerin transkripsiyonu bu düzenleyici dizinler tarafından kontrol edilmektedir (29).

Birbiri içine geçen genler biçiminde organize olan genomun en büyük geni olan P geni; X ve C genleri ile kısmen, S geni ile tamamen birbiri içine geçmiş halde bulunmaktadır. Protein sentezi sırasında negatif zincir toplamda yaklaşık bir buçuk kere okunmaktadır. Bu sayede HBV, bilinen hayvan virüsleri içinde en küçük genoma sahip olmasına rağmen, kodlama kapasitesi en fazla olan virüstdür. S geninde pre-S1, pre-S2 ve S olmak üzere üç, C geninde de pre-C ve C olmak üzere iki farklı başlangıç kodonu bulunmaktadır. Sonuç olarak HBV'de dört adet ORF olmasına rağmen birbirleri ile ilişkili yedi değişik protein sentezi sağlanır (Şekil 3) (9,31).



### **2.1.6. HBV Proteinleri**

#### **2.1.6.1. Yüzey (Zarf) Proteinleri**

Virüsün yüzey (zarf) proteinlerini kodlayan S ORF bölgesi farklı bölgelerinde bulunan üç başlangıç kodonu ile yapısal ve fonksiyonel olarak farklı preS1, preS2 ve S bölgelerine ayrılır. Okuma işlemi S ORF bölgesindeki ilk başlangıç kodonundan başlarsa preS1, preS2 ve S gen bölgelerinin kodladığı mRNA'nın translasyonu sonucu büyük HBsAg (LHBsAg), ikinci başlangıç kodonundan başlarsa preS2 ve S gen bölgelerinin kodladığı mRNA'nın translasyonu sonucu orta HBsAg (MHBsAg), üçüncü başlangıç kodonundan başlarsa S gen bölgesinin kodladığı mRNA'nın translasyonu sonucu küçük HBsAg (SHBsAg) proteinleri sentezlenmiş olur. Bu yüzey proteinleri sadece Dane partikülünün yapısına katılmakla kalmayıp, genetik materyal içermeyen non-enfeksiyöz subviral partiküllerin yapısına da katılırlar ve serumda bu subviral partiküllerin konsantrasyonu, Dane partiküllerine oranla 10.000 kata kadar fazla olabilir. Yüzey proteinleri enfektif Dane partikülünde ve enfektif olmayan viral partiküllerde farklı oranlarda bulunurlar. LHBsAg yüzey proteinlerinin en büyüğüdür. Hem virüsün hepatositlere tutunmasında, hem de replikasyon tamamlandıktan sonra virüsün hepatositten salınmasında önemli rol oynar. Bu yüzey proteini antijenik özelliktedir ve kendisine karşı sentezlenen konak nötralizan antikoru virüse karşı koruyucu immün yanıtta önemli rol oynar. SHBsAg en küçük zarf proteinidir. Miktar olarak en fazla üretilen ve virüs zarfında en yüksek oranda bulunan yüzey proteinidir (35-36).

#### **2.1.6.2. Kor proteinleri**

Virüsün nükleokapsid (kor) proteinlerini kodlayan C ORF bölgesi iki farklı başlangıç kodonu içerir. Okuma işlemi C başlangıç kodonundan başladığında sentezlenen mRNA'nın translasyonu sonucu nükleokapsidin yapısal kor proteini olan HBcAg sentezlenir. Sentezlenen iki HBcAg kendi aralarında birleşerek homodimer haline gelir. Oluşan homodimerler bir araya gelerek ikozahedral kapsidi oluşturur. Viryon dış etkenlerce parçalanmadıkça HBcAg serumda serbest halde bulunmaz. Bu nedenle de serolojik yöntemlerle tespit edilemez. Eğer okuma pre-C başlangıç

kodonundan başlarsa sentezlenen mRNA'nın translasyonu sonucu çözünebilir nükleokapsid proteini olan HBeAg'nin prekürsör proteini sentezlenir. Prekürsör olarak sentezlenen HBeAg proteininin N-terminal ucunda fazladan bulunan ve "pre-core" gen bölgesince kodlanan aminoasitler, proteini endoplazmik retikuluma (ER) yönlendirir. Burada bir peptidaz tarafından modifiye edilen protein, golgi cisimciği üzerinden sekrete edilir. Serbest olarak serumda bulunur ve serolojik yöntemlerle tespiti mümkündür. Serumda HBeAg varlığı aktif replikasyonun bir göstergesi olarak da kullanılmaktadır. Fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber virüsün immün sistemden kaçışına katkı sağladığı, dolayısıyla da viral persistansa katkıda bulunduğu düşünülmektedir (37).

Prekor mutantlar da denilen HBV mutantlarında pre-C dizisinde stop kodon mutasyonu mevcut olup, HBcAg sentezlenmeye devam ederken HBeAg sentezlenememektedir. Replikasyon devam etmesine rağmen konağın serumuna HBeAg salınmadığı için serolojik yöntemlerle de tespit edilememektedir. Bu mutant suşlar fulminan hepatit gelişimi açısından yüksek risk taşımaktadır (38,39).

#### **2.1.6.3. P proteini**

HBV'nin en uzun geni olan P geni genomun yaklaşık %75'ini kaplar. Her biri proteinin farklı bölgelerinde olmak üzere dört ayrı fonksiyonel kısmı vardır. Amino terminal parçası terminal proteindir. Terminal protein pregenomik RNA'ya kovalent olarak bağlanan kısımdır ve DNA negatif sarmal sentezini başlatır. Karboksi terminal parça RNaz H aktivitesi gösterir ve DNA negatif sarmal sentezi sırasında pregenomik RNA'yı yıkan kısımdır. Orta kısım ise DNA negatif sarmalının sentezi için RNA bağımlı DNA polimeraz (revers transkriptaz) aktivitesi ve DNA pozitif sarmalının sentezi için de DNA'ya bağımlı DNA polimeraz aktivitesi gösteren kısımdır (40).

#### **2.1.6.4. X proteini**

HBV genomunun en küçük gen bölgesini oluşturan X geninden sentezlenir. Dolayısı ile en küçük proteindir. Bu gen, transkripsiyonu aktiveleştirici fonksiyonu ile viral proteinlerin üretimini artırır. Ayrıca konak hücredeki tümör baskılayıcı genlerin

de fonksiyonunu bozduğu gösterilmiştir. Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonlarını bozması nedeni ile HSK gelişiminde de rol oynadığı düşünülmektedir (41).

### 2.1.7. Viral Replikasyon

Hepatositlere yüksek derecede tropizm gösteren bir DNA virüsü olan HBV'nin replikasyonu temel olarak hepatositlerde gerçekleşmektedir. Patojen mikroorganizmaların vücutta enfeksiyonu başlatabilmeleri için ilk adım olan "hedef hücreye bağlanma" oldukça önemli bir basamaktır. HBV'nin üç farklı yüzey proteininden en büyüğü olan LHBsAg, HBV'nin hepatositler üzerindeki giriş reseptörüne bağlanmasında anahtar rol oynar. Olası reseptörler olarak hepatosit yüzeyinde başta heparan sülfat olmak üzere birçok protein ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda normalde vücutta safra tuzlarının dolaşımında rol alan, transmembran taşıyıcı bir protein olan sodyum taurokolat kotransport polipeptidinin (NTCP) fonksiyonel HBV giriş reseptörü olduğu ortaya konmuştur (42). Bu reseptörlerin birbirine bağlanmasından sonra virüsün hepatosit içine girişinin hem virüs zarfının hepatosit hücre zarına füzyonu ile hem de endositoz yolu ile olabileceği öne sürülmüştür. Virüs zarfının hepatosit zarı ile ya da endositoz sonrası endozom zarı ile füzyonu sonucu nükleokapsid sitoplazmaya salınmış olur. Nükleokapsid sitoplazmadan pasif difüzyon veya nükleer por kompleksi ile birlikte konak hücre çekirdeğine taşınır (43). Kapsidin parçalanmasıyla da rcDNA nükleoplazmaya salınır. Virüsün polimeraz enzimi ile rcDNA pozitif zincirinin eksik kısmı tamamlanır. Pozitif zincirin sentezi tamamlandıktan sonra negatif zincir ile tam anlamıyla eşleşir ve artık her iki ucundan da kovalent bağlarla sıkı bir şekilde bağlanmış süperkırımlı DNA (*covalently closed circle DNA*, cccDNA) oluşur. Oluşan cccDNA'dan hem genomun replikasyonunda kalıp olarak kullanılacak olan hem de gerekli diğer tüm viral proteinlerin sentezi için kullanılacak olan dört tip mRNA sentezlenir. Sentez işlemi hücresel RNA polimeraz II enzimi tarafından viral düzenleyicilerin (dört adet *promoter*-başlatıcı ve iki adet *enhancer*-güçlendirici) etkisiyle gerçekleştirilir. Sentezlenen bu mRNA'ların görevleri aşağıda açıklanmıştır:

**3.5 kb mRNA:** Sentezlenen en uzun mRNA'dır. Genomun replikasyonunda kalıp olarak görev yapar; prekor/kor (HBeAg ve HBcAg) ve polimeraz proteinlerinin

sentezlenmesinde kullanılır. Replikasyonda kalıp olarak kullanılmasından dolayı pregenomik RNA (pgRNA) olarak da adlandırılır.

**2.4 kb mRNA:** Pre-S1, Pre-S2 ve S proteinlerinin sentezlenmesinde kullanılır.

**2.1 kb mRNA:** Pre-S2 ve S proteinlerinin sentezinde görev alır.

**0.7 kb mRNA:** X proteinlerinin sentezinde görev alır (44).

Sentezlenen tüm mRNA'lar sitoplazmaya taşınır. pgRNA'dan önce 200-300 molekül kadar kor proteini (HBcAg) sentezlendikten sonra viral polimeraz sentezi gerçekleşir. P proteini daha önce de değinildiği gibi her biri proteininin farklı bölgelerinde olmak üzere dört farklı fonksiyonel kısma sahiptir. P proteininin amino terminalinde bulunan ve "terminal protein" olarak isimlendirilen kısmı pgRNA'nın 5' ucundaki "e-dizisi" olarak isimlendiren enkapsidasyon dizisine bağlanır. Bu bağlanma ile kor proteinleri disülfid bağlarıyla ikiyeşerli olarak birleşerek homodimer hale gelmeye başlar. Homodimer haline gelen kor proteinleri birleşerek ikozahedral yapıdaki kapsidi meydana getirir. Enkapsidasyon dizisi bulunduran pgRNA'lar kapsid içerisine girerler. Kapsid içerisinde pgRNA kalıp olarak kullanılarak polimeraz enziminin revers transkriptaz aktivitesi ile negatif viral DNA zincirinin sentezi gerçekleştirilir. Yani replikasyon viral çekirdek içinde ancak hepatositin sitoplazmasında gerçekleşmektedir. Negatif viral DNA zinciri sentezlendikten sonra viral polimerazın RNaz H aktivitesi ile pgRNA yıkılır. Yine viral polimeraz enziminin DNA polimeraz aktivitesi ile negatif zincirin 5' ucunda bulunan RNA primeri kullanılarak pozitif viral DNA zincirinin sentezi başlatılır. 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 zincirinin 5' uçlarından hidrojen bağları ile bağlanması ile rcDNA oluşur. Kapsid içerisinde viral replikasyon devam ederken eş zamanlı olarak sitoplazmada bulunan diğer viral mRNA'lardan da diğer viral proteinler sentezlenir. Oluşan nükleokapsidlerin bir kısmı çekirdeğe geri dönerek çekirdekteki cccDNA havuzunun devamlılığını sağlar. Hepatosit DNA'sının hasarlandığı durumlarda veya hücre döngüsü sırasında HBV DNA hepatosit DNA'sına entegre olabilmektedir. Nükleokapsidin konak hücreden zarf yapısını kazanabilmesi için sitoplazmada

sentezlenen yüzey proteinleri gereklidir. Her üç yüzey proteini de Dane partikülünün yapısında bulunur. HBV replikasyonu esnasında ER zarına transmembranöz olarak yerleşen LHBsAg'nin amino terminali kor proteinine bağlanarak nükleokapsidin zarf yapısını kazanmasını sağlar. Birçok zarflı virüsün aksine HBV zarfını sitoplazma zarından değil ER membranından kazanır. Her üç zarf proteinini içeren virionlar ER'den golgi kompleksine taşınır ve zarf proteinlerinin glikozilasyonu sağlanır. Oluşan olgun virion (Dane partikülü) hepatositte kan dolaşımına salınır (45-47).

### **2.1.8. Patogenez**

HBV hepatositlere yüksek oranda tropizm göstermekte ancak non-sitopatik bir virüs olması nedeniyle direkt olarak hepatotoksik özellik göstermemektedir. Hepatosit hücre kültürlerinde üretildiğinde de virüsün hücreler üzerine direkt ölümcül etki yapmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca viral replikasyonun yüksek düzeyde olduğu yenidoğanlarda ve kronik taşıyıcılarda hem karaciğer histopatolojisinin normal olması hem de karaciğer hasarının göstergesi olan karaciğer enzimlerinin yükselmemesi virüsün direkt sitopatik etkisinin olmadığına göstergesi olarak kabul edilebilir (48). O halde oluşan hasardan kim sorumludur? Hepatosit hasarı konağın immün sisteminin virüsü yok etmek için verdiği mücadele sırasında meydana gelmektedir. Bir başka deyişle hepatosit hasarından konak savunma sistemi sorumludur (47). Bu durum çeşitli örnekler ile açıklanabilir. Örneğin, virüs miktarının çok düşük olduğu HBV'ye bağlı fulminan hepatitte oluşan çok şiddetli immün yanıt etkisi ile aşırı miktarda hepatosit harap olmakta ve karaciğer dokusunda hepatoselüler nekroz hatta acil nakil gerektirecek düzeyde karaciğer yetmezliği meydana gelmektedir (49). Ancak immün yanıtın yetersiz olduğu kişilerde kronik HBV enfeksiyonu gelişmektedir. HBV'nin kronikleşmesi hastalarda gelişen hepatik fibroz zemininde siroz ve HSK gelişme riskini de beraberinde getirir (50). Yani HBV'ye karşı immün yanıt yetersizse enfeksiyon kronikleşir; şiddetli ve kontrolsüz bir şekilde oluşursa fulminan hepatit gelişir. İmmün sistem ancak etkili ve yeterli bir yanıt, buna bağlı olarak da kabul edilebilir düzeyde karaciğer hasarı oluşturarak HBV'yi vücuttan temizlemeyi başarabilir. Diğer viral enfeksiyonlarda olduğu gibi HBV'ye karşı da ilk hat savunma doğal immün sistem elemanları tarafından oluşturulur. Viral enfeksiyonlara vücudun

ilk yanıtı virüsle enfekte hücreden IFN alfa ve beta salınımıdır (51). IFN alfa ve beta bir yandan komşu hücrelerde antiviral proteinlerin sentezlenmesini uyarırken bir yandan da viral nükleokapsidlerin ve viral genomik materyalin yıkılmasını sağlar. Aynı zamanda da etkin bir edinsel immün yanıt oluşturulması için diğer immün hücreleri uyarır (52,53). Doğal öldürücü hücreler (*natural killer cells*, NK) HBV'ye karşı ilk yanıtta önemli rol oynayan diğer doğal immün sistem elemanlarıdır (54). Karaciğer makrofajları olan kupfer hücreleri ile dentritik hücreler de doğal bağışıklığın önemli elemanları olup, salgıladıkları IFN alfa ve IFN beta vasıtasıyla virüs üzerine yok edici etkilerini gerçekleştirirler. Bu hücreler aynı zamanda profesyonel antijen sunucu hücreler olup fagosite ettikleri virüsün antijenik epitopunu majör histokompatibilite kompleks (MHC) sınıf II molekülleri yardımı ile CD4 T lenfositlere sunarak onları aktifleştirir. Aktifleşen CD4 T lenfositler salgıladıkları sitokinlerle HBV'ye karşı asıl efektör hücreler olan CD8 T lenfositleri etkinleştirir. CD8 T lenfositler aktifleştikten sonra kendilerine hepatositler tarafından MHC sınıf I molekülleri ile birlikte sunulan HBV epitoplarını tanır ve hepatosite gönderdiği apoptoz sinyalleri ile enfekte hücreler öldürülür. Gerçekleşen hepatosit yıkımı klinikte halsizlik, karın ağrısı, sarılık, idrar renginde koyulaşma ve serumda alanin aminotransferaz (ALT) yüksekliği gibi hepatit belirtileri ile kendini gösterir. CD4 T lenfositler salgıladığı sitokinler vasıtası ile B lenfositleri de aktifleştirerek onları plazma hücrelerine dönüştürür ve HBV'nin antijenlerine karşı antikor sentezlettirir. Özellikle Hepatit B yüzey antijenine (HBsAg'ye) karşı oluşan antikorlar dolaşımda serbest haldeki virüsü nötralize ederek yeni hücreleri enfekte etmesinin önüne geçer. Hem enfekte hepatositlerin yok edilmesi hem de dolaşımdaki serbest virüslerin nötralize edilmesi ile hepatit B enfeksiyonu sınırlandırılmış olur. Eğer IFN salınımında yetersizlik, antijen sunumunda eksiklik, zayıf T lenfosit cevabı gibi immün yanıtın herhangi bir noktasında meydana gelecek zafiyet sonucu virüs vücuttan temizlenemezse hepatit B enfeksiyonu kronik hale gelir (50,55-57).

#### **2.1.9. Klinik Seyir**

HBV enfeksiyonu, klinik olarak akut ya da kronik HBV enfeksiyonu şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Akut HBV enfeksiyonu sıklıkla asemptomatik olarak geçirilir.

Semptomatik olduğunda ise anikterik (sarılıksız) hepatit, ikterik (sarılıklı) hepatit ve oldukça ağır bir form olan fulminan hepatit gibi farklı klinik formlarda kendini gösterebilir. Akut tablo tam şifa ile sonuçlanabileceği gibi yeterli immün yanıtın oluşmadığı durumlarda enfeksiyon kronikleşebilir. Kronik HBV enfeksiyonu da asemptomatik taşıyıcılık (inaktif kronik hepatit), kronik aktif hepatit ve okült (gizli) hepatit gibi farklı klinik formlarda karşımıza çıkabilmektedir. Hastalığın klinik seyrindeki bu farklılıklar, konağın HBV ile karşılaşma yaşına ve konağın immün sisteminin virüse verdiği cevaba, virüsün genetik yapısına ve koenfeksiyon varlığına göre değişkenlik gösterebilir (49,58).

Yenidoğan ve çocukluk döneminde geçirilen akut hepatit B enfeksiyonu genellikle asemptomatik geçirilirken, genç ve erişkinlerde enfeksiyonun semptomatik seyretme oranı artmaktadır. Hastalığın kronikleşme oranları da enfeksiyonun kazanıldığı yaşa göre değişiklikler gösterir. Yenidoğan döneminde enfeksiyon geçirildiğinde kronikleşme oranı %90'ın üzerindedir. Bu oran 1-5 yaş arası okul öncesi dönemde %10-30, erişkin dönemde ise yaklaşık %5 olarak görülmektedir (59).

**Akut enfeksiyon:** Akut enfeksiyon genellikle asemptomatik olarak geçirilir. Semptomatik olgularda ise en sık halsizlik, yorgunluk, iştahsızlık, kas ağrısı, hafif derecede ateş, karın ağrısı, bulantı ve sarılık gibi yakınmalar meydana gelir (60,61).

Virüsün konağa girişinden altı hafta kadar sonra serolojik yöntemlerle HBsAg ve HBeAg serumda tespit edilebilir. Yine bu dönemde moleküler yöntemler kullanılarak HBV DNA varlığı tespit edilebilir. Kor antijeni serumda tespit edilemez ancak bu antijene karşı sentezlenen IgM tipi antikorlar yine enfeksiyonun akut dönemde olduğunun bir başka serolojik belirteçidir. Hatta bu anti-HBc IgM antikorları HBsAg'nin serumdan kaybolduğu ancak anti-HBs antikorlarının oluşmadığı "pencere dönemi" olarak adlandırılan dönemin tek serolojik göstergesidir.

Akut hepatit döneminde biyokimyasal olarak serum transaminazlarında ve bilirubinde yükselme olur. Bilirubin düzeyinin 2,5-3 ng/ml'nin üzerine çıkmasıyla skleralardan başlayarak sarılık belirginleşir. Transaminazlardaki yükselme semptomların başlangıcından önce yapılan ölçümlerde tespit edilebilir ve genellikle semptomların ilk haftasında en yüksek seviyelere ulaşarak serum düzeyi 1.000 U/ml'nin üzerinde seyreder. Hasarlanan hepatosit miktarı arttıkça dolaşıma daha fazla

miktarda transaminaz salınacağı için ölçülen serum transaminaz seviyesi ile karaciğer hasarı arasında doğru orantı vardır. Ancak hastalığın prognozu ile transaminaz seviyesi arasında orantısız bir ilişki söz konusu değildir (12,49,58).

Akut hepatit B enfeksiyonu geçiren hastaların yaklaşık %0,1'inde meydana gelen ve oldukça ağır bir klinik form olan fulminan hepatit tablosunda oluşan aşırı immün cevap sonucu karaciğer hızla tahrip olup, acil nakil gerektirecek şiddette karaciğer yetmezliği meydana gelmektedir. Konak pıhtılaşma faktörlerinin sentezlenememesine bağlı olarak kanama diyatezi, hepatik ensefalopati ve hepatorenal sendrom gibi oldukça ağır klinik tablolarla karşılaşılabilir. Nakil gerçekleşmez ise mortalite %75'in üzerindedir (58,62).

**Kronik enfeksiyon:** Akut enfeksiyon sonrasında virüsün konak karaciğerinden temizlenemediği durumda enfeksiyon kronik hale gelir. Yenidoğanlarda kronikleşme oranı %90'ın üzerinde iken sağlıklı yetişkinlerde ise %5 civarındadır.

Akut hepatit B enfeksiyonu geçiren kişinin serumunda HBsAg varlığının altı aydan uzun süre devam ettiğinin serolojik olarak tespit edilmesi enfeksiyonun kronikleştiğinin göstergesidir. Kronik enfeksiyon da akut enfeksiyon gibi sıklıkla asemptomatiktir. En sık semptom ise yorgunluktur (58,60).

Her hastada aynı seyir görülmesi de kronik enfeksiyon genellikle dört fazda gerçekleşir. İmmüntoleran faz, immünreaktif faz, inaktif faz, kronik aktif faz.

**a) İmmüntoleran faz** viral replikasyonun yüksek, aminotransferazların normal olduğu, klinik belirtilerin bulunmadığı, özellikle yenidoğanlar gibi immün sistemi henüz tam gelişmemiş ya da immün yetmezlikli kişilerde uzun yıllar devam eden fazdır.

**b) İmmün reaktif faz** ise immün sistemin verdiği inflamatuvar yanıt ile hepatosit hasarı ve bunun yansıması olan klinik belirtiler meydana gelir. İmmün sistemin yanıtı viral replikasyonu, dolayısı ile de HBV DNA miktarını azaltır.

**c) İnaktif faz** viral replikasyonun göstergesi olarak kullanılan HBeAg'nin kaybolup anti-HBe'nin olduğu ve viral replikasyonun durduğu dönemdir. Aminotransferazlar normal seviyelere geriler. Kronik hepatit B hastalarının büyük bir kısmı hayatlarının geri kalanını bu evrede geçirirler.

**d)** Kronik aktif fazda hastalarda tekrarlayan alevlenmeler meydana gelmektedir. Hastaların serumlarında replikasyonun en güvenilir göstergesi olan HBV DNA tespit edilebilir (63,64).

HBsAg pozitifliği devam etmesine rağmen klinik yakınması olmayan, serum transaminazları normal, histolojik incelemelerde de karaciğerin yapısının normal olduğu ya da minimal mononükleer infiltratif değişikliklerin bulunduğu kişiler sağlıklı taşıyıcı olarak adlandırılırlar.

Transaminazlarda orta ya da belirgin derecede yükselme ve histolojik incelemelerde lobüler inflamasyon, T hücre aracılı apoptoza uğrayan hepatositlerin oluşturduğu asidofilik "*Councilman* inklüzyon cisimcikleri" ve "*piecemeal*" nekrozunun görüldüğü tablo ise "kronik aktif hepatit" olarak isimlendirilir. Kronik aktif hepatitte virüsün genotipine, atakların sıklığına ve kliniğin ağırlığına göre değişen sürelerle karaciğer sirozuna ilerleme görülebilir (12).

Siroza gidişin sebebi kronik enfeksiyonda HBV'yi vücuttan temizleyecek kadar etkili olamayan bir immün yanıtın süregelen bir şekilde meydana getireceği nekroinflamatuvar doku hasarı ve sonrasındaki fibrozdur. Siroz gelişen hastalarda HSK meydana gelme riski oldukça yüksektir. İmmün sistem aracılı süregelen hepatosit ölümüne cevaben meydana gelen aşırı hücre replikasyonu sırasında meydana gelebilecek genetik materyal değişikliği ve HBx proteininin muhtemel pro-karsinojenik etkisi kanser gelişimi açısından suçlanmaktadır. Tüm dünyada HBV HSK etyolojisinde ilk sırada yer almaktadır (65-67).

## **2.1.10. Tanı**

### **2.1.10.1. Serolojik Testler**

HBV'ye ait antijenlerin ve bu antijenlere karşı oluşmuş olan antikorların hasta serumunda "*enzyme immunoassay*" (EIA) ve "*radio immunoassay*" (RIA) gibi yöntemlerle saptanması enfeksiyonun özgül tanısı için kullanılan en yaygın serolojik yöntemlerdir.

**HBsAg:** Hepatit B enfeksiyonunun hem akut hem de kronik fazlarında serumda tespit edilebilir. Akut enfeksiyon sırasında semptomlar ortaya çıkmadan 3-5

hafta önce saptanabilir. Doğal bağışıklıkla sonuçlanan akut enfeksiyonlarda bu antijen 4 ila 6 ay içinde yavaş yavaş azalarak serumdan kaybolur. HBsAg'nin 6 aydan daha uzun bir süre hasta serumunda tespit edilebiliyor olması enfeksiyonun kronikleştiğinin göstergelerinden biridir. Kantitatif yöntemlerle ölçümü viral yük hakkında bilgi sahibi olmaya da yardımcı olur. Aşılamada rekombinant yöntemlerle elde edilen bu antijen sağlıklı kişilere tatbik edilir (68-70).

**Anti-HBs:** HBV'nin hepatositlere tutunmasında rol oynayan HBsAg'ye karşı oluşan bu antikorlar virüsü nötralize ederek yeni hepatositlerin enfekte olmasını engeller. Bu antikorların serumda tespit edilmeye başlaması akut enfeksiyonun doğal bağışıklıkla sonlandığının göstergesidir. Antikorların ömür boyu koruyucu olduğu kabul edilir. Aşılamadan sonra da anti-HBs pozitifleşir fakat doğal bağışıklıktan farklı olarak aşılamadan sonra anti-HBc IgG antikorları negatiftir. Aşılanan kişilerde serumda ölçülen anti-HBs antikor düzeyinin 10 IU/ml'nin üzerinde olmasının koruyucu olduğu kabul edilir (68-70).

**HBeAg:** Aktif viral replikasyonun göstergesi olarak kullanılır. Enfeksiyonun akut döneminde HBsAg'den daha sonra pozitifleşir. İyileşme ile sonuçlanan enfeksiyonlarda HBsAg'den daha önce serumdan temizlenir. HBeAg pozitifliği aktif replikasyonu işaret ettiğinden bu pozitiflik aynı zamanda kandaki viral yükün ve hastaların bulaştırıcılık oranının yüksek olduğunu gösterir. Enfeksiyonun kronikleştiği kişilerdeki HBeAg pozitifliği siroza ilerleme riskini artırır. Enfeksiyon ilerledikçe aktif viral replikasyonun azalması sonucu, hastaların yaklaşık %50'sinde spontan HBeAg serokonversiyonu gelişmektedir (68-70).

**Anti-HBe:** HBeAg'ye karşı gelişen bu antikorlar HBeAg'nin kaybolmasından takriben 1-2 hafta sonra ortaya çıkmaktadır. Akut enfeksiyon sırasında Anti-HBe antikorlarının ortaya çıkması viral replikasyonun azaldığının ve enfeksiyonun iyileşme yoluna girdiğinin göstergesidir. Kronikleşen enfeksiyonlarda da serumda tespit edilebilir ve tespiti enfektivitenin ve viral replikasyonun azaldığının göstergesidir (68-70).

**Anti-HBc IgM:** Bu antikorlar virüsün serumda tespit edilemeyen antijeni olan kor antijenine karşı oluşur. HBsAg pozitifliğinden 1-4 hafta sonra serumda belirir ve HBsAg ile birlikte tespiti akut HBV enfeksiyonunun göstergesidir. Hatta akut

enfeksiyon sırasında pencere dönemi olarak isimlendirilen HBsAg ve HBeAg'nin kaybolduğu ancak bu antijenlere karşı antikorların henüz tespit edilebilir düzeye gelmediği dönemde serumda saptanabilen tek pozitif göstergedir. Bu antikorlar 3-12 ay içinde azalarak serumdan kaybolur. Kronikleşen enfeksiyonlardaki akut alevlenmelerde serumda saptanabildiği de gösterilmiştir (68-70).

**Anti-HBc IgG:** Kor antijenine karşı oluşan IgG tipi bu antikorlar, anti-HBc IgM'den sonra pozitifleşir ve serumda ömür boyu pozitif olarak kalır. Kişinin HBV virüsü ile karşılaştığının göstergesidir. Bu antikorların serumda izole olarak saptanması çeşitli klinik durumları düşündürür. Örneğin pencere döneminin anti-HBc IgM tipi antikorlarının dahi serumdan kaybolacak kadar uzadığı durum, kronik enfekte kişilerde HBsAg'nin, doğal bağışık kişilerde ise anti-HBs antikorlarının serumda saptanamayacak düzeyde düşük olduğu durumlar buna örnek olarak gösterilebilir (68-70).

#### 2.1.10.2. Moleküler Testler

HBV enfeksiyonun tanısında kullanılan serolojik göstergeler her zaman yeterli bilgiyi vermeyebilir. Özellikle mutant virüslerle meydana gelen enfeksiyonlarda ya da okült (gizli) HBV enfeksiyonu varlığında serolojik yöntemler yetersiz kalmaktadır. Bu gibi durumlarda virüsün varlığının ve aktif viral replikasyonun gösterilmesi için HBV DNA araştırılması gerekmektedir. Ayrıca tanı alan hastalarda antiviral tedavi başlama gerekliliğinin belirlenmesinde ve uygulanan tedavinin takibinde HBV DNA ölçümü gereklidir. HBV DNA'nın ölçümü PCR temelli yöntemlerle kalitatif ve kantitatif olarak yapılabilmektedir (71).

#### 2.1.11. Tedavi

**Akut HBV enfeksiyonunun tedavisi:** Akut hepatit B enfeksiyonunun özgün bir antiviral tedavisi yoktur. Hastalara istirahat önerilir ve destek tedavisi uygulanır. Olası fulminan hepatite gidiş ve karaciğer yetmezliği yönünden hastalar sıkı takip edilir. Fulminan hepatit gelişirse acil karaciğer transplantasyonu endikasyonu doğar (58).

**Kronik HBV enfeksiyonunun tedavisi:** Kronik hepatit B hastalarında uygulanan tedavi ile amaçlanan viral replikasyonun ve enfeksiyona bağlı nekroinflamasyonun önlenmesidir. Tedavi ile HBV DNA seviyesinin ölçülemeyecek düzeye düşürülmesi ve HBeAg pozitif hastalarda HBeAg serokonversiyonu (anti-HBe oluşması) replikasyonun azaldığının, transaminaz düzeylerinin normal değerlere gelmesi de nekroinflamasyona bağlı karaciğer hasarının azaldığının göstergesidir. Uzun vadede tedavinin esas amacı siroz ve HSK'ya gidişin önünü kesmek, bu sayede de hastaların yaşam kalitelerini ve sürelerini uzatmaktır. Tedavide kullanılan ilaçlar immünomodülatörler ve nükleoz(t)id analoglarıdır (36).

Kronik HBV enfeksiyonunun tedavisinde onaylanan ilk ilaç olan "interferon" viral DNA sentezini inhibe eder, antiviral enzimleri aktive eder ve MHC sınıf I antijen ekspresyonunu arttırarak enfekte hücrelerin antijen sunum kapasitelerini yükseltir. Günümüzde tedavi amaçlı kullanılan nükleoz(t)id analogları lamivudin, adefovir, entekavir, tenofovir ve telbivudin olarak sıralanabilir. Genel anlamda etki mekanizmaları DNA sentezinde gerekli olan nükleoz(t)idin yerini alarak zincir sentezini engellemektir. Özellikle ilaç direnci önemli bir problem teşkil etmektedir. Bunun dışında hastanın eşlik eden başka hastalıklarının varlığı veya ortaya çıkması muhtemel ilaç yan etkileri göz önünde bulundurularak tedavide kullanılacak ilacın kararına varılır (72,73).

#### **2.1.12. Koruma**

HBV enfeksiyonuna karşı korunma, ya direkt olarak antikorların verilmesi yoluyla pasif immünizasyonla ya da HBsAg antijeni içeren rekombinant aşılardan uygulanması yoluyla aktif immünizasyonla sağlanmaktadır.

**Pasif immünizasyon:** HBsAg pozitif olduğu tespit edilen anneden doğan bebeklere, HBsAg pozitif kişiyle cinsel teması olanlara, HBsAg pozitif kan veya vücut sıvıları ile perkutan/mukozal teması olanlara, içerisinde anti-HBs hepatit B hiperimmunoglobulini (HBIG) bulunan preparatlar, 100.000-200.000 IU/ml olacak şekilde şeklinde uygulanır (74).

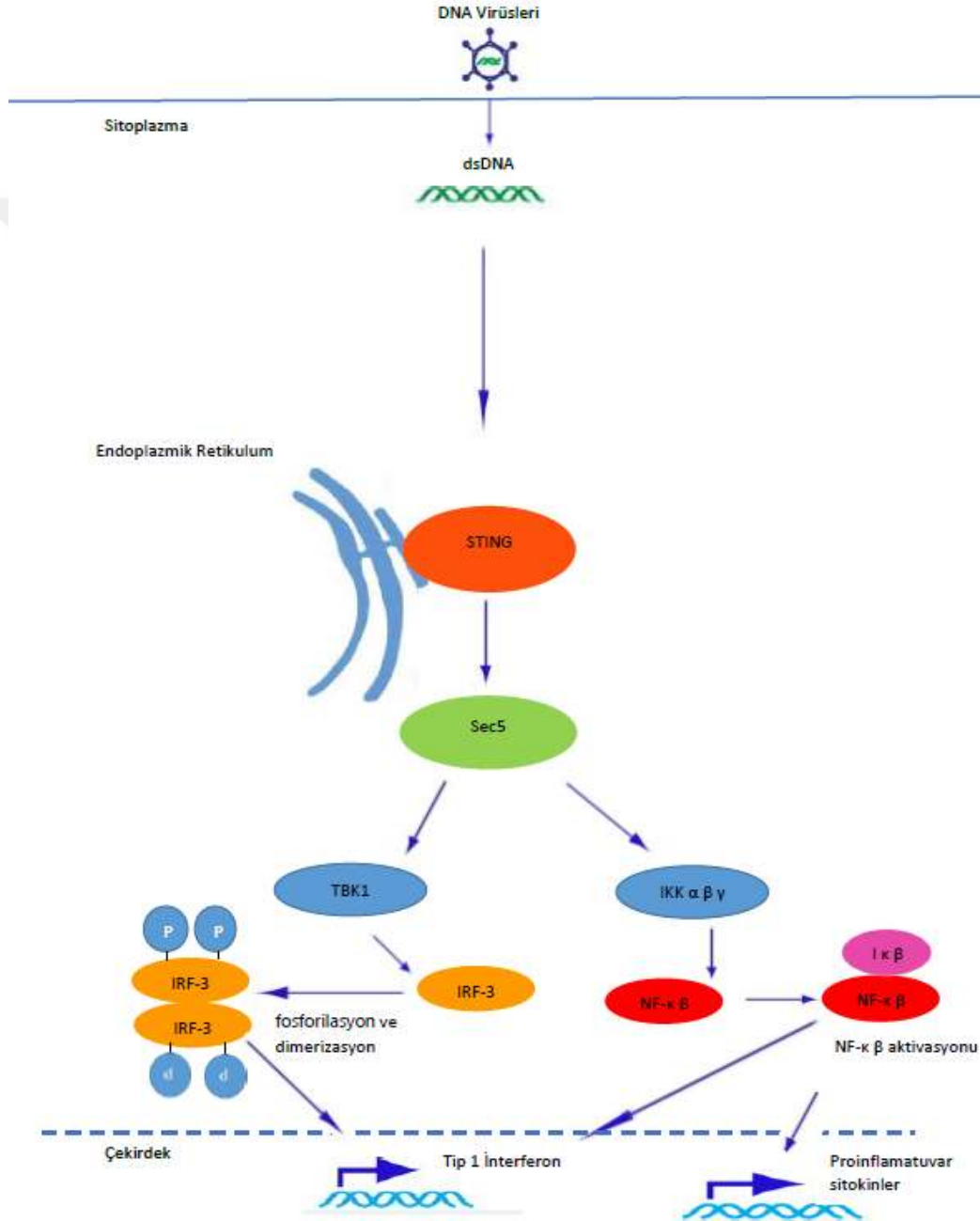
**Aktif immünizasyon:** HBsAg içeren rekombinant aşılardan ülkemizin rutin aşı takviminde yer alır ve her yenidoğana 0, 1 ve 6. aylarda olmak üzere üç doz halinde

uygulanır. Erişkinlerdeki aşılama da yine aynı süre aralıklarında ve aynı dozlarda uygulanır (75). Aşılamayı takiben oluşan anti-HBs düzeyinin 10 IU/L ve üzerinde ölçülmesi kişinin bağışıklığının göstergesi olarak kabul edilir (76).

## 2.2 Stimulator of Interferon Genes (STING)

Doğal immün sistem vücuda mikroorganizmaların girişini fark edip atağa geçmeyi sağlayan, PRR adı verilen algılayıcı reseptörlerle donatılmıştır. Toll benzeri reseptör (*toll like receptor*, TLR), NOD benzeri reseptör (*NOD like receptor*, NLR) ve RIG-I benzeri reseptör (*RIG-I like receptor*, RLR) bu tanıma reseptör ailelerinin en iyi bilinenleridir (77). STING proteini DNA virüsleri başta olmak üzere çeşitli mikrobiyal etkenlerle oluşan enfeksiyonlarda doğal immün yanıtı harekete geçirerek tip I IFN üretimini uyaran bir PRR proteinidir. İnsan vücudunda makrofaj, dentritik hücre, T hücreleri, endotel, epitel ve fibroblast gibi hücrelerde bulunur. Bu protein 379 aminoasit içermekte olup yaklaşık olarak 42 kDa ağırlığındadır. Bir çok transmembran bölge içeren protein, amino terminali ile ER yüzeyine tutunur. Sitoplazmaya doğru serbest uç halinde bulunan karboksi terminali ile sitozoldeki DNA ve siklik dinükleotidlerin (*cyclic di nucleotides*, CDN) varlığını algılar. Siklik diadenozin monofosfat (c-di-AMP) ve siklik digüanozin monofosfat (c-di-GMP) gibi CDN'ler insan hücrelerinde bulunmayıp bakteri hücrelerince ikinci haberci olarak kullanılan moleküllerdir. Siklik GMP-AMP (cGAMP) ise insan hücrelerinde bulunan cGAS enziminin, sitozoldeki DNA ile etkileşime girerek güanozin trifosfat (GTP) ve adenozin trifosfatın (ATP) kullanılması ile oluşturduğu bir CDN'dir. ER zarında homodimer halde bulunan proteinin karboksi terminal uçları arasında bulunan 'V' şeklindeki yarığa sitozoldeki DNA ve CDN'ler bağlandıklarında konformasyonel değişikliğe neden olarak STING proteinini aktifleştirirler. Oluşan cGAMP hücreler arasında bulunan *gap-junction* adlı geçitlerden sentezlendiği hücrenin komşuluğundaki hücrelere geçebilir. Adeta bir "erken uyarıcı" gibi davranarak komşu hücrelerde de STING aracılı antiviral yanıtı başlatır ve viral yayılımı engeller. STING ER zarında ilişki içinde olduğu translokon ilişkili protein (*translocon-associated protein*, TRAP) kompleks ile beraber golgiye oradan da perinükleer endozomlara taşınır. Bu yolculuk sırasında beraberindeki TANK bağlayıcı kinazı (*tank binding*

kinase, TBK) aktifleştirir. Aktifleşen TBK doğal bağışıklığın önemli transkripsiyon faktörlerinden olan Interferon düzenleyici faktör (*interferon regulatory factor*, IRF) 3'ü aktifleştirir ve IFN alfa ve beta yanıtını oluşturur. STING ayrıca bir diğer transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör-kappa B'yi (NF-κB) aktifleştirerek de TNF alfa ve ilişkili sitokin yanıtına katkıda bulunur (şekil 4) (78-81).



şekil 4. STING'in aktivasyon ve etki mekanizması (82 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).

STING'in immün sistemdeki fonksiyonlarını daha iyi anlamak için yapılan çalışmalarda STING proteinine sahip olmayan farelerin bir DNA virüsü olan herpes simpleks virüs (HSV) enfeksiyonuna karşı oluşturdukları IFN alfa, beta ve IL-6 cevabının kontrol grubundan oldukça düşük; HSV'ye bağlı ölüm oranının ise oldukça yüksek olduğu ortaya konmuştur. STING proteinine sahip olmayan farelerin uygulanan DNA aşısına cevap olarak oluşan, serumda  zg l CD8 sitotoksik T hücre serisinin ve IFN gama düzeylerinin kontrol grubundaki farelerden düşük olduğu ortaya konmuştur (5). Yapılan bir diğer fare çalışmasında ise genetik olarak STING proteinine sahip olmayan fare makrofaj hücrelerinin sitoplazmalarında biriken DNA'ya karşı oluşturdukları IFN, TNF alfa ve IL-1 beta cevabının kontrol fare makrofajlarından oldukça düşük olduğu ortaya konmuştur (83). Özetlemek gerekirse yapılan  alışmalar STING'in hem miktarını arttırdığı sitokinler ve kemokinler üzerinden doğal immün yanıtın hem de CD8 T lenfositler üzerinden edinsel immün yanıtın önemli bir aktifleştiricisi olarak görev yaptığını ortaya koymaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hastaların Seçimi

Çalışmamıza 18-65 yaş aralığında olup, kronik hepatit B hastası olan kişiler, HBV'ye karşı doğal bağışık kişiler ve HBV virüsü ile karşılaşmamış normal popülasyondaki sağlıklı kişilerden oluşan 30'ar kişilik üç grup gönüllü dahil edildi. Gönüllüler belirlenirken immün sistemi baskılayacak herhangi bir ilaç kullananlar, kronik hepatit B hastası olup son altı ay içinde HBV'ye yönelik tedavi almış veya halen almakta olanlar, kazanılmış immün yetmezlik sendromu (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS) veya kronik hepatit C hastası olanlar ve son iki hafta içerisinde enfeksiyöz bir hastalık geçirmiş veya halen geçirmekte olanlar çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya alınma kriterlerini karşılayan kişilere çalışma hakkında ayrıntılı bilgi verildi, onamları alındıktan sonra katılmayı kabul edenlere sosyodemografik bilgiler anketi uygulandı.

#### 3.2. Serolojik Analiz

Çalışmaya katılan gönüllülerin serumlarında HBsAg, anti-HBs, anti-HBc IgG, anti-HCV ve anti-HIV serolojik belirteçlerini araştırmak amacıyla ticari olarak temin edilen EIA kitleri (Roche Diagnostics, ABD) kullanıldı. Yöntem, elektrokemilüminesans immünolojik test prensibine dayanmakta olup, analizler üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda gerekli kalibrasyonlar ve günlük kontrol işlemleri yapıldıktan sonra Cobas 6000 e601 Analizör (Roche Diagnostics, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

#### 3.3. Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu

Periferik kandan mononükleer hücrelerin ayrılması için ficol yoğunluk gradiyenti yöntemi kullanıldı (84). Bu amaçla steril, vidalı kapaklı DNaz-RNaz içermeyen 15 mL kapasiteli bir santrifüj tüpüne steril bir pastör pipeti yardımıyla 5 mL lenfosit seperasyon medyumunu (*Lymphocyte Separation Medium*, LSM) (Capricorn Scientific, Almanya) koyuldu. Gönüllülerden alınan tam kan örneğinden steril pastör

pipetiyle 5 mL alınarak yavaşça LSM üzerine bırakıldı. Örnekler 4°C'de, 2.000 rpm'de (755 rcf) 20 dakika (Heraeus Megafuge 1.0 Centrifuge, ABD) frensiz olarak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası plazma ile seperasyon medyumunun ara yüzünde bulutsu bir tabaka şeklinde toplanan PKMNH steril pastör pipetiyle 15 mL kapasiteli steril, vidalı kapaklı DNaz-RNaz içermeyen santrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 10 mL'ye tamamlayacak şekilde fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) (Phosphate Buffered Saline, Oxoid, İngiltere) eklendi. Tüp 4°C'de 4.300 rpm'de (3.493 rcf) 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant steril pastör pipetiyle uzaklaştırıldı. Pellet 1 mL PBS ile süspanse edilerek 1,5 mL'lik steril DNaz-RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Hücreler oda ısısında 1.800 rpm'de (300 rcf) 10 dakika santrifüj edildi (Thermo Electron Corp. Iec Micromax Microcentrifuge, ABD). Santrifüj sonrasında süpernatant steril, DNaz-RNaz içermeyen, filtreli pipet ucu yardımı ile uzaklaştırıldı. Pellet 1 mL PBS içinde süspanse edilerek oda ısısında 1.800 rpm'de (300 rcf) 10 dakika bir kez daha santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı, pellet kısmı 0,4 mL PBS içinde süspanse edildi. Oluşan süspansiyon her birine 0,2 mL olmak üzere iki adet 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılarak ikiye bölündü. Bunlardan biri -80°C'de saklandı, diğeri RNA izolasyonu için kullanıldı.

### 3.4. PKMNH'den RNA İzolasyonu

Çalışmamızda RNA izolasyonu için *PureLink® RNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Kit içeriğinde 50 reaksiyonluk parçalama solüsyonu (*lisis buffer*), yıkama solüsyonu (*wash buffer*) I ve II, RNaz içermeyen su, çevirme kartuşu (*spin cardridge*), koleksiyon tüpü ve toplama (*recovery*) tüpü vardı.

RNA izolasyonu için kitin prospektüsünde yer alan aşağıdaki işlem basamakları sırası ile uygulandı. Tüm çalışma basamaklarındaki pipetasyon işlemleri için RNaz içermeyen, filtreli pipet uçları kullanıldı.

1) RNA izolasyonu için ayrılan 0,2 mL hacimdeki örneğin üzerine RNaz içermeyen, filtreli pipet ucu kullanılarak, taze hazırlanmış %1'lik 2-merkaptotanol içeren 0,2 mL parçalama solüsyonu aktarıldı.

2) Hücrelerin parçalanması için vorteks (MS2 Minishaker, IKA, Almanya) ile 2.500 devirde vortekslendikten sonra oluşan lizat oda ısısında 11.300 rpm'de (12.000 rcf) 2 dakika santrifüj edildi.

3) Süpernatant steril 1,5 mL'lik RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

4) Üzerine 200 µL saf etanol eklendi ve 1.400 devirde yavaşça vortekslendi.

5) Oluşan karışımın tamamı koleksiyon tüpü ile birlikte iç içe bulunan çevirme kartuşuna aktarıldı ve oda ısısında 11.300 rpm'de (12.000 rcf) 15 saniye santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı döküldü.

6) Çevirme kartuşuna 700 µL yıkama solüsyonu I eklendi ve oda ısısında 11.300 rpm'de (12.000 rcf) 15 saniye santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü içinde biriken sıvı ile atılıp çevirme kartuşu yeni bir koleksiyon tüpü içerisine yerleştirildi.

7) Çevirme kartuşuna saf etanol eklenmiş yıkama solüsyonu II'den 500 µL eklendi ve oda ısısında 11.300 rpm'de (12.000 rcf) 15 saniye santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı döküldü. Çevirme kartuşu aynı koleksiyon tüpüne yerleştirildi. Bu işlem basamağı iki kez uygulandı.

8) Çevirme kartuşunun membranının kurutulması amacıyla oda ısısında 11.300 rpm'de (12.000 rcf) 1 dakika santrifüj edildi. Çevirme kartuşu koleksiyon tüpünden alınarak toplama tüpüne yerleştirildi.

9) Çevirme kartuşunun merkezine 100 µL RNaz içermeyen su ilave edildi ve oda ısısında bir dakika bekletildi.

10) Çevirme kartuşu oda ısısında 15.000 rpm'de (21.000 rcf) 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken 100 µL hacimdeki total RNA'dan cDNA sentezi için gerekli olan 5 µL RNA alındıktan sonra kalan kısım -80°C'de muhafaza edildi.

Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları, NanoDrop 2000c spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak ölçüldü. Ölçülen RNA konsantrasyonu 20 ng/µl'den düşük olan örneklerde izolasyon işlemi tekrarlandı. RNA konsantrasyonu 1 µg/µl'in üzerinde ölçülen örnekler ise RNaz içermeyen steril deiyonize su ile sulandırılarak cDNA sentezi için kullanıma hazır hale getirildi.

### 3.5. Komplementer DNA (*Complementary DNA, cDNA*) Sentezi

Çalışmamızda cDNA sentezi için *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific, Litvanya) kullanıldı. İzolasyon işlemi sonucunda elde edilen tek sarmallı RNA'nın cDNA'ya transkripsiyonu; revers transkriptaz (RT) enzimi, reaksiyon tamponu (5X), rastgele (*random*) hekzamer primerler, deoksinükleotid trifosfat (dNTP) karışımı, RNaz inhibitörü ve RNaz içermeyen su muhteva eden cDNA sentez karışımı kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA sentez karışımının içeriği Tablo 1'de belirtildiği gibidir.

Tablo 1. cDNA sentez karışımı içeriği

| cDNA sentez karışımı                  | 1x karışım final konsantrasyonu | 1x karışım (µl) |
|---------------------------------------|---------------------------------|-----------------|
| Reaksiyon tamponu (5X)                | 1x                              | 4               |
| dNTP karışımı (10 mM)                 | 1 mM                            | 2               |
| Random hekzamer primerler<br>(100 µM) | 5 µM                            | 1               |
| RNaz inhibitörü (20 U/µl)             | 20 U                            | 1               |
| RT (20U/µl)                           | 20 U                            | 1               |
| İzole RNA                             |                                 | 5               |
| RNaz içermeyen su                     |                                 | 6               |
| <b>Toplam Hacim</b>                   |                                 | <b>20</b>       |

PKMNH'lerden RNA izolasyon işlemi tamamlandıktan sonra toplama tüpünde elde edilen 100 µL hacmindeki toplam RNA'dan RNaz içermeyen filtreli pipet ucu vasıtasıyla 5 µL alınarak toplam hacmi 15 µL olan cDNA sentez karışımının olduğu tüpe aktarıldı. cDNA sentezi termal döngü cihazında (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, ABD) gerçekleştirildi. Sırası ile şu reaksiyon basamaklarının gerçekleştirilmesi sağlandı. i) 24°C'de 10 dakika inkübe edilerek primerlerin

bağlanması sağlandı. ii) RT enziminin maksimum performans gösterdiği sıcaklık olan 42°C'de 60 dakika inkübe edilerek revers transkripsiyon reaksiyonu gerçekleştirildi. iii) Bir saatin sonunda sıcaklık 70°C'ye çıkartılıp beş dakika inkübe edilerek RT enziminin inaktivasyonu sağlandı. Elde edilen cDNA karışımı PCR işlemi hemen gerçekleştirilemeyecekse -20°C'de işlem gününe kadar muhafaza edildi.

### 3.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

STING geninin ekspresyon düzeyi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (*real time polymerase chain reaction*, RT PCR) kullanılarak belirlendi. Her örnek için eş zamanlı olarak hem izolasyon ve amplifikasyon basamaklarının kontrolünün hem de normalizasyonun sağlanması amacıyla gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geninin ekspresyon düzeyi de belirlendi. RT PCR işlemi her örnek için birbirinden bağımsız PCR tüplerinde STING ve GAPDH için ayrı ayrı ikişer kez gerçekleştirildi.

GAPDH, glikolizin ara basamaklarında gliseraldehit 3-fosfattan 1,3-bisfosfogliserat oluşumunu katalizleyen bir enzimdir (85). Bu enzimi kodlayan gen ise "housekeeping gen" olarak adlandırılan genlerden birisidir. İnsan vücudunda bulunan genlerin yaklaşık %80'i belli zamanlarda ve belli dokularda ekprese olurken, hücrenin temel işlevsel ve biyokimyasal fonksiyonlarında görev alan bu genlerin ekspresyonu hemen her hücrede ve mutlaka olması gerekmektedir (86).

Çalışmamızda GAPDH ekspresyon ölçümü ile hem RNA izolasyon işleminin hem de amplifikasyonun kontrolü sağlandı. Ayrıca STING gen ekspresyon ölçümleri ile eş zamanlı olarak yapılan GAPDH gen ekspresyon ölçümleri oranlanarak normalizasyon işlemi gerçekleştirildi. Normalizasyon işlemi için  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formülü uygulandı (87). Gerçekleştirilen normalizasyon işlemi sayesinde farklı gönüllülerden alınan kanlardan izole edilen PKMNH'lerin başlangıçtaki aktivite ve miktar farklılıklarından doğacak olan ölçüm değişkenliği bertaraf edilmiş oldu.

RT PCR işlemi için LightCycler® 480 System (Roche Molecular Systems, ABD) cihazı kullanıldı. PCR için hazırlanan reaksiyon karışımı hedef genlerin primerleri ile 2X SYBR Green Mix (Biomatik, Kanada) kullanılarak hazırlandı. Sybr green çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresan özellik kazanan bir boya olup, oluşan

PCR ürünü miktarı ile orantılı olarak floresan artışı oluşturur. Ancak her ışıma her zaman anlamlı olmayabilir. Sybr green, primer dimerlerine veya özgül olmayan amplifikasyon ürünleri gibi çift zincirli DNA moleküllerine de bağlanabilir. Çift zincirli DNA'nın %50'sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan sıcaklık erime sıcaklığı (*melting temperature*, T<sub>m</sub>) olarak adlandırılır ve her çift zincirli DNA için kendine özgüdür (88). Sıcaklık artışı ile çift zincirli DNA miktarının azalması floresanın da azalmasına sebep olur. Sıcaklık artışı ile floresan arasındaki bu ilişkiden yola çıkarak "erime eğrisi" (*melting curve*) elde edilir (89). LightCycler® 480 System (Roche Molecular Systems, ABD) cihazı, erime eğrisi analizi yapabilme özelliğine de sahiptir. Çalışmamızda bu özellikten yararlanılarak erime eğrisi analizleri yapıldı ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerine sybr green bağlanmasından kaynaklanan ışımlar ayırt edildi.

Her örnek için STING ve GAPDH amplifikasyonları ikişer bağımsız örnek gibi çalışıldı. Geçersiz olarak değerlendirilen örnekler için PCR işlemi tekrarlandı.

PCR sonunda amplifikasyonların değerlendirilmesi için LightCycler® 480 System'in (Roche Molecular Systems, ABD) Abs Quant/2nd Derivative Max yazılımı kullanıldı. Amplifikasyon sırasında floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı yani oluşan ürünlerdeki ilk anlamlı artışın olduğu döngü "eşik döngü değeri" (*threshold cycle*, Ct) olarak isimlendirilir (90). "Çakışma noktası" (*crossing point*, Cp) ise amplifikasyon sırasında floresan sinyal artışının en yüksek olduğu noktaya karşılık gelir. Cp hemen her zaman amplifikasyonun logaritmik olarak lineerleştiği kısmın tam orta noktasına denk düşer. Böylelikle kullanıcı müdahalesi en aza indirgenmiş olur. Roche LightCycler® 480 System (Roche Molecular Systems, ABD) kataloğunda Cp değerinin Ct değeri ile eş anlamlı olduğu ve ölçümlerde Cp değeri kullanıldığı belirtilmektedir (91). Çalışmamızda STING'in Cp değeri ile GAPDH'ın Cp değeri oranlanarak normalizasyon yapıldı. Deneylerde tüm hasta örnekleri aynı şartlarda ikişer kez çalışılarak analizlerde elde edilen ölçümlerin ortalaması kullanıldı.

Çalışmada kullanılan PCR karışımının içeriği Tablo 2'de, kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri ve uzunlukları Tablo 3'de, PCR reaksiyon basamakları ise Tablo 4'te belirtildiği gibidir.

Tablo 2. RT-PCR karışımının içeriği

| RT-PCR karışımı             | 1x karışım final konsantrasyonu | 1x karışım (µl) |
|-----------------------------|---------------------------------|-----------------|
| 2X SYBR green karışımı      | 1x                              | 12,5            |
| Forward primer µM           | 0,2                             | 0,5             |
| Revers primer (10 pmol/µl)  | 0,2                             | 0,5             |
| cDNA                        |                                 | 4               |
| Distile su (RNaz içermeyen) |                                 | 7,5             |
| <b>Toplam Hacim</b>         |                                 | <b>25</b>       |

Tablo 3. Kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri ve uzunlukları

| Gen     | Oligonükleotid Dizisi   | Baz Çifti | Referans |
|---------|-------------------------|-----------|----------|
| STING F | CTATTTCTACTACTCCCTCCC   | 201       | 92       |
| STING R | CGCAGATATCCGATGTAATATG  |           |          |
| GAPDH F | GGTATCGTGGAAGGACTCATGA  | 188       | 93       |
| GAPDH R | ATGCCAGTGGCTTCCCGTTCAGC |           |          |

Tablo 4. RT PCR döngüsü

|                                  | Sıcaklık | Süre      | Döngü Sayısı |
|----------------------------------|----------|-----------|--------------|
| <b>Ön denatürasyon</b>           | 95°C     | 10 dakika | 1            |
| <b>Denatürasyon</b>              | 95°C     | 15 saniye | } 40         |
| <b>Bağlanma, zincir uzaması,</b> | 60°C     | 1 dakika  |              |
| <b>floresan ölçümü</b>           |          |           |              |
| <b>Erime eğrisi analizi</b>      | 95°C     | 5 saniye  | 1            |
|                                  | 55°C     | 1 dakika  | 1            |
|                                  | 97°C     |           | 1            |

PCR döngüsünün ön denatürasyon basamağında 95°C sıcaklıkta hem DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması hem de enzimin aktivasyonu sağlandı. Takip eden 40 döngü boyunca 95°C'de oluşan DNA primerlerinin birbirinden ayrılması sağlanırken, 60°C'deki 1 dakikalık süreç içinde önce zincirlerin birbirine bağlanması, sonra uzama işlemi gerçekleşir ve en sonunda oluşan floresan ölçümü gerçekleştirildi. 40 döngünün sonunda erime eğrisi analizi işlemi gerçekleştirildi. 95°C'de zincirlerin birbirinden ayrılması sağlandıktan sonra 55°C'de 1 dakika boyunca tekrar zincirlerin birleşmesi sağlanır ve 97°C'ye kadar ısıtma işlemi yapıldı. Her bir derece ısı artışında toplam beş defa floresan ölçümü yapıldı. Bu ölçümlerle primerin kendine özgü erime sıcaklığı belirlendi.

Amplifikasyon ürününün istenilen baz uzunluğunda olup olmadığı agaroz jel elektroforezi ile de incelendi. Agaroz jel elektroforezi için önce 108 g tris base (Tris Buffer AR, SRL, Hindistan), 55 g borik asit (Boric Acid, SRL, Hindistan), 40 mL 0,5 M *etylene diamine tetraacetate* (EDTA, (pH 8.0) (Fisher BioReagents, ABD) distile su ile 1000 mL'ye tamamlanarak 10X konsantrasyonunda stok tris-borik asit-EDTA (TBE) tamponu hazırlandı. Sonra 1X konsantrasyonundaki TBE içinde %2'lik agaroz jel (Agarose RA, Amresco, ABD) mikrodalga fırında eritilerek hazırlandı. Hazırlanan agaroz içine 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromid eklendi. Eriyik, içinde tarakları olan jel kalıbına yerleştirilip donmaya bırakıldı. Agar donduktan sonra tarak çıkarıldı

ve kuyucukların ilk iki ve son ikisine kontrol DNA markırı, diğerklerine hedef ürünler yerleştirildi. Jel 80 volt elektrik akımı uygulanarak 30 dakika yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra oluşan bantlar kontrol DNA markırları yardımı ile ultraviyole transillüminatörde incelenip beklenen ürüne uygun olup olmadıkları değerklendirildi.

### 3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler MS-Excel ortamında kaydedildi. PCR işlemi tamamlandıktan sonra her örnek için  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formülü uygulanarak normalizasyon sağlandıktan sonra elde edilen veriler IBM SPSS 22.0 programı ortamında analiz edildi.

Veriler, gönüllü gruplarına, cinsiyet ve yaş seviyelerine göre sınıflandırıldıktan sonra tanımlayıcı istatistikleri incelendi, sürekli (niceliksel) verilerin merkezi eğilim ölçüleri (ortalama, mod, medyan, standart sapma) ile kategorik verilerin sayı ve yüzdelikleri incelendi.

Çalışma verileri değerklendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların yanı sıra grupların ortalamalarını karşılaştırmak için bağımsız örneklem t testi ile Kruskal Wallis testleri kullanıldı. Ayrıca çalışmanın verileri, açık kaynak kodlu, R Studio istatistiksel paket programı ortamında, "foreign" kütüphanesi yardımı ile ele alındı ve ilgili grafiklerin kodları yazılarak görselleştirildi. Sonuçlar %95'lik güven aralığında,  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyinde değerklendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Demografik veriler

Çalışmaya 18-65 yaş aralığında her biri 30'ar kişiden oluşan üç grup gönüllü dahil edildi. Çalışmaya katılanların 45'i (%50) kadın, 45'i (%50) erkektir. Çalışma gruplarındaki katılımcıların cinsiyetlere göre dağılımları Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Çalışma gruplarının cinsiyetlere göre dağılımları ve yüzdeleri

|                               | Kadın       | Erkek       | Toplam       |
|-------------------------------|-------------|-------------|--------------|
| HBV'ye doğal bağışıklar       | 17 (%56,70) | 13 (%43,30) | 30 (%100,00) |
| HBV ile karşılaşmamış olanlar | 15 (%50,00) | 15 (%50,00) | 30 (%100,00) |
| Kronik hepatit B hastaları    | 13 (%43,30) | 17 (%56,70) | 30 (%100,00) |

Çalışmaya katılan her üç gruptan toplamda 90 gönüllünün yaş ortalaması  $40,90 \pm 10,26$ 'dır. Çalışma gruplarının yaş ortalamaları Tablo 6'da belirtilmiştir.

Tablo 6. Çalışma gruplarının yaş ortalamaları

|                               | Sayı(n) | Yaş Aralığı | Ortalama $\pm$ SD |
|-------------------------------|---------|-------------|-------------------|
| HBV'ye doğal bağışıklar       | 30      | 25-63       | $43,20 \pm 9,52$  |
| HBV ile karşılaşmamış olanlar | 30      | 20-58       | $39,43 \pm 11,32$ |
| Kronik hepatit B hastaları    | 30      | 20-57       | $40,06 \pm 9,79$  |

Çalışmaya katılanlar cinsiyete göre gruplandırıldığında yaş ortalamaları Tablo 7'deki gibidir.

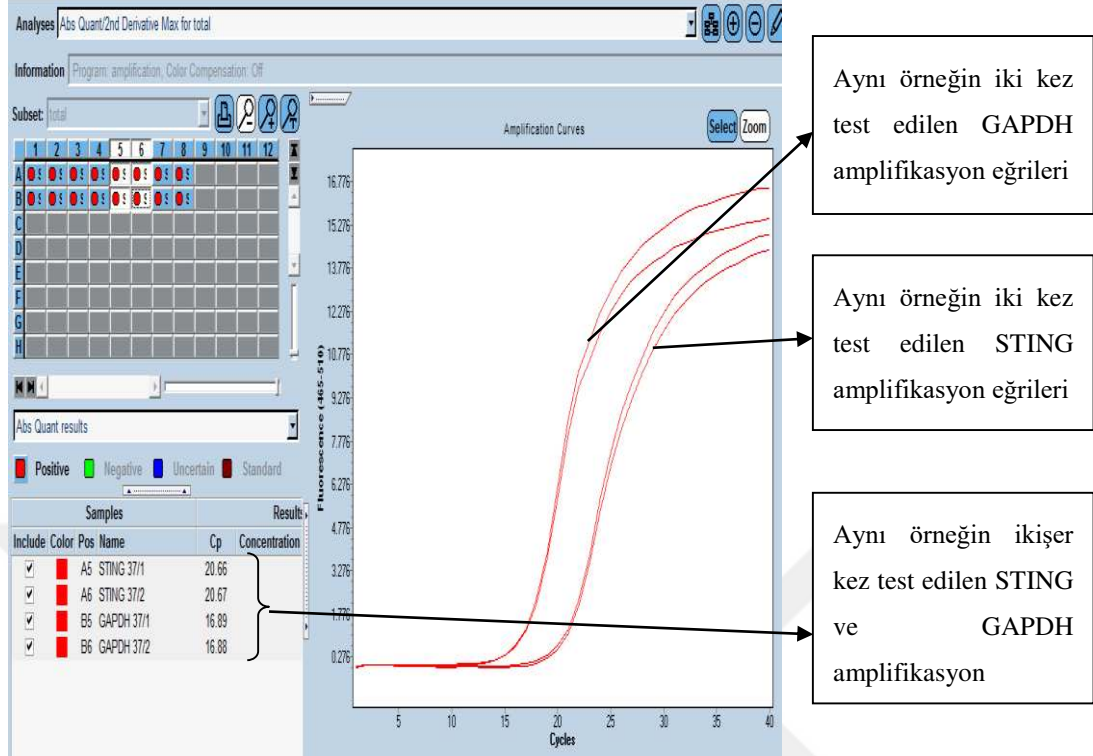
Tablo 7. Katılımcıların cinsiyete göre yaş ortalamaları

|              | Sayı(n) | Yaş Aralığı | Ortalama $\pm$ SD |
|--------------|---------|-------------|-------------------|
| <b>Kadın</b> | 45      | 20-59       | 40,46 $\pm$ 9,99  |
| <b>Erkek</b> | 45      | 21-63       | 41,33 $\pm$ 10,61 |

#### 4.2. Laboratuvar verileri

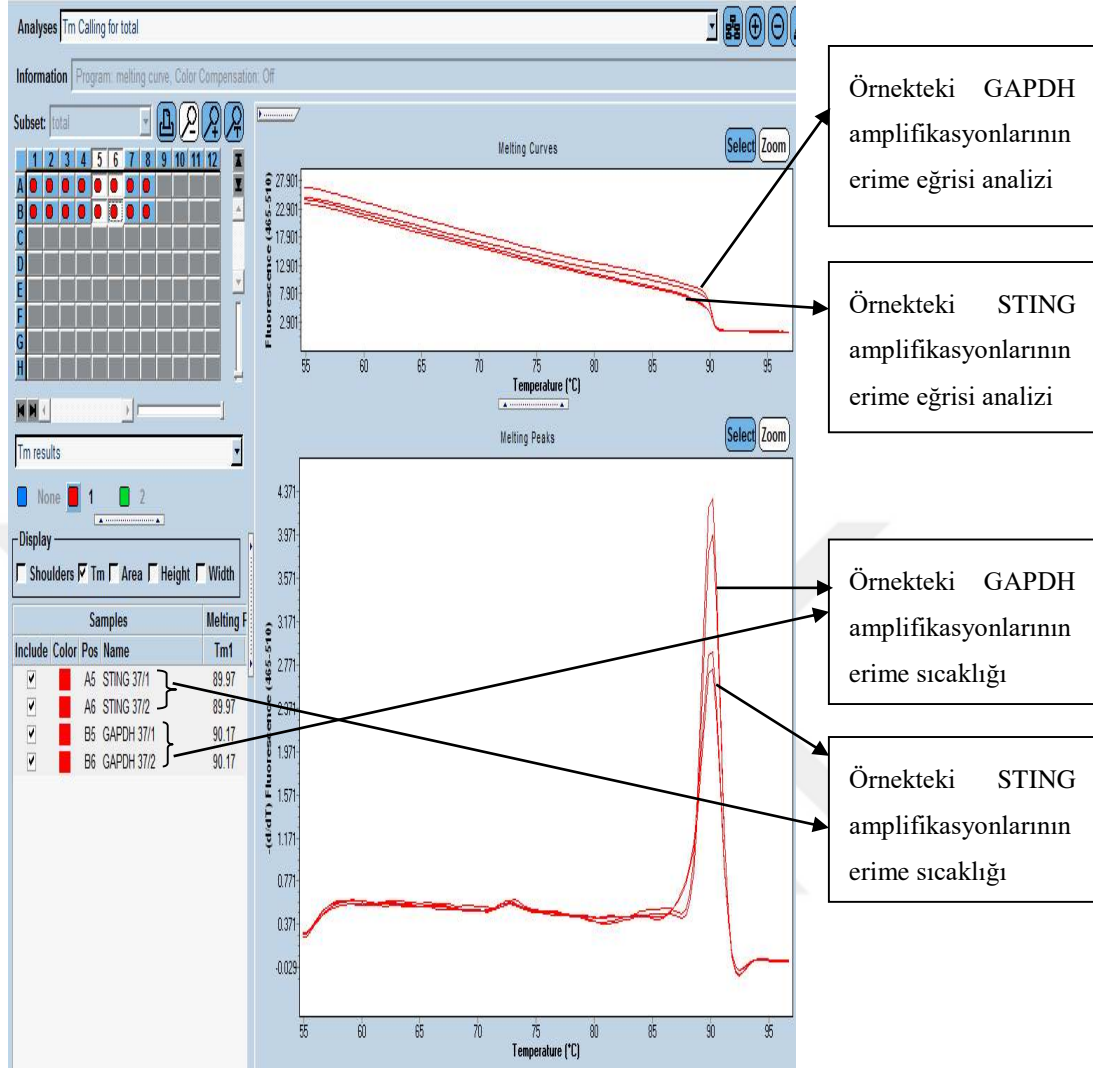
Çalışmaya alınan her örnek için STING gen amplifikasyonları ve kontrol olarak kullanılan GAPDH amplifikasyonları birbirinden bağımsız örnekler gibi ve ikişer kez çalışıldı. Elde edilen amplifikasyonlar LightCycler® 480 System'in Abs Quant/2nd Derivative Max yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Oluşan amplifikasyon eğrileri ve eğrilerin eşik değeri aşıkları Cp değerlerinin bir örneği Şekil 5'teki gibidir.

Şekil 5. PCR işlemi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri ve Cp değerleri örneği



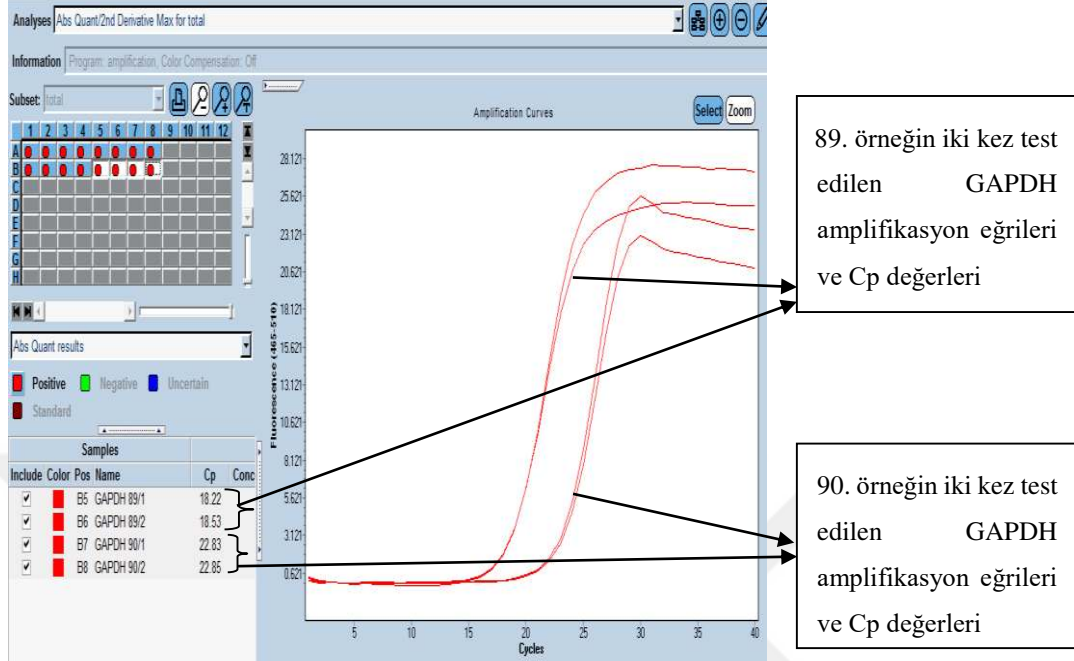
Çalışmamızda elde edilen özgül amplifikasyon eğrilerinin, özgül olmayan PCR ürünlerinin oluşturacağı amplifikasyon eğrilerinden ayırt edilebilmesi için erime eğrisi analizi ve erime sıcaklığı ölçümü yapıldı. Ölçümler sonucunda STING'in erime sıcaklığının ortalama  $90,2 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ , GAPDH'nin erime sıcaklığının ise ortalama  $90,3 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  olduğu tespit edildi. Amplifikasyon eğrileri Şekil 5'te gösterilen örneğin ölçülen erime sıcaklığı ve yapılan erime eğrisi analizi Şekil 6'daki gibidir.

Şekil 6. Erime sıcaklığı ve erime eğrisi analizi örneği

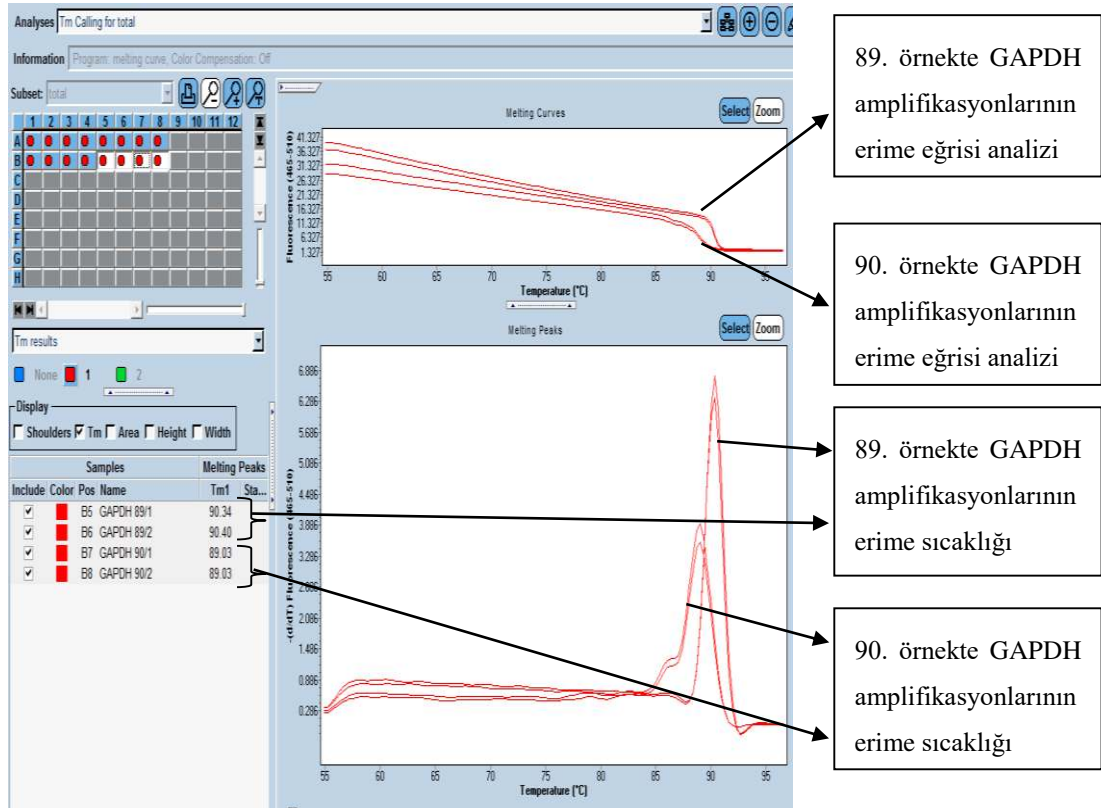


Çalışmamızda test edilen örneklerde erime eğrisi analizi ve erime sıcaklığı beklenen ortalamanın dışında olup, oluşturduğu amplifikasyonların özgül olmadığı tespit edilen örnekler tekrar çalışıldı. Şekil 7'de iki farklı örneğin GAPDH amplifikasyon eğrileri ve eşik değeri aştığı Cp değerleri gösterilmiştir. Farklı gönüllülerden izole edilen PKMNH'lerindeki GAPDH gen ekspresyon düzeyi farklılık gösterebileceği için amplifikasyon eğrilerinde ve Cp değerlerinde farklılık gözlenmesi doğaldır. Ancak tüm örneklerde benzerlik göstermesi gereken GAPDH erime eğrisi ve erime sıcaklığının Şekil 8'de gösterildiği gibi ikinci örnekte beklenenden farklı olduğu tespit edildi. İkinci örnekteki GAPDH amplifikasyon ürününün özgül olmadığı belirlendi ve örnek tekrar test edildi.

Şekil 7. İki farklı örnekte test edilen GAPDH amplifikasyon eğrileri ve Cp değerleri

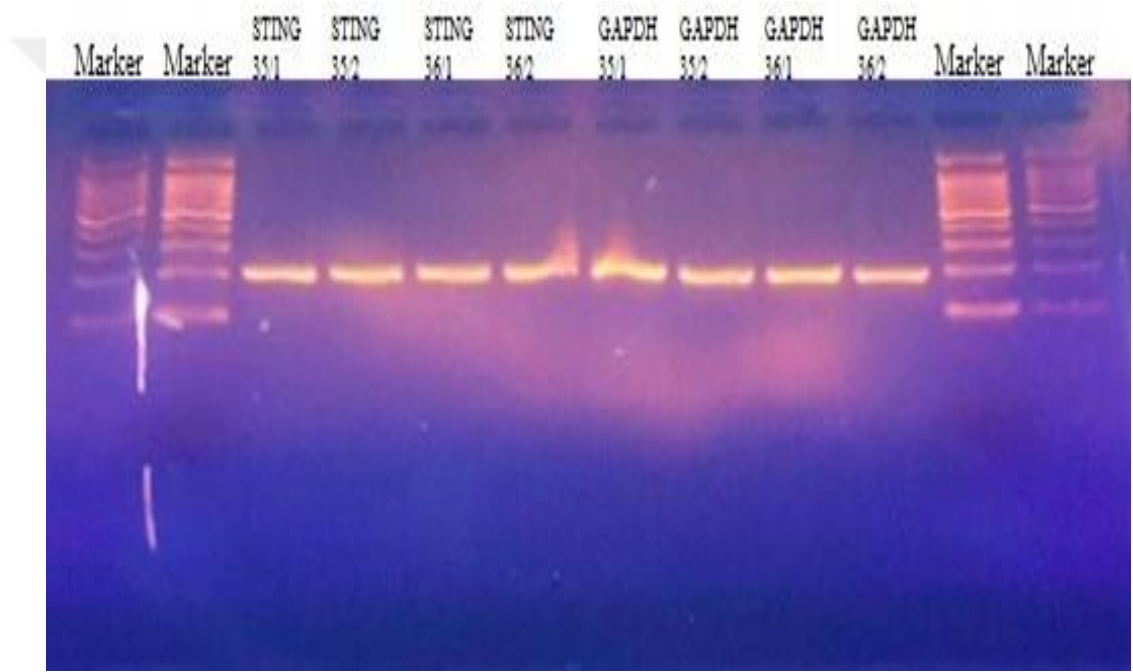


Şekil 8. İki farklı örnekte test edilen GAPDH erime sıcaklığı ve erime eğrisi analizi



Çalışmamızda GAPDH'ın erime sıcaklığı ortalama  $90,3 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  olarak ölçüldü. 89 numaralı örneğin erime sıcaklığı bu ortalama ile uyum gösterirken, 90 numaralı örneğin erime sıcaklığı  $89,3^{\circ}\text{C}$  ölçülmüş olup oluşan PCR ürünün özgül olmadığı değerlendirildi ve örnek tekrar çalışıldı (Şekil 8).

Çalışmamızda erime eğrisi analizinin yanı sıra amplifikasyon ürününün hedeflenen baz uzunluğunda olup olmadığı agaroz jel elektroforezi ile de incelendi. Elde edilen jel elektroforez görüntülerinin bir örneği Şekil 9'daki gibidir.



Şekil 9. PCR sonucu elde edilen STING ve GAPDH amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

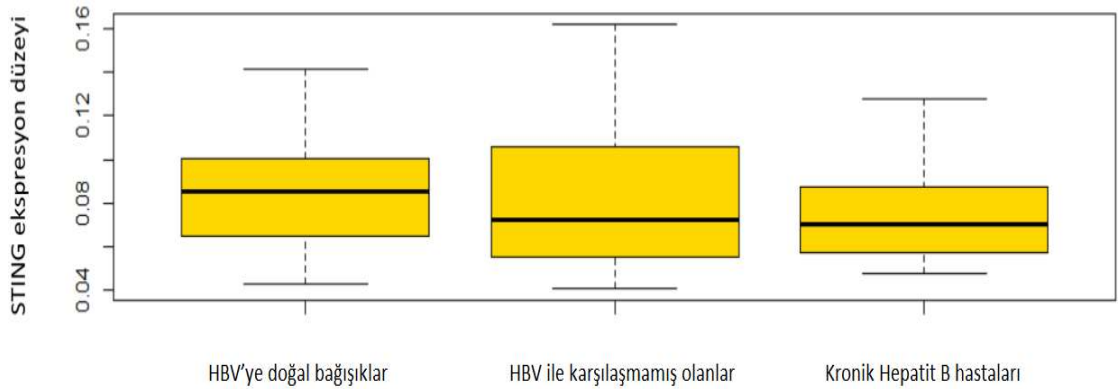
PCR işlemi tamamlandıktan sonra her örnek için STING geninin Cp değerleri ile GAPDH geninin Cp değerleri kullanılarak normalizasyon işlemi gerçekleştirildi. Normalizasyon işlemi için  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formülü uygulandı. Elde edilen verilerle istatistiksel analiz gerçekleştirildi.

### Gönüllülerin gruplara göre STING ekspresyon düzeyleri

Çalışmaya katılan gönüllüler, gruplara göre incelendiğinde, HBV'ye karşı doğal bağışıklardan oluşan grubun STING ekspresyon düzeyi  $0,084\pm0,026$ , HBV ile karşılaşmamış gönüllü grubunun STING ekspresyon düzeyi  $0,082\pm0,032$ , kronik hepatit B hastalarından oluşan grubun STING ekspresyon düzeyi ise  $0,075\pm0,022$  şeklinde bulunmuştur. Grupların STING ekspresyon düzeyleri Tablo 8'de ve Şekil 10'da ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

Tablo 8. Gönüllülerin gruplara göre STING ekspresyon düzeyleri

|                               | Sayı (n) | STING ekspresyon düzeyi aralığı | Ortalama $\pm$ SD |
|-------------------------------|----------|---------------------------------|-------------------|
| HBV'ye doğal bağışıklar       | 30       | 0,043-0,142                     | $0,084\pm0,026$   |
| HBV ile karşılaşmamış olanlar | 30       | 0,040-0,162                     | $0,082\pm0,032$   |
| Kronik hepatit B hastaları    | 30       | 0,047-0,128                     | $0,075\pm0,022$   |



Şekil 10. Gönüllülerin gruplara göre STING ekspresyon düzeyleri

Çalışmaya katılan gönüllüler, gruplara göre incelendiğinde STING ekspresyon düzeyleri Kolmogrov Smirnov testine göre normal dağılım göstermemiş ve parametrik koşulları sağlamamıştır. Buna göre, yapılan Kruskal Wallis testi sonucunda,  $\alpha =$

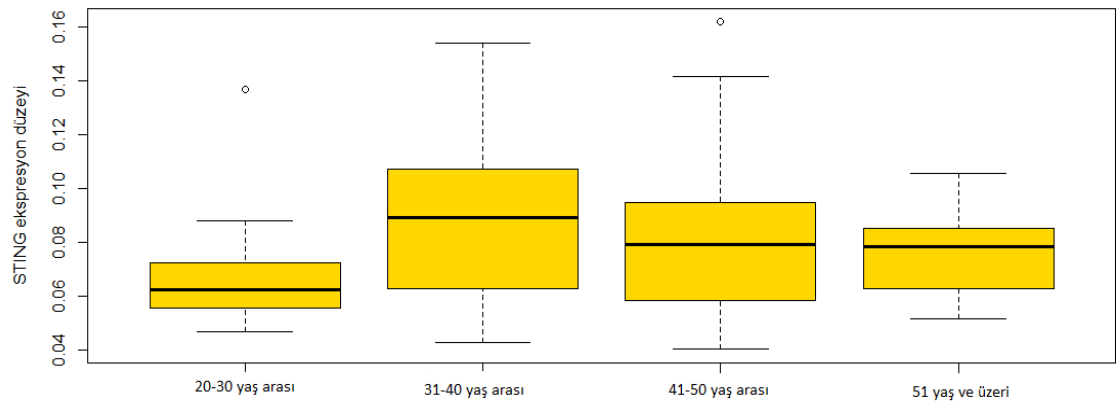
0,05 yanılma düzeyinde, gruplar arasında STING ekspresyon düzeyi ortalamalarında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0,473).

### Gönüllülerin yaşa göre STING ekspresyon düzeyleri

Çalışmamıza katılan gönüllüler, tanı fark etmeksizin, yaşları göz önüne alınarak dekatlar halinde dört gruba ayrılmış ve STING ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. 20 ile 30 yaş arası 16 (%17,8) gönüllü, 31 ile 40 yaş arası 23 (%25,6) gönüllü, 41 ile 50 yaş arası 36 (%40) gönüllü ve 51 yaş üzerinde 15 (%16,7) gönüllü olduğu görülmüştür. Gönüllülerin yaşa göre oluşturulan gruplarının STING ekspresyon düzeyleri Tablo 9'da ve Şekil 11'de ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

Tablo 9. Gönüllülerin yaşa göre oluşturulan gruplarının STING ekspresyon düzeyleri

| Grup yaş seviyeleri | Sayı(n) | STING ekspresyon düzeyi aralığı | Ortalama±SD |
|---------------------|---------|---------------------------------|-------------|
| 20-30 yaş arası     | 16      | 0,047-0,137                     | 0,068±0,021 |
| 31-40 yaş arası     | 23      | 0,043-0,154                     | 0,089±0,031 |
| 41-50 yaş arası     | 36      | 0,040-0,162                     | 0,081±0,028 |
| 51 ve üstü yaş      | 15      | 0,052-0,106                     | 0,075±0,017 |



Şekil 11. Gönüllülerin yaşa göre oluşturulan gruplarının STING ekspresyon düzeyleri

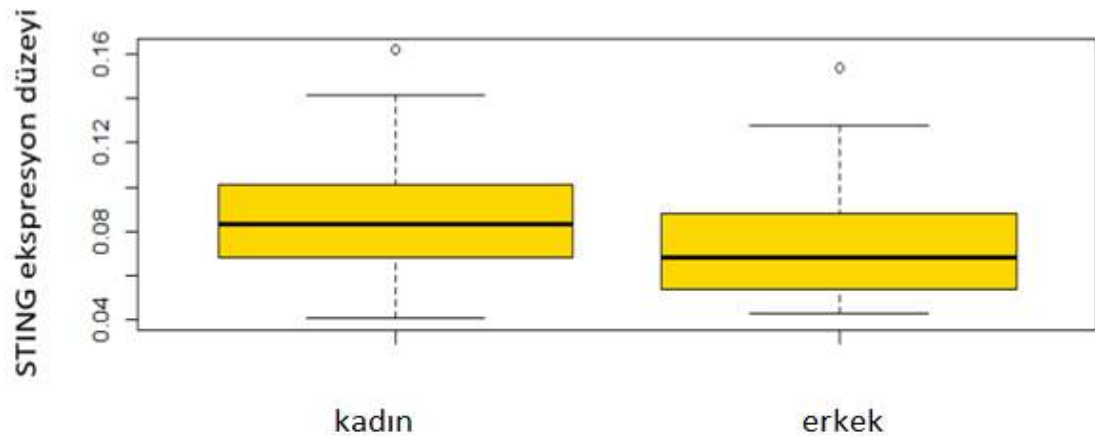
Tanı fark etmeksizin, katılımcıların yaşları dekatlar halinde dört gruba ayrıldığında, STING Ekspresyon düzeyleri normal dağılım göstermemektedir. Buna göre, yapılan Kruskal Wallis testi sonucunda,  $\alpha = 0,05$  yanılma düzeyinde, yaş seviyeleri arasında STING ekspresyon düzeyi ortalamaları arasında anlamlı bir farklılık görülmemektedir ( $p=0,106$ ).

### Gönüllülerin cinsiyete göre STING ekspresyon düzeyleri

Gönüllüler tanı fark etmeksizin cinsiyet durumlarına göre incelendiğinde, STING ekspresyon düzeyleri normal dağılım göstermektedir. Kadınların STING ekspresyon düzeyi ortalamaları  $0,87\pm0,027$ , erkeklerinki  $0,073\pm0,024$  olarak bulunmuştur. Cinsiyete göre oluşturulan grupların STING ekspresyon düzeyleri Tablo 10'da ve Şekil 12'de ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

Tablo 10. Gönüllülerin cinsiyete göre oluşturulan gruplarının STING ekspresyon düzeyleri

| Cinsiyet | Sayı (n) | STING ekspresyon düzeyi aralığı | Ortalama $\pm$ SD |
|----------|----------|---------------------------------|-------------------|
| Kadın    | 45       | 0,040-0,162                     | $0,087\pm0,027$   |
| Erkek    | 45       | 0,043-0,154                     | $0,073\pm0,024$   |



Şekil 12. Gönüllülerin cinsiyete göre oluşturulan gruplarının STING ekspresyon düzeyleri

Cinsiyete göre STING ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması için yapılan bağımsız örneklem t testi sonucuna göre,  $\alpha = 0,05$  yanılma düzeyinde, STING ekspresyon düzeyi ortalamaları arasında anlamlı bir farklılık görülmemektedir ( $p = 0,560$ ).



## 5. TARTIŞMA

Tüm dünyada yaklaşık iki milyar kişinin HBV ile karşılaşmış olduğu, yaklaşık 350-400 milyon kişinin kronik olarak enfekte olduğu ve her yıl yaklaşık bir milyon kişinin de HBV ile ilişkili sebeplerden dolayı hayatını kaybettiği gerçeği hepatit B enfeksiyonunu önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir (1). Günümüzde HBV aşısı DSÖ'nün önerileri doğrultusunda 168 ülkede ulusal aşı programı kapsamında uygulanmaktadır. Buna rağmen 2015-2030 yılları arasında yaklaşık 65 milyon yeni vaka görüleceği tahmin edilmektedir (94,95). Ayrıca, mevcut tedavi seçenekleri ile kronik hastalardan virüsün eradikasyonunun çok düşük oranlarda olması, uzun süreli tedavi gerektirmesi, yan etkilerin fazla olması ve yüksek maliyet gibi sorunlar yeni tedavi arayışlarını doğurmaktadır (96,97).

HBV enfeksiyonundan sonra klinik seyir ve kronikleşme süreci virüs ve konağa ait faktörlere göre değişkenlik göstermektedir. Enfeksiyona neden olan HBV genotipleri ve subgenotipleri viral faktörler arasında sayılabilirken, konağa ait faktörlerin başında ise HBV ile karşılaşma yaşı, cinsiyeti ve konağın immün durumu gelmektedir (49).

HBV genotiplerinin kronikleşme ve klinik gidiş üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışmalarda; A1, C, B2–B4, F1 ve D genotipleri ile olan enfeksiyonlarda siroz ve HSK gelişim riskinin A2, B1 ve B5 genotipleri ile olanlardan daha yüksek olduğu ortaya konmuştur (98,99). Damar içi ilaç kullananlarda görülen akut hepatit B olgularının incelendiği bir çalışmada ise fulminan hepatit gelişen on olgudan dokuzunun genotip D ile enfekte olduğu gösterilmiştir (100). Kronik hepatit B hastalarının PKMNH'lerinde TLR ekspresyon düzeylerinin incelendiği bir çalışmada ise genotip C ile enfekte kişilerde ölçülen TLR2 ekspresyon düzeyinin genotip B ile enfekte kişilerden daha düşük olduğu bulunmuştur. Buradan hareketle genotip C'nin TLR2 ekspresyon düzeyindeki azalmayla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (101). PRR üyelerinden olan TLR2 ekspresyon düzeyinin genotip C ile enfekte hastalarda genotip B ile enfekte olanlara oranla düşük bulunmuş olması bir diğer PRR üyesi olan STING proteininin ekspresyon düzeyinin de farklı genotiplerle olan enfeksiyonlardan etkilenip etkilenmeyeceği sorusunu akla getirmektedir. HBV genotipleri dünya üzerinde coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Ülkemizde genotip D

yaygın genotiptir. Çalışmamızı yürütmüş olduğumuz merkezimizin de içinde bulunduğu Doğu Karadeniz Bölgesinde daha önce 137 hepatit B hastası ile yapılmış olan bir çalışmada tiplendirilebilen 125 örneğin tamamının genotip D olduğu ortaya konmuştur (102). Çalışmamıza katılan kronik hepatit B taşıyıcılarında genotip analizi yapılmamış olmakla birlikte hem ülkemizde hem de bölgemizde daha önce yapılmış olan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda ağırlıklı genotipin genotip D olduğuna, bu nedenle de çalışmamızda genotiplerden kaynaklanan STING gen ekspresyon farklılığının olmadığına dair bir öngörüye sahibiz.

Konağın oluşturduğu immün yanıt enfeksiyonun seyrinde önemli bir faktördür. HBV enfeksiyonunun immünopatogenezi halen tam olarak aydınlatılamasa da kabaca doğal immün yanıtın IFN cevabı ile hem viral replikasyonu baskılaması hem de viral yayılımı sınırlandırması, akabinde edinsel immün yanıtın spesifik CD8 T lenfositler vasıtası ile enfeksiyonu kontrol altında alması şeklinde tasvir edilebilir. HBV'ye karşı immün yanıtta asıl efektör hücreler CD8 T lenfositleridir. CD8 T lenfositler hem enfekte hepatositlerde apoptozu uyarak direkt sitolitik yolla hem de salgıladıkları IFN gama ve TNF alfa vasıtası ile nonsitolitik yolla HBV'ye karşı mücadele etmektedirler (103). Yapılan çalışmalarda hepatit B enfeksiyonlu hastalardan alınan kan örneklerinde HBV'ye özgül CD8 T lenfosit yanıtının viral temizlenmeyi sağlayanlarda etkin ve güçlü olduğu, kronik enfeksiyon gelişen kişilerde ise zayıf ve hasarlı olduğu ortaya konmuştur (104,105). Yüksek viremi ile seyreden hepatit B hastalarında HBV'ye özgül T lenfosit yanıtının baskılanmış olduğu gözlemlenmiştir (106).

Virüs enfeksiyonlarında viral nükleik asitler ve viral proteinler gibi virüs bileşenlerinin konakçının PRR'leri tarafından algılanması ile doğal immün yanıt tetiklenmiş olur. Viral enfeksiyonların doğası gereği konakçının ilk cevabı IFN salınımı olarak ortaya çıkar. IFN alfa ve beta bir taraftan virüsün replikasyonunu baskılayıp diğer hücrelere yayılımını engellerken diğer taraftan da NK hücrelerinin aktivitesini arttırıp, dentritik hücrelerin fonksiyonlarını düzenleyerek doğal immün yanıtın hücresel elemanlarını da harekete geçirir. Aynı zamanda enfekte hücrelerin yüzeyindeki MHC I ekspresyonunu arttırarak CD8 sitotoksik T lenfositlere antijen sunumunu, dolayısıyla enfekte hücreye karşı CD8 T lenfosit yanıtını da uyarır. Bunlara ek olarak T ve B lenfosit gelişimine katkıda bulunur. Yani IFN sadece doğal immün

yanıtı değil aynı zamanda edinsel immün yanıtı da etkinleştirir (97,107). Önceleri var olan HBV'nin doğal immün yanıtı harekete geçirmediğine dair inanış Lucifora ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma ile yıkılmıştır. Çalışma sonucunda HBV enfeksiyonuna yanıt olarak yoğun miktarda IFN oluştuğu ve oluşan IFN cevabının da HBV replikasyonunu baskıladığı ortaya konmuştur (108). Öte yandan doğal immün yanıtın önemli bir hücresel elemanı olan NK hücrelerinin de HBV enfeksiyonunda aktive olduğu, hem direkt hem de IFN salınımı vasıtasıyla viral replikasyonu baskıladığı gösterilmiştir (109). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise TLR7/8/9 ve STING agonistleri kullanılarak intrahepatik doğal immünitenin aktifleştirilmesiyle HBV enfeksiyonunun kontrol altına alınabildiği gösterilmiştir. Hatta buradan hareketle HBV tedavisi için PRR üzerinden doğal immüniteyi aktifleştirecek farmakolojik ajanların kullanıma kazandırılması için oldukça geniş çaplı çalışmalar yürütülmektedir (110).

Doğal immünitenin en önemli sitokinlerinden olan IFN alfa ve IFN beta birçok yolla HBV replikasyonunu baskılar. HBV transkriptlerinin replikasyon için önemli olan viral RT enzimi ve kor proteini gibi viral proteinlere translasyonunu inhibe ederek, pgRNA'nın enkapsidasyonunu inhibe ederek, pgRNA'nın tek zincirli DNA'ya revers transkripsiyonunu engelleyerek, pgRNA ve/veya DNA içeren kapsid formunun degradasyonunu indükleyerek, kor protein dimerizasyonunu önleyerek bunu başarabilir. HBV replikasyonu ve gen ekspresyonu için kritik öneme sahip Enh I ve Enh II elementlerinin aktivitesini azaltarak da HBV'yi baskılar. Bir yandan da APOBEC3A ve APOBEC3B sitidin deaminazlarının miktarını arttırarak HBV'nin hepatosit çekirdeğindeki rezervuarı olarak nitelendirilen cccDNA'nın degradasyonunu sağlar. Yine cccDNA ile birlikte bulunan asetillenmiş histon miktarını azaltarak cccDNA'nın transkripsiyonunu azaltır (3,111-113).

Doğal immün sistemin vücuda mikrobiyal girişi fark edip atağa geçmesini sağlayan algılayıcı PRR reseptörlerinin en bilinenleri TLR, NLR ve RLR'lerdir (77). STING proteini de DNA virüsleri başta olmak üzere çeşitli mikrobiyal enfeksiyonlarda doğal immün yanıtı harekete geçirerek IFN alfa, IFN beta ve TNF alfa başta olmak üzere çeşitli sitokinlerin üretimini uyaran bir PRR proteindir. Amino terminali ile ER yüzeyinde homodimer halde bulunur. Sitoplazmaya doğru serbest uç halinde bulunan karboksi terminalinin uçları arasında bulunan "V" şeklindeki yarığa

sitozoldeki DNA ve CDN'lerin bağlanmasıyla konformasyonel değişikliğe uğrayarak aktifleşir. ER zarında ilişki içinde olduğu TRAP kompleksi ile beraber golgiye, oradan da perinükleer endozomlara taşınır. Bu yolculuk sırasında beraberindeki TBK'yı aktifleştirir. Aktifleşen TBK da doğal immün yanıtın önemli transkripsiyon faktörlerinden olan IRF3'ü aktifleştirerek IFN alfa ve beta yanıtını oluşturur. STING ayrıca bir diğer transkripsiyon faktörü olan NF- $\kappa$ B'yi aktifleştirerek de TNF alfa ve ilişkili diğer proinflamatuvar sitokin-kemokin yanıtına katkıda bulunur (78-81,97). Doğal immün yanıt üzerine olan bu uyarıcı etkilerinin yanı sıra etken spesifik CD8 sitotoksik T hücre serisini ve IFN gama düzeylerini arttırarak da edinsel immün yanıt üzerine uyarıcı etki yapar. Yani STING bir yandan doğal immün yanıtı etkin bir şekilde aktifleştirirken diğer yandan da edinsel immün yanıtın etkinleşmesine katkıda bulunur.

STING proteininin immün sistemde miktarını arttırdığı ve etkinleştirdiği elemanlar göz önünde bulundurulduğunda HBV'nin vücuttan temizlenmesinde etkin rol oynayabileceği düşünülmüştür. Nitekim STING agonisti DMXAA kullanılarak yapılan bir çalışmada makrofaj hücre kültürünün STING agonisti ile muamele edildikten on iki saat sonra makrofajlardan salınan sitokinlerin bulunduğu besiyeri toplanmış, bu besiyeri HBV ile enfekte hepatosit hücre kültür ortamına uygulandıktan iki gün sonra yapılan ölçümlerde hepatositlerdeki kapsid ilişkili HBV DNA, pregenomik RNA, kapsid proteini ve kor proteini miktarının azaldığı ortaya konmuştur. Agonistin HBV'ye karşı oluşturduğu bu etkinin IFN alfa ve IFN betanın HBV'ye karşı oluşturduğu etkiye benzer olduğu ve monoklonal antikorlar kullanılarak hepatositlerde IFN reseptörlerinin bloklanması sonucunda DMXAA'nın oluşturduğu bu antiviral etkinin belirgin derecede kaybolduğu gösterilmiştir. Aynı çalışma kapsamında HBV ile enfekte fareler iki gruba ayrılıp bir gruba periton yolu ile STING agonisti, diğer gruba ise plasebo enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan yaklaşık bir gün sonra yapılan ölçümlerde STING agonisti enjekte edilen gruptaki farelerin hepatositlerinde HBV DNA miktarının kontrol grubundaki farelere oranla 13 kat daha az olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgulardan hareketle STING agonistlerinin HBV'ye karşı immünoterapi için iyi birer molekül olabileceği ileri sürülmüştür (114).

Genetik olarak STING proteinine sahip olan ve olmayan fareler kullanılarak yapılan bir çalışmada tüm fareler bir DNA virüsü olan HSV ile enfekte edildikten

sonra izleme alınmıştır. STING proteinine sahip olmayan farelerin HSV enfeksiyonuna karşı oluşturdukları IFN alfa, IFN beta ve IL-6 cevabının kontrol grubundaki farelerden oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Bir haftalık takip sonucunda STING proteinine sahip olmayan farelerin tamamının HSV enfeksiyonu nedeni ile öldüğü, kontrol grubundaki farelerin ise %80'inin yaşamaya devam ettiği gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada farelere iki doz DNA aşısı uygulandıktan sonra alınan kan örneklerinden yapılan ölçümlerde STING proteinine sahip olmayan farelerin serumlarındaki spesifik CD8 sitotoksik T hücre serisinin ve IFN gama düzeylerinin kontrol grubundaki farelerden çok daha düşük olduğu ortaya konmuştur (5).

Bir diğer çalışmada ise farklı serilerdeki akciğer bronşial epitel hücre kültürleri kullanılarak IFN stimulator genlerin ekspresyon düzeyleri ile influenza virüsü enfeksiyonuna karşı direnç arasında ilişkisi varlığı araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan farklı serilerdeki bronşial epitel hücre kültürleri aynı miktarda influenza virüsü ile enfekte edildiğinde BEAS-2B hücre kültür serisinin enfeksiyona diğer hücre kültür serilerinden daha dirençli olduğu ve daha az sayıda hücrenin influenza virüsü ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. Henüz influenza virüsü ile karşılaşmadan önceki dönemde yapılan ölçümlerde BEAS-2B hücrelerinde STING, IRF7 ve IFN stimulator genlerinin bazal ekspresyon düzeylerinin diğer hücre kültürlerinden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu yüksekliğin influenza virüsü enfeksiyonuna karşı dirençte rol oynadığı ileri sürülmüştür (92).

Gerek STING proteininin bazal ekspresyon düzeyindeki yüksekliğin enfeksiyonu önleyici etkisinin gösterildiği, gerek STING proteinine sahip olmayan farelerin HSV enfeksiyonuna yeterli sitokin cevabı oluşturamayıp tamamının öldüğünün gösterildiği, gerekse STING agonisti kullanılarak HBV'nin enfekte hepatosit hücre kültürlerinde ve farelerde elimine edildiğinin gösterildiği bu çalışmalar STING ekspresyon düzeyi ile HBV enfeksiyonunun klinik seyri ve kronikleşmesi arasında bir ilişki olabilir mi sorusunu akla getirmektedir.

Çalışmamızda STING proteininin HBV'ye karşı oluşan immün yanıtta ve akut enfeksiyon sonrası viral temizlenmenin sağlanıp bağışıklık geliştirilmesinde rolünün olup olmadığının ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla kronik hepatit B hastası

olan, HBV'ye karşı doğal bağışıklık geliştiren ve HBV virüsü ile karşılaşmamış normal popülasyondaki sağlıklı kişilerden oluşan üç grup gönüllüden alınan kan örneklerindeki PKMNH'leri izole edildikten sonra bu hücrelerdeki STING genlerinin bazal ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır.

Çalışmamız kapsamındaki grupların STING ekspresyon düzeyi ortalamalarının HBV'ye karşı doğal bağışık kişilerde:  $0,084 \pm 0,026$ , kronik hepatit B hastası olan kişilerde:  $0,075 \pm 0,022$ , HBV virüsü ile karşılaşmamış normal popülasyondaki sağlıklı kişilerde:  $0,082 \pm 0,032$  olduğu tespit edilmiştir. STING ekspresyon düzey ortalaması doğal bağışık grupta kronik hepatit B'li gruptan yaklaşık %10 daha yüksek bulunmuştur. Ancak yapılan istatistiksel analiz sonucunda her üç grup arasında STING ekspresyon düzeyleri bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p=0,473$ ).

Kronik hepatit B taşıyıcıları ile sağlıklı gönüllülerin periferik dendritik hücrelerdeki PPR üyelerinden olan TLR9'un ekspresyon düzeylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada kronik hepatit B taşıyıcılarında sağlıklı gönüllülere oranla TLR9 ekspresyon düzeylerinin anlamlı şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada TLR9 ekspresyon düzeylerindeki azalma ile korele bir şekilde IFN alfa üretiminde de azalma olduğu gözlemlenmiş ve periferik dendritik hücrelerdeki TLR9 ekspresyon seviyelerindeki azalmanın viral persistansa katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür (115).

Tedavisiz hepatit B taşıyıcıları ile sağlıklı gönüllülerden oluşan iki grup arasında yapılan ve PKMNH'lerinde TLR1-10 ekspresyon düzeylerinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada taşıyıcılarda TLR2 ekspresyon düzeylerinin sağlıklı gönüllülerdekinden anlamlı şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir. PKMNH'lerin özgül TLR ligandları kullanılarak uyarılması sonucunda üretilen proinflatuar sitokinlerin miktarı ölçüldüğünde hem TLR2 hem de TLR4 uyarımı sonucu üretilen sitokin miktarının kronik hepatit B taşıyıcılarında sağlıklı gönüllülere oranla daha düşük olduğu gözlenmiştir. İki grubun TLR4 ekspresyon düzeyleri arasında fark olmamasına rağmen spesifik liganda cevaben hepatit B taşıyıcılarında daha düşük miktarda sitokin üretimi olması nedeniyle TLR4 sinyal yolağında fonksiyonel bir hasar olduğu ileri sürülmüştür (101). Bu durumun hepatit B enfeksiyonunun kronikleşmesine katkıda bulunabileceği ifade edilmiştir. Bu

çalışmada TLR4 ekspresyon düzeyleri bakımından iki grup arasında fark olmaksızın fonksiyonel açıdan yetersizlik gözlemlenmiş olması bizim çalışmamızda da STING ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmasa da fonksiyonel bir yetersizlik söz konusu olabilir mi sorusunu akla getirmektedir.

Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada STING proteinindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin CDN'lerin tetiklediği immün cevapta farklılık oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır. Çalışmada sağlıklı insan popülasyonunda HAQ (%20,4), R232H (%13,7), AQ (%5,2) ve R293Q (%1,5) gibi polimorfizmlerin görüldüğü belirtilmiştir. Görülen bu polimorfizmlerin STING ekspresyon düzeyini etkilemediği; ancak CDN'lere cevaben IFN ve NF- $\kappa$ B'yı aktive edici etkinin farklı oranlarda olmakla birlikte tüm polimorfizmlerde azaldığı gözlemlenmiştir (116). Çalışmada STING proteininin ekspresyon düzeyinde farklılık gözlenmeksizin polimorfizme bağlı fonksiyonel kapasitesinin azaldığının gösterilmesi gerçeği bizim çalışmamızda da her ne kadar kronik hepatit B hastaları ile doğal bağışıklar arasında STING proteinin ekspresyon düzeyi ortalamaları açısından farklılık gözlenmese de proteinin fonksiyonel kapasitesinde bir azalma söz konusu olabileceğini düşündürmüştür. Konunun netliğe kavuşturulması amacı ile kronik hepatit B hastalarında STING proteininde fonksiyonel bir yetersizliğe sebep olabilecek polimorfizm olup olmadığı araştırılması gereken noktalardan biridir.

Hepatit B enfeksiyonunun kronikleşme sürecine toplumda görülen immün sistemin bileşenlerindeki polimorfizmin etkisinin araştırıldığı çalışmalarda HLA-DPA1 rs3077, HLA-DPB1 rs9277535, HLA-DRB1 11/12 aleli ve HLADQB1 0301 polimorfizmlerinin HBsAg gibi antijenlerin sunumunda aksaklığa sebep olarak enfeksiyonun kronikleşmesine yatkınlığı arttırdığı gösterilmiştir (117,118).

Çeşitli çalışmalarda TNF alfa, IFN gama, IL-16 ve IL-18 gibi sitokinlerde, TLR-IFN sinyal yolağının çeşitli basamaklarında ve HLA rs3077, rs2856718, rs9277535, rs7453920 polimorfizmlerinin hepatit B enfeksiyonunun kronikleşmesine yatkınlığı arttırdığı ortaya konmuştur (119-122).

İmmün sistemin çeşitli elemanlarında görülen bu polimorfizmlerden dolayı yeterli immün yanıtın geliştirilemeyip enfeksiyonun kronikleşmeye yönelmesi STING polimorfizminin de benzer bir etkisinin varlığının araştırılmasını cazip kılmaktadır.

Hepatit B enfeksiyonunun kronikleşme sürecine etki eden en önemli konakçı faktörlerinden biri konağın virüsle karşılaşma yaşıdır. Eğer konakçı yeni doğan döneminde virüsle karşılaşır %90 oranında enfeksiyon kronikleşirken, 1-5 yaş arasında gerçekleşen karşılaşmalarda kronikleşme oranı %20-30, erişkin yaştaki karşılaşmalarda ise %5-10'dur. Burada T lenfositlerin zaman içerisinde olgunlaşması ve virüse etkin cevap oluşturabilecek kapasiteye gelmesinin kronikleşme oranının yaşla azalmasında önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (59). Çalışmamıza katılan gönüllüler tanı fark etmeksizin yaşları göz önüne alınarak dekatlar halinde dört gruba ayrılıp, STING ekspresyon ortalamaları değerlendirilmiştir. STING ekspresyon düzeyi ortalamalarının 20-30 yaş aralığındaki kişilerde;  $0,068 \pm 0,022$ , 31-40 yaş aralığındaki kişilerde;  $0,089 \pm 0,032$ , 41-50 yaş aralığındaki kişilerde;  $0,082 \pm 0,028$ , 51 yaş ve üstü kişilerde;  $0,076 \pm 0,017$  olduğu tespit edilmiştir. Değerlendirme sonucunda 31-40 yaş aralığındaki katılımcıların STING ekspresyon ortalamalarının diğer yaş gruplarındaki katılımcıların ortalamalarından daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ancak yapılan istatistiksel analiz sonucunda dört grubun STING ekspresyon ortalamaları arasında anlamlı bir fark görülmediği ortaya konmuştur ( $p=0,106$ ). Çalışmamıza katılanların tamamının erişkin yaş grubunda olması istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemesinin sebebi olabilir. Yenidoğanlar, 1-5 yaş arası çocuklar ve erişkin gönüllülerden oluşan gruplardaki bazal STING ekspresyon düzeylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmanın hepatit B enfeksiyonunun kronikleşme süreciyle STING proteininin ilişkisinin var olup olmadığının belirlenebilmesi için uygun bir çalışma olacağı düşünülmektedir.

Hepatit B enfeksiyonunun doğal seyrine etki eden faktörler arasında konağın cinsiyeti de yer alır. Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda genel olarak kadın hepatit B taşıyıcılarındaki viral yükün erkek taşıyıcılara oranla daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Östrojen, HBV gen ekspresyonunun önemli bir uyarıcısı olan Enh I elementinin aktivitesini azaltarak HBV'nin replikasyonunu baskılar. Ayrıca kadın hepatit B hastalarında HSK gelişme ihtimalinin de erkek hastalara oranla daha düşük olduğu ortaya konmuştur (123). Konu ile ilgili yapılan başka bir çalışmada da kronik hepatit B hastalarından alınan karaciğer biyopsi örnekleri incelenmiş ve NK hücrelerinin yoğunluğunun kadın hastalarda erkek hastalardan anlamlı bir şekilde yüksek olduğu gözlemlenmiştir (124). Cinsiyet ile hepatit B'nin klinik seyri arasındaki

bu ilişkiden yola çıkarak çalışmamıza katılan gönüllüler tanı fark etmeksizin kadın-erkek olarak iki gruba ayrılıp STING ekspresyon ortalamaları değerlendirilmiştir. Kadın katılımcıların STING ekspresyon düzeyi ortalamalarının  $0,087 \pm 0,027$ , erkek katılımcıların ortalamalarının  $0,073 \pm 0,024$  olduğu gözlemlenmiştir. Kadınlardaki STING ekspresyon düzeyi ortalamaları erkeklerden yüksek bulunmakla birlikte yapılan istatistiksel analiz sonucunda iki grubun STING ekspresyon ortalamaları arasında anlamlı bir fark görülmediği tespit edilmiştir ( $p = 0,560$ ).



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda STING gen ekspresyon ortalaması HBV'ye karşı doğal bağışık grupta kronik hepatit B'li hasta grubundan yaklaşık %10 yüksek bulunmuştur. Ancak yapılan istatistiksel analiz sonucunda grupların STING gen ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. İstatistiksel yöntemlerle örneklem büyüklüğü hesaplandığında çalışmaya dahil edilmesi planlanan kişi sayısı toplamda 132 olarak bulunmuştur. Ancak ekonomik kısıtlılıklardan dolayı bu sayıya ulaşamamıştır. Literatürde daha önce yapılmış olan çalışmalar göz önüne alınarak katılımcı sayısı üç grupta 30'ar kişi olarak belirlenmiştir. Maddi yetersizlikten kaynaklı bu durum çalışmamızın ana kısıtlılığıdır. Daha büyük gruplar arasında çalışmanın tekrarlanması STING gen ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında fark olup olmadığının net bir şekilde ortaya konmasında faydalı olacaktır.

Çalışmamıza katılan tüm gönüllüler yaşları göz önüne alınarak dekatlar halinde dört gruba ayrılıp, STING gen ekspresyon ortalamaları değerlendirilmiş ve 31-40 yaş aralığındaki katılımcıların STING gen ekspresyon ortalamalarının diğer yaş gruplarındaki katılımcıların ortalamalarından daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ancak yapılan istatistiksel analiz sonucunda dört grubun STING gen ekspresyon ortalamaları arasında anlamlı bir fark görülmediği saptanmıştır.

Çalışmamıza katılan tüm gönüllüler kadın-erkek olarak iki gruba ayrılıp STING gen ekspresyon ortalamaları değerlendirilmiştir. Kadınların STING gen ekspresyon ortalamaları erkeklerden yüksek bulunmakla birlikte yapılan istatistiksel analiz sonucunda iki grubun STING gen ekspresyon ortalamaları arasında anlamlı bir fark görülmediği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada grupların bazal STING gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmış ve istatistiksel analiz sonucunda anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bununla birlikte hepatit B enfeksiyonunun akut dönemindeki hastalarda STING gen ekspresyon düzeyinin ölçülüp takip eden dönemde doğal bağışıklık geliştirenlerle, enfeksiyonun kronikleştiği kişiler arasında fark olup olmadığının araştırıldığı bir çalışmanın STING proteininin HBV'nin immünopatogenezinde olası rolünü ortaya koymaya yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Farklı HBV genotipleri ile enfekte kronik hepatit B hastalarında STING gen ekspresyon düzeyinin araştırılması da konuya ışık tutacak bir çalışma olacaktır.

Ayrıca kronik hepatit B hastalarında STING proteininde fonksiyonel bir değişime sebep olabilecek polimorfizmin araştırılacağı bir çalışmanın HBV'nin immünopatogenezinde bu proteinin olası rolünü ortaya koymaya destek olacağı düşünülmektedir.



## 7. KAYNAKÇA

1. Deny P, Zoulim F. Hepatitis B virus: From diagnosis to treatment. *Pathologie Biologie*. 2010; 58: 245-53.
2. Hui CK, Lau GKK. Immune system (2; 3) and hepatitis B virus infection. *Journal of Clinical Virology*. 2005; 34(1): 44-8.
3. Pei RJ, Chen XW, Lu MJ. Control of hepatitis B virus replication by interferons and Toll-like receptor signaling pathways. *World Journal of Gastroenterology*. 2014; 20(33): 11618-29.
4. Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, et al. Present and Future Therapies of Hepatitis B: From Discovery to Cure. *Hepatology*. 2015; 62(6): 1893-1908.
5. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon dependent innate immunity. *Nature*. 2009; 461(7265): 788-92.
6. Pappas G, Kiriakos IJ, Falagas ME. Insights into infectious disease in the era of Hippocrates. *International Journal of Infectious Diseases*. 2008; 12: 347-50.
7. Findlay GM, MacCallum FO, Murgatroyd F. Observations bearing on the aetiology of infective hepatitis (so-called epidemic catarrhal jaundice). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1939; 32(5): 575-86.
8. Burns GS, Thompson AJ. Viral Hepatitis B: Clinical and Epidemiological Characteristics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014; 4(12): a024935
9. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*. 2015; 479-480: 672-86.
10. Patlak M, Blumberg B, Hilleman M, Rutter W. The hepatitis B story. *National Academy of Sciences*. 2000. (Erişim Tarihi: 06.04.2017)
11. Değertekin H, Oğuz AK. Akut ve Kronik HBV İnfeksiyonunda Doğal Seyir. *Güncel Gastroenteroloji*. 2010; 14(2): 54-8.
12. Özacar T. Hepatit B Virüsü. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, (editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi içinde*. Üçüncü baskı. Bursa: Nobel Tıp Kitabevi; 2008. s. 1882-1904.
13. Patient R, Hourieux C, Roingeard P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cellular Microbiology*. 2009; 11(11): 1561-70.
14. Block TM, Guo H, Guo JT. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clinical Liver Disease*. 2007; 11(4): 685-706.

- 15.** Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *Journal of General Virology*. 2002; 83: 1267-80.
- 16.** Datta S, Chatterjee S, Veer V, Chakravarty R. Molecular Biology of the Hepatitis B Virus for Clinicians. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2012; 2(4): 353-65.
- 17.** Liang JT. Hepatitis B: The Virus and Disease. *Hepatology*. 2009; 49(5): 13-21.
- 18.** <http://www.hepatitisbviruspage.com/hbvparts.htm> (Erişim Tarihi: 06.04.2017)
- 19.** Mahoney FJ. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999; 12(2): 351-66.
- 20.** şimşek M, Sultan N. Hepatit Virüsleri için Dezenfeksiyon Yöntemleri ve Uygulamaları. *Viral Hepatit Dergisi*. 2013; 19(2): 37-42.
- 21.** Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *International Journal of Medical Sciences*. 2005; 2(1): 50-7.
- 22.** Romano'a L, Paladinia S, Dammeb PV, Zanetti AR. The worldwide impact of vaccination on the control and protection of viral hepatitis B. *Digestive and Liver Disease*. 2011; 43(1): 2-7.
- 23.** Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Journal of Viral Hepatitis*. 2004; 11: 97-107.
- 24.** Papastergiou V, Lombardi R, MacDonald D, Tsochatzis EA. Global Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) Infection. *Current Hepatology Reports*. 2015; 14: 171-8.
- 25.** <https://www.cdc.gov/hepatitis/populations/api.htm> (Erişim Tarihi: 06.04.2017)
- 26.** Akhan S, Aynıoğlu A, Çağatay A, ve ark. Kronik Hepatit B Virusu İnfeksiyonunun Yönetimi: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Viral Hepatit Çalışma Grubu Uzlaşı Raporu. *Klinik Dergisi*. 2014; 27(Özel Sayı 1): 2-18.
- 27.** Akbulut UE, Çakır M. Çocukluk çağında kronik hepatit B virüs enfeksiyonunun uzun dönem seyri. *Türk Pediatri Arşivi*. 2014; 49: 117-23.

- 28.** Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut*. 2015; 64: 1972-84.
- 29.** Horvat RT, Tegtmeyer GE. Çeviren İyigün CP, Avcı İA. Hepatit B ve D virüsleri. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (Editörler) Başustaoğlu A (çev Ed). *Klinik mikrobiyoloji* 9. Baskı, Cilt 2. Ankara. Atlas kitapçılık. 2009;1641-59.
- 30.** Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World Journal of Gastroenterology*. 2007; 13(1): 48-64.
- 31.** Rodriguez-Frias F, Buti M, Tabernero D, Homs M. Quasispecies structure, cornerstone of hepatitis B virus infection: Mass sequencing approach. *World Journal of Gastroenterology*. 2013; 19(41): 6995-7023.
- 32.** Yamazhan T. HBV Enfeksiyonunun Epidemiyolojisi. Kandemir Ö, Danalıoğlu A (editörler). *Hepatit B'den D'ye Hep Güncel- Klinik El Kitabı*. Birinci baskı. İstanbul: Content Ed Net Türkiye; 2015. s. 17-21.
- 33.** Croagh CMN, Desmond PV, Bell SJ. Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance. *World Journal of Hepatology*. 2015; 7 (3): 289-303.
- 34.** Sertöz RY, Erensoy S, Pas S, Özacar T, Niesters H. Restriction fragment length polymorphism analysis and direct sequencing for determination of HBV genotypes in a Turkish population. *New Microbiologica*. 2008; 31: 189-94.
- 35.** Schädler S, Hildt E. HBV Life Cycle: Entry and Morphogenesis. *Viruses*. 2009; 1: 185-209.
- 36.** Noordeen F. Hepatitis B virus infection: An insight into infection outcomes and recent treatment options. *Virus Disease*. 2015; 26(1-2): 1-8.
- 37.** Hu J. Hepatitis B Virus in Human Diseases [<http://www.worldcat.org/title/hepatitis-b-virus-in-human-diseases>] 1. baskı. Editörler Yun-Fan Liaw, Fabien Zoulim, İsviçre: Cham Springer International Publishing, 2016.
- 38.** Castelain S, Descamps V, Brochot E. et al. High association of T1858-G1896 precore mutations with impaired base pairing and high hepatitis B virus DNA levels in HBeAg-negative chronically infected patients. *Archives of Virology*. 2017: doi:10.1007/s00705-017-3312-6

39. Harrison TJ. Hepatitis B Virus: Molecular Virology and Common Mutants. *Seminars in Liver Disease*. 2006; 26(2): 87-96.
40. Feng H, Chen P, Zhao F, Nassal M, Hu K. Evidence for Multiple Distinct Interactions between Hepatitis B Virus P Protein and Its Cognate RNA Encapsidation Signal during Initiation of Reverse Transcription. *PLoS ONE*. 2013; 8(8): e72798.
41. Zhang XD, Wang Y, Ye LH. Hepatitis B virus X protein accelerates the development of hepatoma. *Cancer Biology and Medicine*. 2014; (11): 182-90.
42. Yan H, Zhong G, Xu G. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*. 2012; 1: e00049
43. Rabe B, Vlachou A, Pante N, Helenius A, Kann M. Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100(17): 9849-54.
44. Gish RG, Given BD, Lai CL, et al. Chronic hepatitis B Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. *Antiviral Research*. 2015; 121: 47-58.
45. Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *Journal of Hepatology*. 2010; 52: 282-4.
46. Tan Z, Pionek K, Unchwaniwala N, Maguire ML, Loeb DD, Zlotnick A. The Interface between Hepatitis B Virus Capsid Proteins Affects Self- Assembly, Pregenomic RNA Packaging, and Reverse Transcription. *Journal of Virology*. 2015; 89(6): 3275-84.
47. Dandri M, Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut*. 2012; 61(1): 6-17.
48. Valaydon Z, Pellegrini M, Thompson A, Desmond P, Revill P, Ebert G. The role of tumour necrosis factor in hepatitis B infection: Jekyll and Hyde. *Clinical & Translational Immunology*. 2016; 5: e115; doi:10.1038/cti.2016.68
49. <http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-natural-history-of-hepatitis-b-virus-infection> (Erişim Tarihi: 28.03.2017)
50. Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection and long-term outcome under treatment. *Liver International*. 2009; 29(1): 100-7.
51. Yoshio S, Kanto T. Host–virus interactions in hepatitis B and hepatitis C infection. *Journal of Gastroenterology*. 2016; 51: 409-20.

- 52.** Wu JF, Chang MH. Natural history of chronic hepatitis B virus infection from infancy to adult life -the mechanism of inflammation triggering and long-term impacts. *Journal of Biomedical Science*. 2015; 22:92 doi: 10.1186/s12929-015-0199-y
- 53.** Xia Y, Protzer U. Control of Hepatitis B Virus by Cytokines. *Viruses*. 2017; 9(18): doi: 10.3390/v9010018
- 54.** Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural Killer T Cell Activation Inhibits Hepatitis B Virus Replication In Vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 2000; 192(7): 921-30.
- 55.** Wu J, Meng Z, Jiang M, et al. Hepatitis B Virus Suppresses Toll-like Receptor–Mediated Innate Immune Responses in Murine Parenchymal and Nonparenchymal Liver Cells. *Hepatology*. 2009; 49: 1132-40.
- 56.** Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of Hepatitis B Virus Infection. *Pathologie Biologie*. 2010; 58(4): 258-66.
- 57.** Jung MC, Pap GR. Immunology of hepatitis B infection. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002; 2(1): 43-50.
- 58.** Mohr R, Boesecke C, Wasmuth JC. Hepatitis B. "Hepatology – A clinical textbook" içinde: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H, editör. Yedinci baskı, Hamburg: Medizin Fokus Verlag, 2016, s. 39-54
- 59.** Trépo C, Chan HLY, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2014; 384: 2053-63.
- 60.** Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. Hepatitis B Virus Infection: Epidemiology and Vaccination. *Epidemiologic Reviews*. 2006; 28: 112-25.
- 61.** Dua WJ, Liub L, Sunc C, Yub JH, Xiaob D, Lib Q. Prodromal fever indicates a high risk of liver failure in acute hepatitis B. *International Journal of Infectious Diseases*. 2017; 57: 98-103.
- 62.** Gotthardt D, Riediger C, Weiss KH, et al. Fulminant hepatic failure: etiology and indications for liver transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2007; 22(8): 5-8.
- 63.** Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *Journal of Hepatology*. 2008; 48: 335-52.
- 64.** Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2009; 373: 582-92.

- 65.** Neuveut C, Wei Y, Buendia MA. Mechanisms of HBV related hepatocarcinogenesis. *Journal of Hepatology*. 2010; 52: 594-604.
- 66.** Russo FP, Rodríguez-Castro K, Scribano L, Gottardo G, Vanin V, Farinati F. Role of antiviral therapy in the natural history of hepatitis B virus-related chronic liver disease. *World Journal of Hepatology*. 2015; 7(8): 1097-1104.
- 67.** Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 2007; 13(1): 74-81.
- 68.** Song JE, Kim DY. Diagnosis of hepatitis B. *Annals of Translational Medicine*. 2016; 4(18): 338-43.
- 69.** Koa JH. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. 2008; 2(4): 553-62.
- 70.** Gerlich WH. Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology Journal*. 2013; 10: 239-63.
- 71.** Datta S, Chatterjee S, Veer V. Recent advances in molecular diagnostics of hepatitis B virus. *World Journal of Gastroenterology*. 2014; 20(40): 14615-25.
- 72.** Perrillo RP. Overview of Treatment of Hepatitis B: Key Approaches and Clinical Challenges. *Seminars in Liver Disease*. 2004; 24(1): 23-9.
- 73.** Rehermann B, Bertoletti A. Immunological Aspects of Antiviral Therapy of Chronic Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Infections. *Hepatology*. 2015; 61: 712-21.
- 74.** Güçlü E, Geyik MF. Hepatit B Enfeksiyonu ve Korunma. *Konuralp Tıp Dergisi*. 2012; 4(2): 54-8.
- 75.** Bülbül M, Ergüven M, Yasa O, Tombalak NA. Sağlam çocuk polikliniğimize başvuran çocukların rutin aşı ve diğer aşılarda uygulama oran ve düzeninin değerlendirilmesi. *Göztepe Tıp Dergisi*. 2013; 28(4): 171-8.
- 76.** Zanetti AR, Damme PV, Shouval D. The global impact of vaccination against hepatitis B: A historical overview. *Vaccine*. 2008; 26: 6266-73.
- 77.** Ishikawa H, Barber GN. STING an Endoplasmic Reticulum Adaptor that Facilitates Innate Immune Signaling. *Nature*. 2008; 455(7213): 674-8.
- 78.** Barber GN. STING-dependent cytosolic DNA sensing pathways. *Trends in Immunology*. 2014; 35(2): 88-93.

- 79.** Abe T, Barber GN. Cytosolic-DNA-Mediated, STING-Dependent Proinflammatory Gene Induction Necessitates Canonical NF- $\kappa$ B Activation through TBK1. *Journal of Virology*. 2014; 88(10): 5328-41.
- 80.** Burdette DL, Vance RE. STING and the immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nature Immunology*. 2013; 14(1): 19-26.
- 81.** Diner EJ, Vance RE. Taking the STING out of cytosolic DNA sensing. *Trends in Immunology*. 2014; 35(1): 1-2.
- 82.** Barber GN. Innate Immune DNA Sensing Pathways: STING, AIM2 and the Regulation of Interferon Production and Inflammatory Responses. *Current Opinion in Immunology*. 2011; 23(1): 10-20.
- 83.** Ahn J, Gutman D, Saijo S, and Barber GN. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012; 109; 19386-91.
- 84.** Yeşilyurt E, Aslan SÖ, Kalkancı A, Fidan I, Oğan MC, Kuştımur S. Ertapenem ve doripenemin İnsan Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinden Sitokin Salınımına Etkisi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 2013; 43(2): 50-5.
- 85.** Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. 5.baskı. Richard A. Harvey, Denise R. Ferrier. Printed in China. 2011.
- 86.** Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics* . 2013; 54: 391-406.
- 87.** Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*. 2013; 3(3): 71-85.
- 88.** Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR". *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2007; 27: 763-7.
- 89.** Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*. 1997; 245: 154-60.
- 90.** Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006; 27:95-125.
- 91.** <http://www.sabiosciences.com/manuals/RocheLC4801.2.9.11E.pdf> (Erişim Tarihi: 22.06.2017)

- 92.** Seng LG, Daly J, Chang KC, Kuchipudi SV. High Basal Expression of Interferon-Stimulated Genes in Human Bronchial Epithelial (BEAS-2B) Cells Contributes to Influenza A Virus Resistance. PLoS ONE. 2014; 9(10): e109023.
- 93.** Liu Y, Li J, Chen J, et al. Hepatitis B Virus Polymerase Disrupts K63-Linked Ubiquitination of STING To Block Innate Cytosolic DNA-Sensing Pathways. Journal of Virology. 2015; 89(4): 2287-300.
- 94.** Leroy V, Asselah T. Universal hepatitis B vaccination: The only way to eliminate hepatocellular carcinoma? Journal of Hepatology. 2015; 63: 1303-05.
- 95.** Wong GLH, Wong VWS. Eliminating hepatitis B virus as a global health threat. The Lancet. 2016; 16: 1313-4.
- 96.** Michel ML, Deng Q, Mancini-Bourguine M. Therapeutic vaccines and immune-based therapies for the treatment of chronic hepatitis B: Perspectives and challenges. Journal of Hepatology. 2011; 54: 1286-96.
- 97.** Chang KM, Liu M. Chronic hepatitis B: immune pathogenesis and emerging immunotherapeutics. Current Opinion in Pharmacology. 2016; 30:93-105.
- 98.** McMahon BJ. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. Hepatology International . 2009; 3: 334-42.
- 99.** Kramvis A. Genotypes and Genetic Variability of Hepatitis B Virus. Intervirology. 2014; 57: 141-50.
- 100.** Garfein RS, Bower WA, Loney CM, et al. Factors associated with fulminant liver failure during an outbreak among injection drug users with acute hepatitis B. Hepatology. 2004; 40(4): 865-73.
- 101.** Chen Z, Cheng Y, Xu Y, et al. Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. Clinical Immunology. 2008; 128: 400-8.
- 102.** Kaklıkkaya N, Sancaktar M, Güner R, ve ark. Hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in the Eastern Black Sea region of Turkey. Saudi Medical Journal. 2012; 33 (6): 622-626.
- 103.** Bertoletti A, Gehring AJ. The immün response during hepatitis B virus infection. Journal of General Virology. 2006; 87: 1439-49.

- 104.** Boni C, Fisicaro P, Valdatta C, et al. Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Specific T-Cell Dysfunction in Chronic HBV Infection. *Journal of Virology*. 2007; 81(8): 4215-25.
- 105.** Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Activated Intrahepatic Antigen-Presenting Cells Inhibit Hepatitis B Virus Replication in the Liver of Transgenic Mice. *The Journal of Immunology*. 2002; 169: 5188-95.
- 106.** Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut*. 2012; 61: 1754-64.
- 107.** Chen J, Yuan Z. Interplay between hepatitis B virus and the innate immune responses: implications for new therapeutic strategies. *Virologica Sinica*. 2014; 29 (1): 17-24.
- 108.** Lucifora J, Durantel D, Testoni B, Hantz O, Levrero M, Zoulim F. Control of Hepatitis B Virus Replication by Innate Response of HepaRG Cells. *Hepatology*. 2010; 51: 63-72.
- 109.** Valaydon Z, Pellegrini M, Thompson A, Desmond P, Revill P, Ebert G. The role of tumour necrosis factor in hepatitis B infection: Jekyll and Hyde. *Clinical & Translational Immunology*. 2016; 5(12): e115.
- 110.** Chang J, Guo J-T. Treatment of chronic hepatitis B with pattern recognition receptor agonists: Current status and potential for a cure. *Antiviral Research*. 2015; 121: 152-159.
- 111.** Wieland SF, Guidotti LG, Chisari FV. Intrahepatic Induction of Alpha/Beta Interferon Eliminates Viral RNA-Containing Capsids in Hepatitis B Virus Transgenic Mice. *Journal of Virology*. 2000; 74(9): 4165-73.
- 112.** Lucifora J et al. Specific and Nonhepatotoxic Degradation of Nuclear Hepatitis B Virus cccDNA. *Science*. 2014; 343: 1221-8.
- 113.** Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Novel therapeutic approaches for hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *World Journal of Gastroenterology*. 2015; 21(23): 7084-8.
- 114.** Guo F, Han Y, Zhao X, et al. STING Agonists Induce an Innate Antiviral Immune Response against Hepatitis B Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015; 59(2): 1273-81.

- 115.** Xie Q, Shen HC, Jia NN, et al. Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9. *Microbes and Infection*. 2009; 11: 515-23.
- 116.** Yi G, Brendel VP, Shu C, Li P, Palanathan S, et al. Single Nucleotide Polymorphisms of Human STING Can Affect Innate Immune Response to Cyclic Dinucleotides. *PLoS ONE*. 2013; 8(10): e77846.
- 117.** Matsuura K, Isogawa M, Tanaka Y. Host Genetic Variants Influencing the Clinical Course of Hepatitis B Virus Infection. *Journal of Medical Virology*. 2016; 88:371-9.
- 118.** Wang L, Zou ZQ, Wang K. Clinical Relevance of HLA Gene Variants in HBV Infection. *Journal of Immunology Research*. 2016; doi: 10.1155/2016/9069375.
- 119.** He D, Tao S, Guo S, et al. Interaction of TLR–IFN and HLA polymorphisms on susceptibility of chronic HBV infection in Southwest Han Chinese. *Liver International*. 2015; 35: 1941-9.
- 120.** Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. *World Journal of Gastroenterology*. 2003; 9(4): 641-4.
- 121.** Li S, Deng Y, Chen ZP, et al. Genetic polymorphism of interleukin-16 influences susceptibility to HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Infection, Genetics and Evolution*. 2011; 11: 2083-8.
- 122.** Motavaf M, Safari S, Alavian SM. Interleukin-18 Gene Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Chronic Hepatitis B Infection: A Review Study. *Hepatitis Monthly*. 2014; 14(7): e19879.
- 123.** Montella M, D’Arena G, Crispo A, et al. Role of Sex Hormones in the Development and Progression of Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Endocrinology*. 2015; doi:10.1155/2015/854530.
- 124.** Macek JZ, Decaens T, Marlu A, Marche H, Jouvin-Marche E, Marche PN. Sex Differences in Spontaneous Degranulation Activity of Intrahepatic Natural Killer Cells during Chronic Hepatitis B: Association with Estradiol Levels. *Mediators of Inflammation*. 2017; doi:10.1155/2017/3214917.