

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK BAKTERİYOLOJİ VE İNFEKSİYON HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Mehmet BİTİRGEN

Anabilim Dalı Başkanı

HBeAg negatif Kronik Hepatit B hastalarında hastalığın ciddiyeti ve antiviral
tedaviye yanıtının belirlenmesinde Tümör Nekrosis Faktör alfa promotor
polimorfizmlerinin rolü

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ahmet Çağkan İNKAYA

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Emel TÜRK ARIBAŞ

Konya, 2007

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK BAKTERİYOLOJİ VE İNFEKSİYON HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Mehmet BİTİRGEN

Anabilim Dalı Başkanı

HBeAg negatif Kronik Hepatit B hastalarında hastalığın ciddiyeti ve antiviral
tedaviye yanıtının belirlenmesinde Tümör Nekrosis Faktör alfa promotor
polimorfizmlerinin rolü

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ahmet Çağkan İNKAYA

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Emel TÜRK ARIBAŞ

Konya, 2007

1. İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. İÇİNDEKİLER.....	i
2. KISALTMALAR.....	iii
3. GİRİŞ.....	1
4. GENEL BİLGİLER.....	2
4.1. Hepatit B Virüsü	2
4.1.1. Epidemiyoloji.....	2
4.1.2. Viroloji.....	3
4.1.2.1 Genom Yapısı.....	4
4.1.2.2 HBV Moleküler yapısı.....	5
4.1.2.3 HBV zarf proteini.....	5
4.1.2.4 HBV kor proteini.....	5
4.1.2.5 HBV polimeraz.....	6
4.1.2.6 HBx proteini.....	6
4.1.3 HBV Replikasyon Stratejisi.....	6
4.2 HBV enfeksiyonunun klinik seyri.....	7
4.2.1 Akut HBV Enfeksiyonunun seyri.....	7
4.2.2 Kronik HBV Enfeksiyonu... ..	8
4.2.2.1 Kronik HBV Enfeksiyonunun seyri.....	8
4.2.2.2 Kronik HBV Enfeksiyonunun Tanısı.....	10
4.2.2.3 Karaciğer Biyopsisi ve Histolojisi.....	11
4.3 Kronik Hepatit B tedavisi.....	13
4.3.1 İnterferon alfa.....	13
4.3.2 Pegile İnterferon alfa.....	14
4.3.3 Lamivudine.....	15

4.3.4 Adefovir dipivoksil.....	15
4.3.5 Entekavir.....	16
4.4 Tümör Nekrosis Faktör Alfa.....	17
4.4.1 TNF α düzeyinin ayarlanması.....	17
4.4.2 TNF α Etki Mekanizması.....	17
4.4.3 TNF α 'nın antiviral etkileri.....	18
4.4.3.1 HBV enfeksiyonu ve TNF α	18
4.5 Tümör Nekrosis faktör alfa promotor polimorfizmleri.....	19
4.5.1 TNF α promotor polimorfizmlerinin işlevsel önemi.....	20
4.5.2 TNF α promotor polimorfizmlerinin hastalıklarla olan ilişkisi.....	20
4.5.3 HBV enfeksiyonunda TNF α promotor polimorfizmlerinin rolü.....	21
5. MATERYAL VE METOD.....	24
5.1 Hasta seçimi	24
5.2 Tedavi ve hasta takibi.....	24
5.3 Tedaviye Yanıt Kriterleri.....	25
5.4 DNA izolasyonu.....	25
5.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	26
5.6 Jel Elektroforezi.....	27
5.7 Restriksiyon Enzim kesimi.....	28
5.8 İstatistik Analizler.....	29
6. BULGULAR.....	30
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	34
8. ÖZET.....	38
9. SUMMARY.....	39
10. KAYNAKLAR.....	40
11. TEŞEKKÜR.....	48

Akut viral hepatit B

cccDNA:	covalently closed circular DNA
EDTA:	Etilendiamin tetraasetikasit
ELISA:	Enzyme linked immunoadsorbent assay
Enh1:	Enhancer1
GM-CSF:	Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör
GRE:	Glucocorticoid responsive element
HAI:	Histolojik aktivite indeksi
HBV:	Hepatit B Virüsü
HCV:	Hepatit C Virüsü
HCC:	Hepatosellüler karsinom
HIV:	İnsan immun yetmezlik virüsü
IFN α :	İnterferon alfa
IFN γ :	İnterferon gamma
IKK:	İnhibitör kappa B kinaz
IL:	İnterlökin
KHB:	Kronik Hepatit B
KHC:	Kronik Hepatit C
LD:	Bağlantı eşitsizliği
M-CSF:	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
MHC:	Doğal doku uyum kompleksi
MU:	Milyon ünite
NF-AT:	Aktive T lenfositlerinin nükleer faktörü
NF- κ B:	Nükleer faktör kappa B
ORF:	Open reading frame
PEG-IFN:	pegile interferon

PT:	Protrombin zamanı
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP:	restriksiyon kesimi uzunluk polimorfizmi
RT-PZR:	Gerçek zamanlı PZR
TGF β :	Transforme edici büyüme faktörü β
TH:	Yardımcı T hücresi
TACE:	TNF α dönüştürücü enzim
TNF α :	Tümör Nekrosis Faktör alfa
TNFR:	TNF α reseptörü
TRADD:	TNF α reseptörle ilişkili ölüm bölgesi
UTR:	Yazılmayan tekrar

3. GİRİŞ

Hepatit B Virüsü (HBV), insanlarda akut ve kronik enfeksiyona, karaciğer kanserine, siroza ve akut karaciğer yetmezliğine neden olabilen bir virüstür. Tüm dünyada yaygın olarak bulunur. Endemik olarak görüldüğü yörelerde mortalitenin en önemli nedenlerinden birisidir.

Tümör nekrosis faktör alfa ($TNF\alpha$) ise doğal bağışıklık reaksiyonlarında vaz geçilmez bir yere sahip çok önemli bir sitokindir. Antiviral immünitede kritik öneme sahip olan bu sitokinin yokluğunda veya sitokine yanıtızsızlık durumlarında enfeksiyonlara yatkınlık oluştuğu bilinmektedir.

HBV enfeksiyonunun seyri, doğal ve edinsel bağışıklık elemanlarının planlı bir şekilde çalışmasına bağlıdır. Kronik HBV (KHB) enfeksiyonunun tedavisinde interferon alfa ($IFN\alpha$) ve lamivudin gibi ilaçlar gerek tek başlarına gerek birbirleriyle kombine halde kullanılmaktadır.

İmmün yetmezlik durumlarında görülen enfeksiyonlar tedaviye daha az yanıt verirlerken, immün sistemi düzgün çalışan bireylerde tedavi daha başarılı olmaktadır. KHB tedavisine etki eden pek çok viral ve konak faktörü tanımlanmış olsa da, antiHBe pozitif hastaların tedavisinde prognostik kriterler tam olarak belirli değildir.

$TNF\alpha$ promotorunda çeşitli polimorfik bölgeler tanımlanmıştır. $TNF\alpha$ promotor bölgesinde görülen tek baz polimorfizmlerinin, $TNF\alpha$ 'nın biyolojik işlevlerini de etkilediği belirlenmiştir.

Bu çalışmada, KHB enfeksiyonunun karaciğer histolojik aktivite indeksi (HAI), fibrozis evresi ve aminotransferaz enzimlerinde yükseklikle tanımlanan ciddiyetine $TNF\alpha$ promotor bölgesi -238 ve -308 polimorfizmlerinin etkisi ve HBeAg negatif hasta grubunda antiviral tedaviye yanıtın $TNF\alpha$ promotor polimorfizmleriyle olan muhtemel ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 HEPATİT B VİRÜSÜ

Hepatit B virüsü (HBV) *hepadnavirüs* ailesinden bir DNA virüsüdür. Tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. Akut ve kronik enfeksiyona neden olabilir.

4.1.1 Epidemiyoloji

Hepatit B Virüsü (HBV), akut ve kronik hepatit, fulminan karaciğer yetmezliği, siroz ve hepatosellüler karsinomun (HCC) en önemli etkenlerinden biridir. Dünya nüfusunun 1/3'ü HBV ile karşılaşmış olup yaklaşık 400 milyon kişi HBV ile kronik olarak enfektedir. Son 20 yıldır HBV aşısının yaygın olarak kullanılmasına rağmen, HBV enfeksiyonu halen dünya global bir sağlık sorunudur. Dünyada her yıl 500 000 kişinin HBV ilişkili karaciğer hastalığı sebebiyle öldüğü tahmin edilmektedir (1).

Dünyada yılda 5 milyon Akut Hepatit B enfeksiyonu görülmektedir. Hemodiyaliz hastaları, sağlık çalışanları, genelev çalışanları, damar içi uyuşturucu bağımlıları, cinsel yolla bulaşan bir hastalığı olanlar, birden çok cinsel partneri olanlar, homoseksüeller, kronik HBV enfeksiyonu olan insanların aile bireyleri, bakım evlerinde kalanlar ve buralarda çalışanlar, mental retarde olanlar, HBV enfeksiyonu için risk altındadırlar (2).

Ülkemizde 1985 – 2000 yılları arasında kan donörlerinde HBsAg prevalansı, değişik merkezlerde %5.2 düzeyinde saptanmıştır. 2000 – 2005 yıllarını kapsayan benzer bir tarımada ise prevalans, %0.88–8.7 arasında saptanmış olup; ortalama %2.97 bulunmuştur (3).

Kan donörü harici nüfusta, 2000–2005 yılları arasında yapılan çalışmalarda ülkemizde HBsAg prevalansı %7.6, antiHBs prevalansı ise %32.2 olarak saptanmıştır (3). Çıkan sonuçların apaçık olarak ortaya koyduğu gerçek, ülkemizde 25.000.000 kişinin HBV ile karşılaştığı, yaklaşık 4.000.000 vatandaşımızın HBV taşıyıcısı olduğudur. Ayrıca, yüksek risk grubunda olan genelev çalışanları, diyaliz hastaları ve sağlık personelinde sırasıyla %9.6, %10.1 ve %4.8 HBsAg pozitifliği saptanmıştır (3). Güneydoğu Anadolu bölgesinde HBV prevalansı %10'dan fazladır (2).

Kronik HBsAg pozitif olan vakaların %30'unda, ortanca 30 yıl içerisinde hepatosellüler kanser veya siroz gelişebilir. HBeAg ve antiHBe pozitif hasta grubunda yıllık siroz gelişme olasılığı sırasıyla %3 ve %5'dir. Kronik HBV enfeksiyonu olan çocuklarda yıllık HCC gelişme olasılığı ise %1.5 (%0–11) olarak hesaplanmıştır (4).

Günümüzde kronik hepatit B enfeksiyonu için henüz tatminkâr bir tedavi yoktur. HBV enfeksiyonunun bulaşmasını engellemek en iyi çözüm yolu gibi görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, yeni doğanlar için HBV aşılmasını rutin olarak önermektedir. Rutin aşılama programlarının yaygınlaşmasıyla; yenidoğanlarda fulminan hepatit, infantlarda HBV enfeksiyonu, infant ve adölesanlarda akut hepatit B enfeksiyonuyla kronik hepatit prevalansında azalma gözlenmiştir (2,3).

Kan, serum ve yaralarda HBV yüksek düzeyde; semen, vajinal sıvılar ve tükürükte ise orta düzeyde bulunur. İdrar, dışkı, ter, anne sütü, gözyaşı, dışkı virüsün düşük düzeyde bulunduğu sıvılardır (2).

HBV'nin bilinen, 4 temel bulaş yolu mevcuttur.

1. Enfekte kan ve vücut sıvılarıyla mukozal ya da kutanöz temas (perkütan)
2. Cinsel temas
3. Enfekte anneden yenidoğan bebeğine bulaş (perinatal-vertikal)
4. Enfekte olan kişilerle cinsellik içermeyen yakın temas (horizontal)

HBV enfeksiyonunun dünyadaki dağılımı coğrafi farklılıklar gösterir. Kanada, Amerika Birleşik Devletleri, Yeni Zelanda gibi düşük endemisite bölgelerinde prevalans %0.1-2 arasındadır. Enfeksiyon bu bölgelerde genelde yetişkin çağda kazanılır. Cinsel ve perkütan yolla bulaş bu grupta önemlidir (2).

Türkiye, Japonya, Orta Asya, Orta Doğu gibi orta derecede endemisite gösteren bölgelerde HBsAg seroprevalansı %2-5 arasındadır. Yetişkinlerin %20-60'ında antiHBs pozitif olarak saptanır. Perkütan ve horizontal yol ana bulaş şeklidir (2).

Yüksek endemisite bölgeleri arasında Sahra altı Afrika, Güneydoğu Asya bulunmakta ve HBsAg pozitifliği %5-20 arasında değişmektedir. Perinatal, horizontal geçiş ana bulaş yoludur (2).

4.1.2 Viroloji

HBV, *Hepadnaviridae* ailesinde yer alan hepatotropik, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virüsüdür. Sadece 3200 nükleotidden oluşan genomik yapısı nedeniyle, bilinen tüm hayvan DNA virüsleri içinde en küçük olanıdır. *Hepadnaviridae* ailesinin üyeleri içinde insanlarda enfeksiyon oluşturulan tek tür HBV'dir (1,5,6). Diğer hepadnavirüsler

gibi HBV de karaciğer üzerine aşırı düzeyde sitotoksik değildir. Tüm karaciğer dokusunda sitotoksisiteye neden olmadan, sadece enfekte hücrelerin öldürülmesine neden olur. Diğer hepadnavirüsler gibi son derece kısıtlı bir konak spektrumuna sahip olup, insan haricinde şempanze gibi yüksek primatlar ve *Tupaia belangeri*' nin primer hepatositlerini enfekte edebilir (6).

4.1.2.1 Genom yapısı

HBV, 3200 nükleotid uzunluğunda, kısmen çift sarmallı, sirküler bir DNA molekülü taşır. DNA zincirlerinden birindeki boşluk endojen DNA polimeraz aktivitesiyle tamamlanabilir (5,6).

Viral polimeraz negatif zincirin 5' ucuna fosfodiester bağıyla bağlanır. Pozitif zincirin 5' ucunda 18 baz çift uzunluğunda bir RNA oligoribonükleotid yer alır. Negatif sarmalın 3' ucu, genomun üç zincirli olduğu bir bölgede, 8-9 nükleotidlik artık uç ile sonlanır. Genom DR1 ve DR2 olarak adlandırılan, 10 veya 11 baz çift uzunluğunda iki direkt tekrar dizisi içerir (5,6). Bu dizeler, DNA'nın yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlar. Hepadnavirüsler, tek, çift ve üç zincirli DNA hem de RNA içermesiyle, diğer virüslerden ayrılır (6).

HBV'de genetik bilginin tamamı uzun sarmal üzerinde kodlanmış olup bu sarmal S, C, X ve P kısaltmaları ile gösterilen dört değişik protein kodlayan nükleik asit dizisine (open reading frame: ORF) sahiptir. HBV genomu içerdiği P isimli ORF'den daha uzun değildir. Aynı nükleik asit dizisinden birden fazla proteini ve aynı ORF'den farklı proteinleri kodlayabilme özelliğine haizdir (5,6).

ORF'lerin transkripsiyonu promotor ve enhancer olarak adlandırılan düzenleyici dizeler tarafından kontrol edilmektedir. HBV genomunda fonksiyonel olarak tanımlanmış en az 4 promotor (pre-S1 prom, S prom, X prom ve pre-C prom) ve 2 enhancer (Enh 1 ve Enh 2) bölgesi bulunmaktadır. Ayrıca S geni içinde yer alan ve Enh 1 ile bağlantılı olarak glukokortikoid varlığında gen ekspresyonunu yaklaşık 5 kat kadar arttıran bir elemanın (GRE: glucocorticoid responsive element) varlığı da tanımlanmıştır (5).

HBV genomundaki genler, birbirinin peşi sıra dizilmiş ve bir diğerinden birinden tamamen ayrı bölgelerde bulunmazlar. Aksine bazı bölgelerde içice girmiş, diğer bir deyişle birbirleriyle çakışmış durumdadırlar. Örneğin genomun en uzun geni olan P geni; X ve C genleri ile kısmen, S geni ile tamamen çakışmış halde bulunmakta, sonuç olarak uzun sarmal 1.5 defa okunmaktadır. Bu özellik nedeni ile HBV, bilinen hayvan virüsleri

içinde en küçük genomik yapıya sahip olmakla birlikte, kendini kodlama kapasitesi en fazla olan virüstür (5,6).

4.1.2.2 HBV moleküler yapısı

Gen organizasyonundan yukarıda kısaca bahsedilen uzun sarmaldaki S geni yüzey proteinlerini, C geni kapsid proteinlerini, X geni X proteinini ve P geni de DNA polimerazı kodlamaktadır. Ancak başlangıç kodonları farklı olduğu için S geni üzerinde pre-S1, pre-S2 ve S olmak üzere üç, C geni üzerinde ise pre-C ve C olmak üzere iki bölge bulunmakta; düzeyleriyle farklı başlangıç kodonlarından sentezlenen proteinler de farklı olmaktadır. Bu nedenle 4 adet ORF'e sahip olmasına rağmen HBV tarafından yedi değişik polipeptid üretilmektedir (5,6).

4.1.2.3 HBV Zarf proteini

HBV viryonunun zarfı ve HBs partikülleri endoplazmik retikulum membranında sentezlenir ve oluşturulur. HBV viryonunun dış tabakasını HBs proteinleri oluşturur. HBs proteinleri, aynı gen tarafından üretilen fakat büyüklükleri farklı olan 3 proteinin değişik düzeylerde glikozillenmesiyle meydana gelmiş, 24-42kDa ağırlığında, 6 farklı üründen oluşmaktadır (6). HBs proteinlerinin aminoasit dizilişindeki farklılıklar sonucunda HBV genotiplere ayrılır (6). Genotip A-H olarak isimlendirilen 8 farklı HBV genotipi bulunmakla birlikte, ülkemizde neredeyse sadece genotip D görülmektedir (3).

4.1.2.4 HBV Kor proteini

HBV kor partikülleri, HBs proteinlerinden bağımsız olarak sitozolde sentezlenip, birleştirildikten sonra endoplazmik retikulum membranında ki HBs proteinlerine bağlanır. Zarfa bağlanmamış kor partikülleri nükleus içerisinde depolanır. Olgun HBV viryonu içerisinde DNA polimeraz kor partikülüne bağlı olarak bulunur (6). Kor proteini viral DNA'ya DNAaz'ların etkisinden korur. Kor proteinleri sitoplazmada belirli bir konsantrasyona ulaştığında, pregenomik RNA, ısı şoku proteinleri, viral DNA polimeraz ve sitozolik kinazlarla birleşerek enkapsidasyonu başlatır. Viral polimerazın, RNA'dan viral DNA düzgün sentezleyebilmesi için kor proteinine ihtiyaç vardır (6).

Tüm hepadnavirüsler kor proteinlerinin salgısal formunu sentezleme yetisine sahiptir. Pre-C bölgesi olarak adlandırılan bölgeden, hidrofobik sekresyon sinyali içeren ve endoplazmik retikulum lümenine sentezlenen bir protein kodlanır. HBe proteini HBc proteininden farklı olarak endoplazmik retikulum lümenine salındıktan ve Golgi proteazlarınınca muamele gördükten sonra dimerik olarak hücre dışına salınır (6).

HBeAg'nin viral yaşam döngüsü için elzem olmadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda immün modülatör rolünün olabileceğine dair bulgular edinilmiştir (6). Pre-C bölgesi 1896. nükleotiddeki G→A değişimi sonlanma kodonu oluşturarak HBe proteinin salınmasını ve sentezini engeller (5,6).

4.1.2.5 HBV polimeraz

P bölgesi incelendiği zaman 4 farklı alt birimden oluştuğu anlaşılır (6).

1. Amino terminal bölgesi *primaz* olarak da adlandırılır. Negatif zincirin 5' ucuna bağlanarak, priming vazifesi görür.
2. Bunu takiben yerleşen bilinen bir görevi olmayan bölge
3. İkinci bölgeyi takiben yerleşen DNA veya RNA bağımlı polimeraz. Bu bölgenin retrovirüslerin revers transkriptazı ile benzer uzaysal yapı gösterdiği düşünülmektedir. HBV tedavisinde kullanılan ilaçların ana hedefidir. İlginç olarak polimeraz aktivitesi için kor proteininin varlığı gereklidir.
4. Karboksiterminal bölgede yerleşik; DNA ile hibritleşmiş RNA'yı ayıran RNAaz H.

4.1.2.6 HBx proteini

HBx proteini ise X gen bölgesi tarafından kodlanmaktadır. Yokluğu durumunda HBV replikasyonunun etkilenmediğine dair gözlemler olduğu gibi, etkin bir replikasyon için gerekli olduğunu savunanlar da vardır. HBx proteini hücre içerisinde NF-κB, PKC, raf gibi ikinci mesajcılarla ilişkilidir. Pro-apoptotik etkisi vardır. p53 proteiniyle ilişkiye girerek karsinogeneze katkıda bulunabilir (6).

4.1.3 Replikasyon Stratejisi

Virüs karaciğer hücrelerine preS1 proteinin 21–47. aminoasit dizesi üzerinden bağlanır. Hücre yüzeyinde bağlandığı hedef molekülün karboksipeptidaz D (CPD) olduğuna dair kanıtlar elde edilmiştir (6). CPD, pek çok hücre tarafından ifadelenebildiği için, karaciğer hücresine spesifik bağlanma için ek moleküllerin de işin içine girmesi muhtemeldir. Ayrıca SHB(küçük HBs proteini) ile endoneksin II bağlanmasının da hücreye yapışma veya giriş veya her ikisine de katkı sağlayabileceği gösterilmiştir (6).

HBV'nin hücre içerisine girdikten sonra endozomlar aracılı hidrolizden nasıl olup ta kaldığı ve nükleusa ulaştığı tam olarak bilinmemektedir. Kapsid sitozolde serbest kaldıktan sonra hücre taşıma sistemi marifetiyle nükleusa taşınır. Nükleusa taşınma sırasında nükleer yerleşim sinyalinin varlığı, nükleer porlardan geçmek için gereklidir. Karyoplazmaya ulaştıktan sonra HBV genomunun nasıl olup ta serbest kaldığı da henüz tam belli değildir (6).

Hedef hücre nükleusunun içerisinde, bir dizi işlemde sonra, *covalently closed circular DNA* (cccDNA) denilen episomal DNA'ya dönüşür. İnsan karaciğer nükleuslarında, hastalık aktivitesine paralel olarak sayıları artan şekilde, episomal cccDNA saptanmıştır. Hücre bölünmesiyle cccDNA miktarında azalma saptandığı bilinmektedir. İnterferon gamma (İFN γ) üreten CD8+ T hücreleri de cccDNA'nın parçalanmasını etkileyebilir (6).

cccDNA tarafından üretilen RNA'lar viral proteinleri ve genetik materyali kodlar. Yukarıda da belirtildiği üzere enkapsidasyon kor proteinleri ile viral RNA'nın etkileşimiyle başlar. Daha sonradan viral RNA'dan DNA sentezlenir. Enkapsidasyon işlemini zarfa bürünme takip eder. Zarf oluşumu için bol miktarda SHB molekülü gereklidir. Olgun HBV virüslerinin sekresyonu için kor ve zarf proteinleri arasında disülfid bağlar oluşur ve yüzey proteinlerindeki glikanın budanması gerekir. Özel bir sekresyon sinyaline gerek yoktur (5,6).

Hepadnavirüs ailesinde yer alan üyelerin tümü için doğrulanmış yegâne replikasyon yeri hepatositlerdir. Safra kanal epitel hücreleri, pankreas, böbrek ve lenfoid sistemdeki bazı hücre grupları da enfeksiyonun hedefi olabilir. Ancak bu hücrelerde viral replikasyon ile ilgili veriler yeterli ve güvenilir değildir (5).

4.2 HBV ENFEKSİYONUNUN KLİNİK SEYRİ

4.2.1 Akut HBV enfeksiyonunun seyri

Kuluçka süresi 30 – 180 gündür. Akut viral hepatit B (AVHB) enfeksiyonunun %70 kadarı subklinik geçerken %30'unda ikter görülür. Tipik olarak hastada halsizlik ve yorgunluk ortaya çıkar. Halsizliği iştahsızlık, bulantı, kusma ve sağ üst kadranda ağrısı izler. Nadiren ateş görülür. Semptomlar silik olduğu için sinsi bir seyir vardır. Serum hastalığı benzeri tablo gelişebilir. İkterli AVHB olgularının %1'inde fulminan hepatit gelişir. AVHB'nin kronikleşmesi hastanın yaşı, semptomlu veya semptomsuz olması, hastanın immün durumuyla ilişkilidir (4,7).

Tüm AVHB olgularının %5-10'unda kronikleşme görülür. Kronikleşme erkeklerde kadınlara, yeni doğanlarda erişkinlere, immün sistemi baskılanmışlarda normal immün sisteme sahip bireylere kıyasla daha fazladır. Neonatal dönemde enfekte olanlarda %90, bir-altı yaş arası enfekte olanlarda %60, 6 yaşından sonra enfekte olanlarda %10 kronikleşirken, erişkinlerde kronikleşme %5 oranında görülür (4,7).

Kronikleşme immün sistemi düzgün çalışan, ikterik olgularda %1'den azdır. Bir toplumdaki HBsAg pozitif olanların %10-30'unu kronik hepatit B (KHB) hastaları, geri kalanını ise inaktif HBsAg taşıyıcıları oluşturmaktadır (4).

4.2.2 Kronik Hepatit B (KHB) enfeksiyonu

Karaciğerin kronik nekroinflamatuvar hastalığıdır ve aşağıdaki kriterlerin varlığıyla tanı konur (8).

- a. HBsAg altı aydan daha uzun süredir pozitif
- b. Serum HBV DNA $\geq 10^4$ kopya/ml
- c. Sürekli veya aralıklı ALT yüksekliği
- d. Karaciğer biyopsisinde histolojik aktivite indeksi (HAI)'nin 4 den büyük olması
- e. Diğer kronik hepatit nedenlerinin dışlanması
- f. HBeAg veya antiHBe pozitif olabilir (8).

Pratti (9) ve arkadaşları kısa bir süre önce, normal ALT ve AST değerlerinin kadın ve erkekler için sırasıyla 19 U/l ve 30 U/l değerine çekilmesi gerektiğini ortaya koymuşlardır. Dolayısıyla enzim yüksekliği kriteri değerlendirilirken bu bulguların göz önünde tutulması gerekmektedir.

KHB vakaları, HBeAg pozitif ve HBeAg negatif KHB olarak iki şekilde gözlenirler. HBeAg pozitif KHB hastalarında yüksek viremi düzeyleriyle karakterizedir. Hâlbuki prekor bölgesinde HBeAg'nin sekresyonunu engelleyen bir mutasyon sayesinde ortaya çıkan HBeAg negatif KHB vakalarında daha sinsi, hızlı bir seyir mevcuttur (7,8).

4.2.2.1 Kronik HBV enfeksiyonunun seyri

Neonatal/perinatal dönemde HBV ile enfekte olanlarda uzun süre düşük ALT düzeyleri, spontan HBeAg klirensinin nadir görüldüğü, karaciğerde nekroinflamasyonun düşük düzeyde olduğu immün toleran faz, karakteristiktir. Başlangıçtaki yüksek viremiyle karakterize olan immün toleran fazı, vireminin azaldığı, antiHBe serokonversiyonunun

gelişebildiği, karaciğerde inflamasyonun bulunduğu ve yüksek ALT düzeyleriyle karakterize immünoaktif faz izler. İmmün klirens fazında ise, HBV DNA düzeyleri dalgalanma gösterirken, HBeAg, HBsAg serumda saptanır. Karaciğerde nekroinflamasyon mevcuttur ve ALT düzeyi yüksektir. antiHBe serokonversiyonu bu dönemde gelişebilir. antiHBe geliştikten sonra viremi konağın immün yanıtı sayesinde baskılanır. Bu dönemde karaciğerde düşük düzeyde inflamatuvar aktivite vardır. Hastaların pek çoğunda antiHBe geliştikten sonra zaman içinde ALT yükselmeleriyle karakterize alevlenmeler görülür (1, 7).

Kimi hasta ise, antiHBe serokonversiyonu sonrasında uzun süreli olarak inaktif HBsAg taşıyıcılığı gelişir. Hastaların kimilerinde antiHBe pozitif olduğu halde yüksek HBV DNA ve ALT düzeyleriyle karakterize antiHBe pozitif kronik hepatit B gelişebilir. antiHBe pozitif kronik hepatit Akdeniz bölgesinde en sık görülen kronik hepatit B formudur. Bu kişilerde HBeAg salınımı engelleyen, 1896G→A gibi, prekor mutasyonları tanımlanmıştır (7,8).

HBeAg negatif kronik hepatit dalgalanmalar gösterir ve spontan remisyon nadirdir. Antiviral tedavi endikedir. Bu grupta ortalama yaş 36–45 yıldır. HBeAg pozitif hastalardan daha yaşlıdırlar. Akdeniz ülkelerinde sıktır. Olgular sıklıkla erkek, büyük kısmında tanımlandığında şiddetli nekro-inflamasyon ve/veya siroz mevcuttur (7,-8).

3 farklı şekil tanımlanmıştır.

- Normal gidişler arasında tekrar eden alevlenmeler,
- Persiste eden anormal aminotransferaz yükselmeleri arasında tekrarlayan alevlenmeler,
- Alevlenme olmaksızın persiste eden ALT yüksekliği.

Batı toplumlarında spontan HBeAg serokonversiyonu %8–15 hastada gözlenir. ALT düzeyi normalin 5 katına erişen alevlenme hastalarında HBeAg serokonversiyonu %45'e ulaşabilir. Adölesan veya yetişkin dönemde HBV ile enfekte olanlar ise aktif karaciğer hastalığıyla karakterize sürekli immün aktif fazda HBV taşıyıcısı olurlar (1,7).

HBV ile kronik olarak enfekte hastalarda yıllık ve 5 yıllık siroz gelişim ihtimali sırasıyla %6 ve %20'dir. HBeAg pozitif vakaların her yıl %2-5'inde siroz gelişimi gözlenir. Siroza ilerleyişle ilişkili faktörler arasında yüksek viremi, HCV, HDV ve HIV koenfeksiyonu, akut alevlenmelerin sıklığı ve tanı anındaki karaciğer dokusunda yüksek

nekroinflamasyon sayılabilir. Siroz tanısı alan hastaların 5 yıl içerisinde sağkalma oranı %84'tür. Siroz hastalarının her yıl %3'ünde, 5 yıl içinde %16'sında dekompanse siroz gelişir. Dekompanse sirozlu vakaların sadece %35'i beş yıl süreyle yaşayabilir (1).

HCC'li hastaların %80-90'ında zeminde siroz mevcuttur. Avrupalı kompanse sirozlu olan hastaların her yıl %2.2'sinde ve beş yıl içinde %10'unda HCC gelişir. Asya'da ise bu oranlar sırasıyla %3.2 ve %15'tir. Yaşlı, erkek, uzun dönemli karaciğer hastalığı olan, yüksek viremi bulunan, HCV ve HIV koenfekte, HBeAg pozitif, alkol kullanan sirozlu hastalarda HCC daha sıklıkla gelişir (1).

4.2.2.2 Kronik Hepatit B tanısı

HBV enfeksiyonunun özgül tanısı serolojik testlerle yapılmaktadır. HBV antijenleri ve anti HBV antikorların tespiti için en önemli yöntem ELISA (enzyme linked immunoadsorbent assay) dır. İlk aşamada HBsAg ve antiHBc total test edilmesi pozitif bulunduğu durumda antiHBcIgM, antiHBs, HBeAg, antiHBe bakılması önerilir. KHB tanısının belirleyici kriterlerinden bir tanesi HBsAg pozitifliğinin 6 aydan uzun süreyle sebat etmesidir. antiHBs hastalığa karşı bağışıklığı göstermektedir. KHB vakalarında HBsAg pozitif antiHBs negatif olmalıdır. Gizli (occult) HBV enfeksiyonu olan bireylerde HBsAg negatif olduğu halde viral replikasyon devam etmektedir (10, 11).

Kor antijeni, hızla spesifik antikorlarıyla birleşmesinden ötürü, dolaşımda saptanamaz. KHB hastalarında kor antijenine karşı gelişen antikorlar araştırılır. antiHBcIgM akut enfeksiyonun pencere döneminde pozitif olan tek gösterge olduğu halde, KHB enfeksiyonunda da düşük titrelerde pozitif olarak saptanabilir. antiHBc IgG antikorlar ise kişi HBV ile karşılaştıktan sonra oluşarak ömür boyu pozitif olarak kalır. Gizli (occult) HBV enfeksiyonunda tek pozitif olan değer antiHBcIgG'dir (10, 11).

HBeAg pozitifliği, prekor mutasyonunun olmadığı, virüsün HBeAg'yi sentezleyebildiğini ve viral replikasyonu gösterir. antiHBe varlığı, viral replikasyonun kontrol altına alındığını ve düşük düzeyde vireminin ve nekroinflamasyonun bulunduğunu gösterebileceği gibi aynı zamanda prekor mutanti olan suşlarla enfekte bireylerde viremi olduğu halde negatif bulunur. Ayrıca, HBeAg pozitif bireylerde viremi saptanmayabilir (10,11).

Viremi düzeyi hakkında net bilgi sahibi olabilmek için HBV DNA düzeyi belirlenmelidir. HBV DNA düzeyleri sıvı hibridizasyon, Hibrid yakalama, dallı DNA gibi

genetik çoğaltma metotlarıyla yapılabildiği gibi; Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), gerçek zamanlı PZR gibi nükleik asit çoğaltma yöntemleriyle de yapılabilir (10, 11).

PZR' sadece viremi düzeyinin belirlenmesi için kullanılmaz. Etkenin antiviral duyarlılığının belirlenmesi, gizli HBV enfeksiyonunun tanısı, antiHBs pozitif HBV enfeksiyonunun tanımlanması, tedavi etkinliğinin takibi, mutant virüslerin tanımlanması ve HBV genotiplendirilmesi amacıyla da kullanılır (10, 11).

4.2.2.3 Karaciğer biyopsisi ve histolojisi

Günümüzde kronik karaciğer parankim hastalıklarının tanı ve tedavisinde görüntüleme yöntemleri ve moleküler biyolojik teknikler gibi gelişmiş yöntem kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu hastalıkların gruplandırılması temel olarak morfolojik özelliklere dayanılarak yapıldığından, söz konusu ileri inceleme tekniklerine karşın karaciğer biyopsisi halen daha önemini korumaktadır (12).

Karaciğerin histopatolojik incelemesi için iğne biyopsileri ve nadiren de kenar biyopsiler yapılabilir. Karaciğer biyopsileri perkütan kör, ultrason eşliğinde, bilgisayarlı tomografi eşliğinde, laparoskopik veya transvenöz yolla yapılabilir. Yaklaşık 1.5cm uzunluğunda bir biyopsi örneğinin karaciğerin yüz binde birini temsil etmesinden ötürü, örnekleme hatası ihtimali gözden kaçırılmamalıdır (12).

Kronik hepatitli hastalarda karaciğer biyopsisi tanının doğrulanması, eşlik eden lezyonların tanımlanması, histolojik hasarın saptanması, karaciğer parankim çatısının değerlendirilmesi, viral antijenlerin gösterilmesi, tedaviye cevabın ve hastalığın takibi için yapılır (12).

KHB' de hematoksilen-eosin kesitlerinde saptanan buzlu cam tarzında sitoplâzma ve kumsu nükleus bu hastalığın karakteristik bulgularıdır. Buzlu cam tarzında sitoplâzma eozinofilik, soluk granüler özelliktedir. Nükleusun etrafında bazen bir halo bulunabilir. Bu, HBsAg ile dolu bulunan endoplazmik retikulum tarafından oluşturulan bir görüntüdür. Nükleusta masif HBcAg toplanmasına bağlı olarak kumsu nükleus görülür (12).

Fokal nekroz, portal inflamasyon, fibrozis ve siroz tüm kronik hepatitlerde görülen elementer lezyonlardır. Fokal nekroinflamasyon küçük mononükleer hücre toplantısıdır. Buna apoptotik hepatositler eşlik edebilir. Şiddetli hepatitlerde konfluent nekroz izlenebilir. Portal iltihap hafif, orta ve yoğun olabilir. İnterfaz hepatiti daha önceden piecemeal nekroz olarak isimlendirilen periportal lezyondur. Bu portal alandaki iltihabın lobül içerisine ilerlemesidir. İnterfaz hepatiti hepatosit apoptozisini gösterir. Hasarın,

rejenerasyonla iyileşmediği durumlarda fibrozis gelişir. Fibrozis portal alandan bağlar ve periportal alana ulaşır. Daha ileri dönemlerde porto-portal, porto santral, santral-santral köprüleşmeler oluşturan fibrozisler görülür. Nekroinflamasyonun devamı halinde ilerleyici fibrozis ve parankimal dejenerasyon ile siroz gelişir. KHB' de görülen karaciğer histolojisi değişiklikleri, hastalığın evresine ve dönemine bağlı olarak farklılık gösterir (12).

Karaciğerde oluşan nekroinflamatuvar hasar grade, fibrozis ise evre olarak sayısallaştırılır. İlk kez Knodell tarafından karaciğer histolojisindeki hasarın derecesini sayısallaştırmak için bir puanlama sistemi önerilmiştir. Daha sonra Scheuer ve Ishak da kendi adlarıyla anılan puanlama sistemlerini ortaya koymuşlardır. Ayrıca Fransız, METAVIR grubu da kendi adıyla anılan bir sınıflama sistemi önermiştir (12).

KHB histolojisinin puanlandırılması için Knodell'in sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu puanlama sistemi tabloda özetlenmiştir.

Tablo 1: Knodell'e göre kronik hepatit B histolojik aktivite indeksi

Periportal± köprüleşme nekrozu	Puan	İntralobuler dejenerasyon ve fokal nekroz	Puan	Portal iltihap	Puan
Yok	0	Yok	0	Yok	0
Hafif sınırlayıcı membran harabiyeti	1	Hafif	1	Hafif	1
Orta sınırlayıcı membran harabiyeti	3	Orta	3	Orta	3
Belirgin sınırlayıcı membran harabiyeti	4	Belirgin	4	Belirgin	4
Orta sınırlayıcı membran harabiyeti± köprüleşme nekrozu	5				
Belirgin sınırlayıcı membran harabiyeti± Köprüleşme nekrozu	6				
Multilobar nekroz	10				

4.3 KRONİK HEPATİT B TEDAVİSİ

HBeAg negatif KHB ülkemizin de içerisinde bulunduğu Akdeniz havzasında en sık karşılaşılan KHB formudur. HBV enfeksiyonunun doğal seyrinde geç dönemde ortaya çıkmaktadır. HBeAg negatif KHB prekür ve kor promotor mutasyonlarıyla ilişkilidir. HBeAg negatif KHB, potansiyel olarak daha ciddi ve ilerleyici bir karaciğer hastalığı olup, teşhis anında hastaların büyük bir kısmında siroz bulunmakta veya tedavisiz bırakılan hastaların önemli bir bölümü tanıyı takip eden yıllar içerisinde siroza, dekompansemana ve karaciğer yetmezliğine ilerleyebilmektedir (13).

Tüm HBeAg negatif KHB hastaları ideal olarak tedavi edilmelidirler, hâlbuki günümüzdeki tedavi kılavuzlarında tedavi, sadece orta veya ağır düzeyde karaciğer hasarı olan hastalara önerilmektedir. Geçtiğimiz on yıl içerisinde KHB tedavisinde önemli başarılar sağlandı. Viremi ve transaminaz düzeyleri yüksek bireylerde karaciğer nekroinflamasyonu, siroz ve HCC gelişim hızı artmaktadır (13, 14). HBeAg negatif KHB tedavisinde en gerçekçi amaç uzun dönemli virolojik ve biyokimyasal yanıtın sağlanmasıdır. Tedavinin asıl amacı siroz ve HCC gelişiminin engellenmesidir. Uzun süreli virolojik ve biyokimyasal yanıt elde edilenlerde, karaciğer nekroinflamasyonunda düzelme veya nekroinflamasyonun artmasının engellenmesiyle hastalığın klinik seyrinin düzeldiği gösterilmiştir (15, 16).

KHB tedavisinde interferon alfa (2a ve 2b), pegile interferon alfa (2a), lamivudin, adefovir, entekavir, tenofovir, clevudine, telbivudine gibi ajanlar kullanılmaktadır. Ülkemizde ilk 5 ilaç bulunmaktadır. Tenofovir, clevudine ve telbivudine halen daha geliştirilme aşamasındaki ajanlardır (13).

4.3.1 İnterferon alfa (IFN α)

IFN α antiviral ve immünomodülatör etkinliğe sahip bir ajandır. HBeAg pozitif ve HBeAg negatif KHB tedavisinde kullanım onayı almıştır. HBeAg negatif KHB tedavisinde haftada üç kez 3 – 6 MU kullanılan IFN α ile %20 – 25 oranında kalıcı yanıt sağlanmaktadır. Kalıcı yanıt sahiplerinin %25 – 40'ında yıllar sonra HBsAg kaybı da gözlenmektedir. Bazı çalışmalarda genotip A ile enfekte hastalarda tedavi yanıtının genotip D ile enfekte olanlara nazaran daha iyi olduğu belirtilse de, bazı çalışmalar bu ilişkiyi doğrulayamamışlardır (13).

IFN α ile daha önceden tedavi görmüş ve sonradan relaps nedeniyle tekrar tedavi gören hastalarda, IFN α tedavisi ilk uygulamadaki kadar etkindir. Bundan dolayı HBeAg negatif hastaların yeniden tedavisinde IFN α kullanımı önerilmektedir. Hâlbuki klinik uygulamalar sırasında hastalar (önceki tedavide yaşadıkları hayat kalitesindeki kayıp ve yan etkiler sebebiyle) yeniden IFN α tedavisini kabul etmekte zorlanırlar. IFN α tedavisinin diğer tedavilere nazaran üstünlüğü tedavi sonrası yanıtın sürekliliği, tedavi süresinin belirli olması ve direnç gelişmeyişiştir. Diğer yandan, hastaların tedaviyi tolere edemeyişleri, sıklıkla ortaya çıkan yan etkiler ilacın handikaplarıdır. IFN α tedavisi alan hastalar aylık olarak kontrol edilmelidirler. Hastaların yaklaşık 1/3'ünde doz azaltılması, %5'inde ise ilacın kesilmesini gerektirecek advers etkiler ortaya çıkabilir (13).

Ülkemizde IFN α 2a ve IFN α 2b olmak üzere iki farklı standart interferon vardır. Sub kutan şekilde uygulanır. HBeAg pozitif KHB tedavisinde 16 – 24 hafta, HBeAg negatif KHB tedavisinde 48 hafta süreyle tedavi önerilmektedir (17).

4.3.2 Pegile interferonlar (PEG-IFN)

Pegilasyon teknolojisi standart IFN α ' nın, farmakokinetik ve farmakodinamik profilinin geliştirmek için kullanılmıştır. Bu sayede ilacın serum düzeyleri uzun süreyle istikrarlı olarak korunur. Daha az miktarda enjeksiyona gereksinim duyulur. Polietilen glikol içerikleri açısından farklı iki Peg-IFN vardır: Peg-IFN α 2a ve Peg-IFN α 2b. Kronik hepatit C tedavisinde her ikisi de kullanım onayı almış olmalarına karşın, KHB tedavisinde sadece PEG-IFN α 2a kullanım onayına sahiptir (13).

48 hafta süreyle verilen PEG-IFN' nin lamivudin tedavisinden virolojik ve biyokimyasal yanıtlar açısından daha üstün olduğu gösterilmiştir. Ayrıca PEG-IFN tekli tedavisinin, PEG-IFN+lamivudin kombinasyonundan etkinlik açısından farklı olmadığı da gösterilmiştir. Tedavi sonrası 6. ve 12. aylarda viral replikasyonun baskılanması sırasıyla %53 ve %30 hastada devam etmekteydi. HBeAg negatif KHB tedavisinde standart ve PEG-IFN' nin karşılaştırıldığı bir çalışma olmadığı için bu konuda kesin bir sonuç vermek mümkün değildir (13). Buna rağmen, PEG-IFN daha kolay kullanılabilmesi, haftada bir kez enjeksiyona izin vermesi nedeniyle standart IFN α nın yerini alacaktır.

Kısmi olarak çift kör bir faz III çalışmada 48 hafta süreli, PEG-IFN α 2a kendi başına veya lamivudin ile kombine halde HBeAg negatif KHB tedavisinde denenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, kalıcı, virolojik ve biyokimyasal yanıt oranları gruplar arasında farklılık saptanmamıştır. İlginç olarak HBeAg negatif hastalarda nadiren gözlenen HBsAg

PEG-IFN alan gruplarda %3 – 4 oranlarında görülmüştür. Kombinasyon grubunda lamivudin direnci %1'in altında bulunmuştur (18).

4.3.3 Lamivudin

Lamivudin KHB tedavisinde onay almış ilk oral antiviral ajandır. 12 ay süreyle uygulanan lamivudin tedavisini takiben elde edilen kalıcı yanıt oranları son derece düşük olduğundan, lamivudine tedavisinin uzun süreyle uygulanması gerektiği kısa sürede anlaşılmıştır. Başlangıçta, HBeAg negatif hastaların tedavisi sırasında %70 – 90 hastada virolojik ve biyokimyasal yanıt elde edilirken, tedavi devamında yanıt oranları tedrici olarak azalır. Bir yıl süreyle lamivudin tedavisi alan HBeAg negatif hastaların %60'ında histolojik yanıt elde edilmiştir. Virolojik yanıt elde edilen hastaların 6 ay süreyle tedavisiz takipleri sonucunda kalıcı yanıt %5 düzeylerinde saptanmıştır (13,18).

Uzun süreli tedavilerin araştırıldığı hastalarda tedaviye maksimum yanıtın 12. ayda elde edildiği, bundan sonra ise yanıtın tedrici olarak azaldığı bilinmektedir. Özellikle uzun süreli tedaviler sırasında ilaca dirençli mutantların ortaya çıkması, virolojik breakthrough'u takiben biyokimyasal alevlenmelerin gözlenmesi sıklıkla karşılaşılan sorunlardır. Biyokimyasal alevlenmeler karaciğer histolojisinde bozulmaya ve hastalık seyrinin kötüleşmesine yani, dekompanseasyona, karaciğer yetmezliğine ve sirozlu hastalarda ölüme neden olabilir. Lamivudinle 5 yıl süreyle tedavi edilen hastaların %30 – 35'inde tedavi süresince viral ve biyokimyasal remisyon saptanır. Böylesi uzun süreli remisyonda kalan hastaların tedavi süreleri veya tedaviyi kesme kararı konusunda henüz fikir birliği yoktur (13).

Lamivudinin en önemli avantajları maliyetinin ve yan etki profilinin düşük olmasıdır. Yunanistan'dan bildirilen bir çalışmada, adefovir kurtarma tedavisinin eşlik ettiği lamivudin tedavisinin sirotik olmayan hastaların takibinde faydalı olabileceği gösterilmiştir (13).

4.3.4 Adefovir dipivoxil

Adenozin analogu olan adefovir, KHB tedavisinde lamivudin'den sonra kullanım onayı almış ikinci oral ajandır. HBeAg negatif KHB tedavisinde 48 hafta süreyle kullanıldıktan sonra hastaların %79'unda ALT normalizasyonuna, %51'inde PZR ile saptanan vireminin engellenmesine, HBV DNA düzeylerinde ortalama 3.9 log azalmaya neden olur. Tedavi sonu yanıt, tedavi kesildikten sonra devam etmez. Kalıcı yanıt %10 kadar hastada erişilebilir. Uzun süreli adefovir tedavisinin iyi tolere edildiği, viral

replikasyonun baskılanmasının tedavi süresince devam ettiği, beş yıl süreli tedavi sonucunda karaciğer histolojilerinde ciddi düzelmenin sağlandığı, hastaların %5'inde HBsAg kaybı gözleendiği bilinmektedir. Adefovir tedavisinin lamivudine tedavisine kıyasla en önemli üstünlüğü, adefovire karşı düşük direnç gelişimidir. Daha önceden tedavi görmemiş HBeAg negatif hastalarda 1., 2., 3., 4. ve 5. yıl süreli tedavi sonrasında sırasıyla %0, %3, %11, %18, %28 oranında genotipik direnç gelişimi bildirilmiştir. Adefovir direncinin gelişmesini virolojik rebound ve karaciğer dekompanseasyonu takip eder. Lamivudin dirençli vakalarda, adefovir en önemli tedavi seçeneğimizdir. Lamivudin dirençli HBV suşlarıyla enfekte bireylerde, adefovir direncinin daha kolay geliştiği bilinmektedir (13).

İki farklı ajanı kullanarak daha etkin bir viral baskılanma sağlama düşüncesi, adefovir / lamivudin kombinasyon tedavisinin arkasındaki itici gücü oluşturmuştur. Lamivudin dirençli HBeAg pozitif vakalarda yapılan çalışmada, kombinasyon tedavisinin adefovir tekli tedavisinden üstün olmadığı ortaya konmuştur. Daha önceden hiçbir tedavi almamış hasta grubunda yapılan çalışmada, etkinlik açısından kombinasyon tedavisinin üstünlüğü gösterilememiştir. Hâlbuki kombinasyon grubunda lamivudin direnci daha az olarak gözlenmiştir (18).

4.3.5 Entekavir

Guanosinin karbosiklik bir analogu olan entekavir HBV tedavisinde kullanım onayı almış 3. ajandır. Daha önceden lamivudin almamış hastalarda yapılan çalışmalarda, 48 hafta süreyle 0.5 mg entekavir tedavisinin 100mg/gün lamivudine tedavisine kıyasla daha başarılı olduğu görülmüştür. Entekavir tedavi görenlerin %91'inde PZR ile saptanmayan viremi düzeyleri elde edilebilmişken, bu oran lamivudin grubunda %71'de kalmıştır. Yan etki profili lamivudinden farklı bulunmamıştır (13).

1mg/gün entekavir tedavisinin lamivudin dirençli bireylerin %70'inde HBV DNA'yı ölçülemeyecek seviyeye kadar baskılayabildiği bildirilmiştir. Geniş kapsamlı bir başka çalışmada lamivudin tedavisiyle kıyaslanınca entekavir tedavisinin; viremiyi kontrol etmede, viremi düzeyini azaltmada ve karaciğer histolojisini iyileştirmede daha başarılı olduğu bulunmuştur (18).

4.4. TÜMÖR NEKROSİS FAKTÖR-alfa

Tümör nekrozis faktör alfa (TNF α) aralarında T hücreleri ve makrofajların da bulunduğu pek çok hücre tarafından üretilir (19). Virüsler, bakteriler, parazitler, lipopolisakkarid ve interlökin 1 (IL-1), IL-2, IFN γ , granüosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) gibi sitokinler ve TNF α 'nın kendisi makrofajlardan TNF α yapımını artırır. Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF β), IL-4, IL-10 ve adenovirüs gibi uyarılar TNF α yapımını azaltırlar. TNF, IFN γ 'nın uyardığı IL12 yapımını baskılar (20). Böylece TH1 tipi sitokin yanıtının baskılanmasıyla inflamasyonun şiddet ve süresi sınırlanır. Uzun süreli TNF α uyarımı hem TH1, hem de TH2 aracılı immün yanıtları sınırlayarak kronik inflamasyonla seyreden hastalıkların patogenezinine ışık tutar (19,21).

4.4.1 TNF α düzeyinin ayarlanması

TNF α sentezi transkripsiyonel, translasyonel ve post translasyonel olarak kontrol edilir. Normal şartlarda çok düşük düzeylerde tutulan TNF α üretimi, uyarı varlığında aniden artar (19).

Transkripsiyon faktörlerinin TNF α promotoruna bağlanması, TNF α gen işlevlerinin düzenlenmesindeki ilk kontrol basamağıdır. Bu aşamadaki kontrol son derece önemli olsa da; asıl kontrol aşaması bundan sonraki aşamadır (19).

TNF α geninin 3' UTR bölgesi tıpkı diğer sitokinlerde olduğu gibi, AU-zengin, hızlı parçalanma motifi içerir. Bu motif sayesinde mRNA hızlı bir şekilde parçalanır. Transkriptin stabilizasyonu önemli bir kontrol basamağıdır (19).

TNF α ilk önce pro-TNF olarak sentezlenir ve hücre membranının dış yüzeyinde ifadelenir. Bu molekül kendi başına bazı biyolojik işlevleri yerine getirebilse de, asıl aktif TNF α molekülünün oluşması için TNF α converting enzim (TACE), gibi çeşitli proteazlarca parçalanarak serbest hale gelmesi gerekir (19).

4.4.2 TNF α etki mekanizması

TNF α 'nın etkinliği yapısal olarak homoloji gösteren iki farklı reseptör (TNFR1, TNFR2) aracılığıyla olur. Her iki reseptör de transmembran glikoproteinler olup, hücre dışı bölgelerinde sisteinden zengin motifler içerirler. Bu reseptörler eritrositler hariç neredeyse tüm hücrelerin yüzeylerinde bulunur. TNFR1, daha yaygın olup TNFR2 daha ziyade

endotel ve hematopoetik hücre serilerinde bulunur. Bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde TNFR2'nin rolü daha belirgindir (19).

Hücre yüzeyinde bulunan TNF α reseptörlerinin yanı sıra çözünür halde salgılanmış TNF α reseptörleri de vardır. TNF α işlevlerinin kontrolü bu salgılanmış TNFR'ler tarafından antagonize edilir. Deneysel sistemlerde TNF α 'nın işlevlerini yerine getirmesini engelledikleri gösterilmiştir. Kronik immün aktivasyonla ilişkili durumlarda çözünmüş TNFR miktarında artış saptanır (19).

TNF α , TNFR1'e bağlandığında, hücre içerisinde nükleer faktör kapa B (NF- κ B) ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek proinflamatuvar ve immün düzenleyici genlerin ifadenmesine yol açar. TNF α , normal şartlarda apoptotik uyarıyı tetiklemez (19).

TNF α , TNFR1'e bağlandıktan sonra, reseptör trimerize olarak hücre içi ölüm bölgeleri (*death domain*) aktif hale gelir. TRADD isimli bir protein bu ölüm bölgelerine bağlanarak hücre içi mesajı iletecek diğer moleküller için bağlanma bölgeleri oluşturur. Bunun sonucunda NF- κ B, JNK/AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu sağlanır. TRADD proteinine, FADD molekülün bağlanması *kaspaz* sisteminin aktivasyonu ile apoptosise neden olur (8). NF- κ B aktivasyonu, IKK isimli kinaz tarafından I κ B inhibitör proteinin fosforillenmesi ve NF- κ B / I κ B kompleksinden I κ B'nin ayrılmasıyla gerçekleşir (19).

4.4.3 TNF α 'nın antiviral etkileri

TNF α viral replikasyonu çeşitli yollarla engelleyebilir. Hücre tipi ve virüse göre viral replikasyonun artmasına veya azalmasına neden olur. TNF α 'nın TNFR'ye bağlanmasını takiben, hedef hücre aktive hale gelebilir, farklılaşabilir veya ölebilir. TNF α /TNFR aracılı immün yanıtı kendi lehlerine kullanabilen bazı virüsler, TNF α uyarısıyla aktif hale gelerek, yayılabilirler. Ayrıca TNF α , enfeksiyonlara karşı yanıtta sorumlu olan efektör hücrelerin, enfeksiyon odağına toplanmasını sağlayan sitokin-kemokin sistemi içinde önemli bir yere sahiptir. Hücreye virüs girişini engelleyebilir (19).

4.4.3.1 HBV enfeksiyonu ve TNF α

TNF α HBV enfeksiyonu patogeneğinde ve konağın istilacı organizmaya karşı oluşturduğu yanıtta çok önemli bir yere sahiptir.

HBx proteini, hücreyi TNF α aracılığıyla apoptotik öldürülmeye duyarlı hale getirir (22). Bu etkinlik TNFR miktarındaki artışla ilişkili değildir. HBx, enfekte hepatositlerden TNF α üretimini, bir transkripsiyon faktörü olan, NF-AT aracılığıyla artırır (23). NFAT' nin defosforilasyonuna ve nükleusa translokasyonuna neden olur. Nükleusa geçen NF-AT, HBx proteinin de rol aldığı bir mekanizmayla Gal4-NF-AT kimerik kompleksi şeklinde TNF α ve diğer sitokin promotorlarını aktive eder (19).

Kronik HBV enfeksiyonunda, hem hepatositlerde hem de infiltrate eden mononükleer hücrelerde yüksek düzeyde TNF α ve TNFR ifadelendiği görülür (19).

HBV enfeksiyonu, virüse özgü sitotoksik T lenfositlerinden salınan İFN γ ve TNF α aracılığıyla sınırlandırılır. İFN γ ve TNF α ' nın enfekte hücre sitoplazmasındaki HBV ürünlerini ve nükleusundaki cccDNA'yı non sitolitik olarak ortadan kaldırabilme yetisi vardır (19).

Deneyisel modellerde aşırı düzeyde TNF α aktivitesinin, fare karaciğerinde lenfositik infiltrasyon ve nekrozla karakterize kronik hepatite neden olduğu, bu durumun anti TNF antikorlar kullanılarak geri döndürülebildiği kısa bir süre önce gösterilmiştir (24).

4.5 TÜMÖR NEKROSİS FAKTÖR ALFA PROMOTOR POLİMORFİZMLERİ

TNF α inflamasyon sürecinde son derece önemli bir rol oynamasından dolayı hem otoimmün hastalıklar hem de enfeksiyon hastalıkları açısından kritik bir öneme sahiptir. Bu önemden dolayıdır ki, TNF α geninin işlevlerinin düzenlenmesi, patolojik durumlarla olan ilişkileri her zaman araştırmacılar için cezbedici olmuştur. Sağlıklı insanlar arasında TNF α düzeyleri büyük farklılıklar gösterir (25). Toplumda az ve çok TNF α üreten bireyler mevcut olduğunun anlaşılmasıyla TNF üretiminin genetik olarak kontrolü konusundaki farklılıkları anlayabilmek amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır.

Westendorp (26) yaptığı çalışmada meningokoksik menenjitli bireylerin sağ kalımlarını belirleyen faktörlerden birinin de birinci derecedeki akrabalarının TNF üretme kapasitesi olduğunu ispatlamıştır. Aynı cümleden olarak tek yumurta ikizlerinin kan TNF düzeylerinin uyum içerisinde olduğunu göstermişlerdir. Çalışmalarında TNF düzeylerinin ayarlanmasının hastalık seyrine önemli katkı sağladığını belirlemişler fakat bunun altında yatan genetik zemini açıklayamamışlardır. Bu çalışmanın verdiği ilhamla TNF promotorundaki tek nükleotid polimorfizmlerin belirlenebilmesi için çalışmalar yapılmıştır.

TNF α promotorunda 8 farklı DNA varyasyonu saptanmıştır (25). Bu varyasyonlar ve yerleşim bölgeleri aşağıda belirtilmiştir:

- a. -1031 T/C
- b. -862 C/A
- c. -857 C/T
- d. -575 G/A
- e. -376 G/A
- f. -308 G/A
- g. -244 G/A
- h. -238 G/A

4.5.1 TNF α promotor polimorfizmlerinin işlevsel önemi

Bu 8 varyantın transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasında farklılıklar yaratabileceği dolayısıyla da TNF α mRNA ve protein düzeylerinde saptanan varyasyonları açıklayabileceği öngörülmüştür (25).

Yapılan ilk çalışmalarda TNFA promotor bölgesindeki polimorfik yapıların; genin işlevini etkilemediğine dair kanıtlar elde edilmiştir. Hâlbuki sonradan yapılan bazı çalışmalarda TNFA promotor polimorfizmlerinin fenotipik değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir (25).

Bouma (27) yaptığı çalışmada -308 A genotipine sahip bireylerin serumlarındaki TNFA aktivitesinin daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Louis (28) ise -308A genotipli sağlıklı bireylerin lipopolisakkaridle karşılaştıklarında daha fazla TNFA ürettiklerini göstermiştir. Wilson (29) ise *RajiB* hücrelerine transfekte edilen -308A promotorunun 8 kat daha yüksek bazal aktivitesi olduğunu belirlemiştir.

TNFA promotorunun transkripsiyonel aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmaların birbiriyle çelişen sonuçlar vermesinin sebebi, çalışmalara alınan denek sayısının yetersizliği, çalışma grubunun heterojenitesi ve bireyler arasındaki büyük değişimler olduğu düşünülmektedir (25).

4.5.2 TNF α promotor polimorfizmlerinin hastalıklarla olan ilişkileri

TNFA promotorundaki polimorfizmlerin romatoid artrit (30,31), multipl skleroz (32,33), Ankilozan spondillit (34,35), astım (36,37) gibi hastalıklarla ilişkileri gösterilmiştir. TNF -308 A polimorfizminin çok basilli lepraya (38,39) karşı koruyucu rolü Brezilya çalışmalarında gösterilmiştir. Klinik çalışmalarda yüksek TNFA düzeylerinin ağır sıtmayla ilişkili olduğu anlaşılmıştır (25). Gambiya'da TNF-308A allelinin ağır serebral sıtma ve ölümlle ilişkili olduğu belirlenmiştir (40). Aynı grup daha sonradan yaptığı çalışmada TNF-238A allelinin sıtma kaynaklı anemiyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Antagonistik sitokin olan TNF α /IL10 düzeyleri arasındaki dengenin IL10 lehine bozulmasıyla serebral malarya ve ağır anemi geliştiği, May (41) tarafından ortaya konmuştur.

TNF α 'nın sepsis sürecinde iyi bilinen rolüne uygun olarak; TNF α varyantlarının araştırılması çekici gelmiştir. -308 bölgesindeki polimorfizm ve septik şok arasındaki ilişkiyi belirlemek için Stuber (42) tarafından yapılan ilk çalışmada, her hangi bir bağlantı bulunamamıştır. Halbuki sonradan yapılan çalışmada -308A allelinin kontrol grubundan daha sıklıkla görüldüğü ve mortalitede 3.7 kat artışa neden olduğu gösterilmiştir (43). Benzer sonuçlar Amerika'da travma sonrası gelişen sepsis (OR:4,6) ve sepsise bağlı mortalite (OR:2,1) ile -308A genotipinin ilişkili olduğunu göstermiştir (44).

Ülkemizden TNF α promotor polimorfizmleriyle ilişkili yayın son derece azdır. Özen (45) kötü seyirli juvenil idiyopatik artrit ile TNF α -308A genotipi ilişkili bulunmuştur. Karahan (46) pediatrik stroke grubunda kontrol grubuna kıyasla -308A genotipinde bir farklılık saptayamamıştır. Yazıcı (47) vitiligo üzerinde yaptığı çalışmada -308A genotipiyle vitiligo arasında ilişki saptayamamıştır. Akman (48) ise Behçetli hasta grubunda yapmış olduğu çalışmada -1031C allelinin Behçet hastalarında daha sık bulunduğunu göstermiştir. Buna ek olarak Akman ve arkadaşları (48) -1031T allelinin paterji test pozitifliğiyle ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar -1071C/C genotipli birey periferik kan mononükleer hücrelerinin lipopolisakkaridle karşılaştıklarında daha fazla düzeyde TNF α salgıladıklarını göstermişlerdir (48).

4.5.3 HBV enfeksiyonunda TNF α promotor polimorfizmlerinin rolü

TNF α 'nın HBV enfeksiyonunda oynadığı kritik rolün açıklanmasıyla TNF α promotor polimorfizmlerinin HBV enfeksiyonu seyrine olan etkilerinin araştırılması da

araştırmacılar için ilgi odağı haline gelmiştir. Bazı çalışmalarda HBV enfeksiyonunun doğal seyrine olan etkileri bazılarında ise tedaviye yanıt araştırılmıştır.

Höhler (49) -238A polimorfizmiyle kronik enfeksiyon arasında ilişki kurarken benzer ilişkiyi -308A polimorfizmi için saptayamamıştır.

Miyazoe (50) Japonya'da yaptığı çalışmada TNF promotor bölgesinin -238, -308, -857, -863, -1031 bölgelerini taradığı çalışmada hastalık progresyonu ile TNF promotor polimorfizimleri arasında ilişki kuramamıştır. Aynı çalışmada IL10 promotor polimorfizmi hastalık progresyonuyla ilişkili bulunmuştur.

Kim (51) -308A allel varlığının ve -863A allel yokluğunun HBV enfeksiyonunun iyileşmesiyle ilişkili olduğunu göstermiştir.

HLA-DRβ bölgesi, HBsAg'nin önemli antijenik determinantı olan p36 – 146 bölgesine bağlanma yeteneği daha önceden gösterilmiştir (52). Wang (52) Amerika'da yaptığı çalışmada genetik faktörlerin HBV aşılmasına yanıtı olan etkilerini incelemiştir. Bu çalışmada HLA-DRB1*07 ve HIV enfeksiyon varlığı aşuya yanıtı ile ilişkili bulunmuşlardır. Aynı çalışmada IL2 ve IL4 lokusundaki tek nükleotid polimorfizmi ve IL12B lokusunda insersiyon/delesyon varyantlarının da HBV aşılmasına olan etkileri gösterilmiştir. Bu çalışmada TNFα (-308 ve -238), IL6, IL10 polimorfizimleriyle aşuya yanıt arasında ilişki bulunamamıştır.

Lu (53) Çin'de yaptığı çalışmada -238G/A polimorfizmiyle kronik HBV enfeksiyonunun farklı seyirleri arasında ilişki kurmayı başarmıştır.

Xu (54) -308A genotipli kronik hepatit B enfeksiyonu olgularında serum TNFα düzeylerinin yüksek olduğunu göstermiştir. -308A genotipinin daha ağır ve ciddi hastalıkla ilişkisini saptayarak TNF α polimorfizimlerinin HBV progresyonuna katkı sağlayabileceği sonucuna varmışlardır.

Migita (55) yaptığı çalışmada TNFα -308, IFNγ, IL6, IL10 gen polimorfizimlerinin HCC ile ilişkili olmadığını saptamıştır. Aynı çalışmada TGFβ1 10. kodon mutasyonunun HCC ile ilişkili olabileceğini vurgulanmıştır.

Li (56) -238GA ve -857CC genotipinin kronik hepatit B hastalarında, kendini sınırlayan hastalığı olanlarla ve taşıyıcılarla kıyasla daha sık olduğunu göstermiştir.

Niro (57) -308GG genotipinin tüm son evre dekompanse sirozlu hastalarda olduğunu saptarken, kontrol grubunda GG genotipini %78 olarak bulmuştur. Aynı çalışmada, GG

genotip aile hikâyesi olanların tamamında pozitif olarak saptanmıştır. TNF α promotor polimorfizmleriyle hastalığın klirensi arasında bir ilişki saptanmamıştır.

Du (58) Çin'de yaptığı çalışmada -238GG genotipinin HBV enfeksiyonunun persistansıya ilişkili olduğunu göstermiştir. -857TT genotipi HBV klirensiyle ilişkili bulunmuştur.

Li (59) -238GG genotipinin persistan enfeksiyonla ilişkili, -308 bölgesindeki polimorfizmin ilişkisiz olduğunu saptamıştır.

Yapılan çalışmaların bazılarında TNFA promotor polimorfizmleri hepatit B virüsünün spontan klirensiyle ilişki olduğu kimilerinde ise ilişkisiz olduğu gözlenmiştir. Doğu Asya'dan yayınlanan araştırma raporlarında bu ilişki gözlenirken Avrupa kökenli yayınlarda bu ilişki kimi zaman saptanamamıştır. Sonuçlar, ırksal farklılıkların HBV enfeksiyon seyrini etkilediğini çağrıştırmaktadır.

Aynı zamanda çalışmalarda metodolojik olarak oluşan farklılıklar sonuca etki etmiş olabilir.

Serum TNF α düzeyleri KHB hastalarında artmış olarak bulunmaktadır. Serum düzeylerindeki bu artış karaciğerdeki nekroinflamasyonun şiddeti, fibrozisin evresi ve serum transaminaz düzeyleriyle ilişkili görülmektedir.

Bu güne kadar ülkemizden KHB ile TNFA promotor polimorfizmlerinin muhtemel ilişkisini araştıran bir çalışma yayınlanmamıştır. Hâlbuki Anadolu, Asya ve Avrupa arasında bir köprü oluşturmaktadır. Genetik çeşitliliğin bu kadar farklı olduğu bir toplumda TNF α promotor polimorfizmlerinin araştırılması ve çeşitli klinik durumlarla ilişkilendirilmesi elzemdir.

TNF α promotor bölge polimorfizmlerinin, KHB' nin neden olduğu karaciğer nekroinflamasyonu, fibrozis evresi ve transaminaz düzeylerindeki artışla olan ilişkisinin belirlenmesi ve KHB hastalığının, İFN α 2b+lamivudin ile tedavi başarısı üzerine olan etkisinin belirlemek amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

5. MATERYAL ve METOD

5.1 Hasta Seçimi

Çalışmaya Klinik Bakterioloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim dalında HBeAg negatif KHB teşhisi konulan 43 hasta alındı. KHB aşağıdaki kriterler göz önüne alınarak teşhis edildi.

- a. HBsAg altı aydan uzun süredir pozitif.
- b. antiHBs negatif
- c. AST ve ALT değerleri normalden en az 1.5 kat yüksek
- d. HBV DNA (RT-PCR) pozitif
- e. Son bir ay içerisinde yapılmış ve Kronik hepatit histolojisi gösteren karaciğer biyopsi incelemesi.
- f. 18 yaşından büyük erkek ve kadınlar
- g. HBeAg, anti HCV, anti HIV, anti HDV negatif
- h. antiHBe pozitif veya negatif
- i. ANA $\leq 1/100$ (IFAT)
- j. Daha önceden kronik hepatit nedeniyle tedavi almamış hastalar.
- k. Portal hipertansiyon, karaciğer dekompanseasyon bulguları olmayan serum albümin ≥ 3 g/dl, T.Bilurubin ≤ 2 g/dl, PT ≤ 1.5 INR, asit: negatif,

5.2 Tedavi ve hastaların takibi

HBeAg negatif Kronik Hepatit B teşhis edilen hastalara lamivudine 100mg/gün (Glaxo-Smith Kline Beecham, ABD) ve İnterferon alfa2b 10MU (Schering Plough, ABD) haftada 3 kez olacak şekilde başlandı. Hastalara ilk doz interferon tedavileri hastanede yatırılarak uygulandı. Hastalar tedavi başladıktan sonra ilk kez 15. günde kontrole çağrıldıktan sonra aylık olarak polikliniğimizde kontrole tabii tutuldular. Poliklinik kontrolleri sırasında tam kan sayımı, AST, ALT, amilaz düzeyleri aylık olarak, HBV DNA düzeyi ise 3 aylık aralıklarla takip edildi. Her ay kontrolleri sırasında yan etkilerin sorgulanması amacıyla 20 sorudan oluşan bir anket hastalara uygulandı. Tiroit disfonksiyonu düşünülen hastalar endokrinoloji kliniğiyle, duyu duru bozukluğu

düşünülen hastalar psikiyatri kliniğiyle konsülte edildi. Hastalar toplam 1 yıl süreyle tedavi aldılar.

5.3 Tedaviye yanıt kriterleri

Hastaların tedaviye yanıtları aşağıdaki şekilde değerlendirildi.

Tedaviye yanıtı olmayan vakalar: 6 veya 12 aylık tedavi sonrasında ALT değeri yüksek, HBV DNA pozitif olanlar

Tedavi sonu yanıt: 12 aylık tedavi sonunda HBV DNA PZR ile negatif, AST/ALT normal

Kalıcı Yanıt: 18. ay sonunda HBV DNA PZR ile negatif, AST/ALT normal

Araştırmamız Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandıktan sonra, deneklerden 2cc EDTA'lı tam kan tüpüne çevresel kan örneği alınarak, çalışılincaya kadar 4°C'da saklandı. DNA izolasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon enzim kesimi çalışmaları Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı. DNA aşağıda anlatıldığı şekilde izole edildi.

5.4 DNA İzolasyonu

- Falcon tüplerinin içerisine 10 ml soğuk steril distile su konuldu.
- Bunun üzerine EDTA'lı tüp içerisindeki periferik kandan 1 ml eklendi ve pipetaj yapılarak homojen bir şekilde karışım sağlandı.
- 4500'rpm de 3 dakika santrifüj edildi.
- Oluşan süpernatant kısmı dökülerek pelletin falkon tüpün dip kısmında kalması sağlandı.
- Pellet'in üzerine 850 µl nuclei lysis buffer eklendi ve pipetaj yapılarak pelletin homojen hale gelmesi sağlandı.
- 37°C'de 10 dakika bekletildi ve tekrar pipetaj yapıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi.
- Homojen hale gelmiş olan materyalin üzerine 850 µl kloroform eklendi ve vorteks ile karıştırılıp 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı.
- 13000 RPM'de 3 dakika santrifüj edildi ve sonucunda faz oluşumu sağlandı.

- Üst tabakadaki şeffaf kısım alınarak ayrı bir ependorf içerisindeki 1 ml %96'lık alkolün üzerine eklendi ve alt üst edildikten sonra DNA yumak halinde gözle görülür hale getirildi.
- 12000 RPM'de 4 dakika santrifüj edilip alkol döküldü ve DNA ependorfun dibine çöktürüldü.
- Üzerine 200–500 µl %70'lik alkol (etil alkol) eklenip 12000 RPM'de 3 dakika santrifüj edildi.
- %70'lik alkol dökülüp dip kısımdaki DNA'nın kuruması için ependorf ters çevrilip havada kurumaya bırakıldı.
- Havada kurutulan DNA steril distile su (150–300 µl) ile homojen hale getirildi.
- DNA, PZR analizinde kullanana kadar -80°C'de depolandı.

5.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

TNF α promotörü -238G/A tek nükleotid polimorfizmini araştırmak üzere *MspI* enzimi için kesme bölgesi içeren hedef bölge Du (69) tarafından belirtildiği şekilde,

forward 5'- AGA AGA CCC CCC TCG GAA C -3' ve

reverse 5'- ATC TGG AGG AAG CGG TAG TG -3' primerleri kullanılarak çoğaltıldı.

TNF α promotörü -308G/A polimorfizminin değerlendirilmesi için *NcoI* enzim kesim bölgesi içeren hedef bölge şu şekilde,

forward 5'- AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT -3' ve

reverse 5'- TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG -3' primerleri kullanılarak çoğaltıldı.

Her iki polimorfizmin çalışılması için PZR 20 µl'de gerçekleştirildi. Reaksiyon;

- 1,6 µl dATP, dGTP, dTTP ve dCTP (10 pmol)
- 2 µl 10xPZR tamponu
- 1 µl MgCl₂ (25 mM MgCl₂)
- 1,2 µl 10 pmol primer
- 11,8 µl steril dH₂O

- 0,4 µl DNA Taq polimeraz enzimi (Fermentas)
- 2 µl genomik DNA

içeren karışım ile gerçekleştirildi. PZR Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 model termal cycler'da yapıldı. Her iki gen bölgesi için ayrı ayrı PZR optimizasyonu gerçekleştirilerek aşağıda belirtildiği üzere PZR döngüleri gerçekleştirildi.

TNF α promotor -238G/A polimorfizmi için PZR döngüsü:

- 94°C'de 3 dakika bir döngü
 - 94°C'de 0,15 dakika,
 - 59°C'de 0,15 dakika,
 - 72°C'de 0,15 dakika,
- } 10 döngü
- 94°C'de 0,15 dakika,
 - 57°C'de 0,15 dakika,
 - 72°C'de 0,15 dakika,
- } 25 döngü
- 72°C'de 3 dakika ve
 - 4°C'de bir döngü

TNF α promotor -238G/A polimorfizmi için PZR döngüsü:

- 94°C'de 3 dakika bir döngü
 - 94°C'de 0,15 dakika,
 - 57°C'de 0,15 dakika,
 - 72°C'de 0,15 dakika,
- } 30 döngü
- 72°C'de 3 dakika ve
 - 4°C'de bir döngü

5.6 Jel Elektroforezi

Elde edilen PZR ürününü olup olmadığını değerlendirmek için %3'lük agaroz (Agaroz Basica), TAE (Tris, Asetik asit ve EDTA) solüsyonu ile karıştırılıp kaynatılarak agaroz jel hazırlandı. Agaroz TAE içinde eritilip 50-60°C'ye soğutulduktan sonra EtBr (10µg/ml Ethidium bromür) ilave edildi. Jelde kuyucuklar oluşturmak için jel kabına dökülerek uygun taraklar yerleştirildi. Elde edilen PZR ürününden 5 µl alınıp yükleme,

boyası (6 x loading dye, Fermentas) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel 45 dakika 120 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu. Ayrıca gözlenen bantların beklenen bantlar olup olmadığını tespit etmek için pBR322 DNA/BsuRI (Fermentas) DNA ladder kullanıldı. Jel UV illüminator altında değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda -238 ve -308 bölgeleri için sırasıyla 152 ve 107bp büyüklüğünde farklı bantlar gözlemlendi.

5.7 Restriksiyon Enzim Kesimi

Değerlendirme sonucunda geriye kalan 15 µl'lik PZR ürününe Restriksiyon Enzim kesimi yapıldı. Restriksiyon Enzim kesimi için 6 µl'lik karışım hazırlandı. 6 µl'lik karışım içinde;

- 3,5 µl steril dH₂O
- 2 µl Restriksiyon Enzim Buffer
- 0,5 µl Restriksiyon Enzimi
 - TNFα-238 gen bölgesi için *MspI* (Promega, ABD)
 - TNFα-308 gen bölgesi için *NcoI* (Fermentas, İngiltere)

içeren karışım ile gerçekleştirildi. Bu 6 µl'lik karışımlar PZR ürününün içerisine eklendi ve etüvde 37°C'de 12-16 saat bekletildi.

İşlem sonrasında %3'lük agaroz jel hazırlandı. Elde edilen enzim kesimi ürünü jele yüklendi. Jel 45 dakika 120 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu ve gözlenen bantların beklenen bantlar olup olmadığını tespit etmek için pBR322 DNA/BsuRI (Fermentas) DNA ladder kullanıldı. UV illüminator altında değerlendirildi.

Kesme sonucunda TNFα-238 ve -308 bölgeleri için elde edilen DNA büyüklükleri ve gösterdikleri polimorfizm aşağıdaki gibi değerlendirildi.

	TNFα -238	TNFα -308
GG	132+20bp	87+20bp
GA	152+132+20bp	107+87+20bp
AA	152bp	107bp

5.8 İstatistik Analizler

Çalışma grubuna ait özellikler ve PCR-RFLP tekniği ile elde edilen değerlerde SPSS10.0 programı kullanılarak Ki-kare analizi yapıldı. Transaminaz değerlerinin, TNF α promotor polimorfizmleriyle olan ilişkisinin bulunabilmesi için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık seviyesi olarak 0,05 değeri alındı.

6. BULGULAR

Hastaların özellikleri

33 erkek, 10 kadın toplam 43 hasta çalışmaya alındı. Hastaların ortalama yaşları 38.23 ± 10.53 idi. Hastaların 13 tanesinde İFN tedavisi 24. haftadan sonra kesildi. Tedavi kesme gerekçesi hastaların 4'ünde yan etkiler, 7 hastada tedaviye yanıtızsızlık ve iki hastamızda Sosyal Sigorta Kurumunun tedaviyi ödemeyişiydi. Hastalar, İFN tedavisi kesildikten sonra lamivudine tedavisine devam ettiler.

Transaminazlar üzerine TNF α promotor polimorfizlerinin etkisi

Hastaların başlangıç AST ve ALT değerleri ortalama değere göre yeniden sınıflandırıldı. Mann-Whitney-U analiziyle promotor polimorfizmleriyle transaminaz değerleri arasındaki ilişki araştırıldı. TNF α -238 ve -308. bölgelerindeki polimorfizmleriyle transaminaz yüksekliği arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı.

Histolojik Aktivite üzerine TNF α promotor polimorfizmlerinin etkisi

Hastaların Histolojik aktivite (HAİ) puanları ve evreleme Knodell'e göre yapıldı. HAİ puanı 9 ve üzerinde olanlar ciddi KHB, 8 ve altında olanlar ise hafif KHB olarak değerlendirildi. Histolojik olarak evre II hafif KHB olarak tanımlanırken, evre III, IV ve V ciddi KHB olarak kabul edildi. HAİ puanına ve evreye göre ciddi KHB olarak değerlendirilen gruplarla, hafif KHB olarak değerlendirilen gruplar TNF α promotor polimorfizmleri açısından araştırıldı. TNF α promotor -238 ve -308 bölgelerindeki polimorfizmlerin KHB' nin ciddiyetine katkıda bulunmadığı bulundu.

Tedaviye Yanıt

Hastaların ortalama aspartataminotransferaz (AST) ve alaninaminotransferaz (ALT) değerleri tablo 1'de özetlenmiştir. Başlangıç değerleriyle kıyaslandığında 6, 12 ve 18. aylarda istatistiksel olarak anlamlı azalmalar saptanmıştır.

Tablo 1: KHB hastalarının ortalama AST/ALT değerleri

Transaminaz	Başlangıç	3. ay	6. ay	12. ay	18. ay
AST	68.0	56.71	40.68*	27.05*	28.34*
ALT	108.32	69.42	50.39**	28.32**	38.63**

- $p=0.000$ başlangıç AST değerleriyle kıyaslandığında
- ** $p=0.000$ başlangıç ALT değerleriyle kıyaslandığında

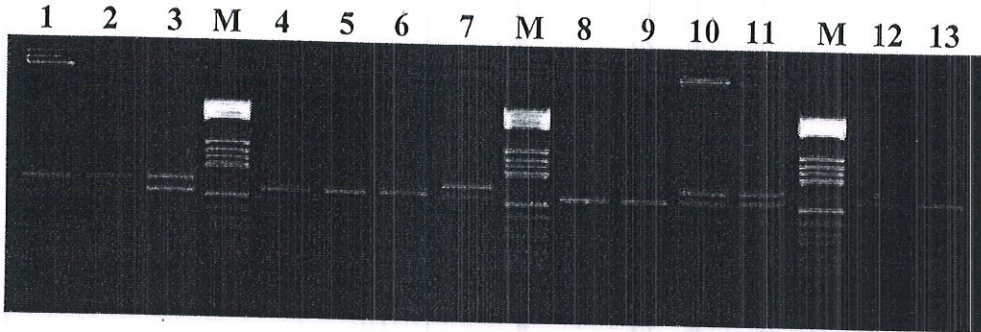
Hastaların ortalama HBV DNA düzeyleri tedavi başladıktan sonra hızla azaldı. 3,6, 12 ve 18. aylarda ölçülen HBV DNA düzeyleri başlangıç değerlerine göre anlamlı olarak azaldı.

7 hastada (%16.2) tedaviye yanıt elde edilemezken, hastaların %83.8'sinde tedavi sonu yanıt elde edildi. Tedavi sonu yanıt elde edilenlerden de 4 kişide, interferon kesildikten sonra viral rebound ortaya çıktı. Takip süresi sonucunda hastaların %67.4'inde virolojik ve biyokimyasal yanıt devam etmekteydi (kalıcı yanıt). Tedaviye kalıcı yanıtla, cinsiyetin, başlangıç HAI puanı ve histolojik evrenin, ALT ve HBV DNA düzeylerinin ilişkili olmadığı saptandı.

TNF α promotor polimorfizmleri ve tedaviye yanıt

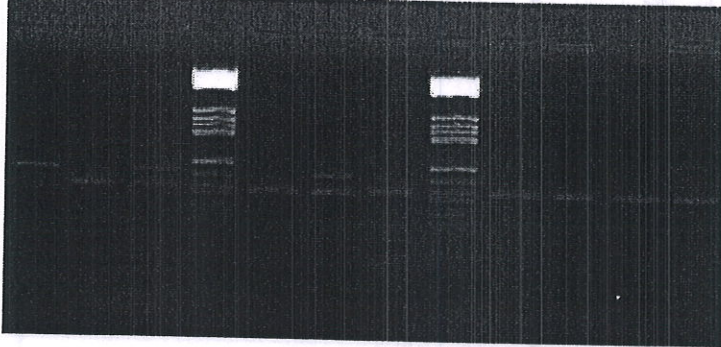
TNF α promotor bölgesindeki polimorfizmlerle tedaviye yanıt arasındaki ilişki araştırıldı (Tablo2, 3). Tedaviye yanıt vermeyen, tedavi sonu yanıt veren ve kalıcı yanıt gösteren hastaların TNF α promotor genotipleri tablo 4'de gösterilmiştir. Kalıcı yanıt veren hasta grubuyla diğer hastalar TNF α promotor polimorfizmi açısından kıyaslandı. Kalıcı yanıt veren hasta grubunun TNF α promotor -238 ve -308 bölgelerindeki tek baz polimorfizmleri açısından diğer gruptan farklı olmadığı bulundu (Tablo 5).

Tablo2: TNF α -238 promotor polimorfizmlerinin PZR-RFLP ile gösterilmesi M, DNA marker, sıra no:1 PZR ürünü (152bp), sıra2: genotip: AA (152bp), sıra 3,7,10,11: genotip GA (152+132+20bp), sıra 4,5,6,8,9,12,13: genotip GG (132+20bp).



Tablo 3: TNF α -308 promotor polimorfizmlerinin PZR-RFLP ile gösterilmesi M, DNA marker, sıra no:1 AA allel (107bp), sıra 2,4,6,7,8,9,10: genotip GG (87+20bp), sıra 3,5 genotip GA (107+87+20bp), sıra 4,5,6,8,9,12,13: genotip GG (132+20bp).

1 2 3 M 4 5 6 M 7 8 9 10



Tablo 4: Genotiplere göre hastaların tedavi yanıtları

Gen Bölgesi	Yanıt vermeyen hasta sayısı	Tedavi sonu yanıt veren hasta sayısı	Kalıcı yanıt veren hasta sayısı
-238 GG	4	3	29
GA	3	1	3
-308 GG	6	4	28
GA	1	-	4

Tablo 5: Yeniden gruplandırma yapıldıktan sonra kalıcı yanıt veren hastalarla kalıcı yanıt vermeyen hastaların TNF α promotor polimorfizmi yönünden kıyaslanması.

Gen bölgesi	Tedavi sonu yanıt + yanıt vermeyenler	Yanıt Kalıcı yanıt verenler	P
-238 GG	4	32	0.119
GA	3	4	
-308 GG	6	32	0.957
GA	1	4	

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

HBV endemik olduğu bölgelerde, karaciğer kanser ve karaciğer yetmezliğine sebep olabilmesi sebebiyle, ölüme yol açan önemli sağlık sorunlarından birisidir. ABD’de yılda 5000 kişinin HBV nedeniyle gelişen karaciğer hastalığından dolayı kaybedildiği bilinmektedir. HBV enfeksiyonunun seyrine sadece virüsün virülansı etki etmez. Konak faktörleri de hastalığın seyri konusunda etkilidir (39,50,60).

HBV’ ye karşı başlangıçta yetersiz immün yanıt oluşturan bireylerde HBV enfeksiyonunu kronikleşmektedir. Yaş, kronikleşmeyle ilgili bilinen en önemli risk faktörüdür. Enfekte infantların %90’ında, çocukların %50’sinde ve erişkinlerin %5’inde enfeksiyon kronikleşmektedir (13, 50, 60).

Ayrıca HBV/HIV koenfeksiyonu olan, transplant hastaları ve immün yetmezliği bulunanlarda HBV enfeksiyonunun kronikleştiği bilinmektedir. HBsAg ‘a’ determinant mutantları, HBV genotipleri, kor promotor mutantlarında enfeksiyon kronikleşebilmektedir (50).

HBV’nin temizlenmesi için doğal ve edinsel mekanizmaların düzgün çalışması gereklidir. Akut, kendini sınırlayan HBV enfeksiyonunda çok yönlü, güçlü, HBV yüzey ve polimeraz antijenlerine karşı gelişmiş poliklonal immün yanıt sebebiyle, HBV DNA klirensi daha klinik bulgular ortaya çıkmadan sağlanır. Böylesine güçlü bir yanıt karaciğer dokusunda artmış TNF α ve IFN γ düzeyleri ve Th1 tipi immün yanıtla sağlanır (50,61-62)

TNF α ’ nın HBV enfeksiyonunun sınırlanmasındaki rolü çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. TNF α , HBV kor protein promotorunun ifadenmesini engeller. TNF α , sitolitik olmayan bir şekilde HBV’nin enfekte hücre içerisinde ortadan kaldırılmasına neden olur. TNF α , *in-vitro* olarak HBV mRNA’nın parçalanmasına neden olmaktadır. Gene TNF α blokörü alanlarda, HBV enfeksiyonunun alevlendiği bilinmektedir (61,62). TNF α hepatosellüler hasarda rol oynarken, serum TNF α düzeylerinin hastalığın seyriyle olan ilişkili olduğu, KHB’li hastalarda oldukça arttığı saptanmıştır (63,64).

Daha önce Alman çalışma grubu üzerinde Höhler’in (49) yürüttüğü çalışmada, HBV klirensi gösteren vakaların %94’ünde, KHB vakalarının %75’inde ve kontrol grubunun %93’ünde G/G genotipini saptamıştır. -238GG genotipinin HBV klirensiyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Hâlbuki Miyazoe (50), Japonya’dan bildirdiği çalışma grubunda -238A genotipinin çalışma grubunun %5’inden daha azında bulunduğunu saptamıştır. Miyazoe, kronikleşmeyle -238. pozisyonundaki polimorfizmi ilişkisiz bulmasını etnik

farklılıklara bağlamıştır. Miyazoe (50), Avrupa ve Asya nüfusları arasında saptanan farkın enfeksiyonu edinme yaşı ve şeklini de etkiliyor olabileceğini öne sürmüştür.

Miyazoe'nin görüşünün aksine Lu (53) yaptığı çalışmada, Çin popülasyonunda HBV klirensi gösterenlerde -238 GG genotipinin, kronik hepatitli bireylere kıyasla daha sıklıkla görüldüğünü göstermiştir. Benzer şekilde Li (56), Çin'de yürüttüğü araştırmada, -238 GG genotipinin doğal bağışıklık gösteren bireylerde KHB'li ve HBV taşıyıcı bireylere kıyasla daha sık görüldüğünü gözlemlemiştir. Du (58) ve Li (59) kendilerinden önce Çin'de yapılan çalışmaları doğrular şekilde -238GG genotipini hastalığın sebat etmesiyle ilişkilendirmiştir. Niro (57), İtalya'dan bildirdiği çalışma sonucunda, -238. pozisyonadaki polimorfizmin HBV seyrini etkilemediğini bulmuştur. Asya kökenli çalışmalarda KHB grubunda %83.9–98 oranında -238GG genotipi saptanırken, Avrupa kökenli çalışmalarda bu oran %75–88 olarak bulunmuştur.

Hastalığın ciddiyetiyle ilgili daha önceden yapılan çalışmalarda Höhler (65), Baret (66) ve Dai (67) Kronik Hepatit C (KHC) hastalarında -308 GA polimorfizminin fibrozis ve hastalığın ciddiyetiyle ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Hâlbuki Romero-Gomez (68) yaptığı çalışmada benzer bulgulara ulaşamamıştır. Höhler (65), Baret (66) tarafından yapılan çalışmalarda -238GA polimorfizmiyle KHC' ye bağlı ciddi karaciğer rahatsızlığı arasında bir ilişki gösterilebilmiş olsa da, Dai (67) bu ilişkiyi kendi çalışmasında gösterememiştir.

Bizim çalışmamız KHB hasta grubunda yapılan ve hastalığın ciddiyetiyle TNF α promotor -238 ve -308 polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırması bakımından ilk çalışmadır. Daha önceden bildirilen çalışmalarda antiHBe pozitif hasta grubunda AST ve ALT düzeylerinin karaciğer histolojisindeki hastalığın şiddetiyle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (69).

Çalışmamızda yüksek transaminaz düzeylerinin antiHBe pozitif hasta grubunda TNF α promotor -238 ve -308 bölgelerindeki tek baz polimorfizmleriyle ilişkinin olmadığını gösterdik. Sonuçlarımız daha önceden TNF α promotoru -308 bölgesindeki tek baz polimorfizmini araştıran Suneetha (70)'nin sonuçlarıyla uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda yüksek HAI puanına sahip hastalarla, HAI puanı düşük hasta grubu kıyaslandığında, TNF α ' nın serum düzeylerini etkilediği gösterilen promotor bölge polimorfizmleri açısından gruplar arasında fark olmadığı bulunmuştur. Kiki (63) ve

arkadaşları KHB hastalarında serum TNF α düzeylerinin, HAİ puanına bağlı olarak artarken, siroz evresinde Child skoru yükseldikçe TNF α düzeylerinin düştüğünü gözlemlemişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlar, Kiki (63) tarafından gösterilen TNF α düzey artışının TNF α promotor -238 ve -308 bölgelerindeki tek baz polimorfizmine bağlı olmayabileceğini göstermektedir. KHB hastalarında artmış serum TNF α düzeyinin sebebi virüse karşı oluşan doğal immün yanıt sebebiyle olduğunu düşünmekteyiz. TNF α biyosentezinin aşırı promotor aktivasyonundan ziyade öncelikle artmış virolojik uyarı neticesinde oluştuğu kanaatindeyiz.

Bulgularımız daha önce KHB hasta grubunda hastalık ciddiyeti üzerinde araştırma yapan Suneetha'nın (70) TNF α promotor -308 gen bölgesi için elde ettiği verilerle uyumludur. Suneetha (70) KHB enfeksiyonunun ciddiyetini TNF β ve Vitamin D Reseptör (VDR)' deki polimorfizmlerle olan ilişkisini gösterirken, TNF α -308 bölgesindeki tek nükleotid polimorfizminin hastalık ciddiyetine etki etmediğini göstermiştir.

TNF α promotor -238 ve -308 bölgelerindeki tek baz mutasyonlarının fibrozis evresiyle ilişkili olmadığını bulduk. Çalışma sonuçlarımız Suneetha (70) ve arkadaşlarının sonuçlarıyla uyumlu olarak değerlendirildi. İlginç olarak KHC söz konusu olduğunda, TNF α promotor -238 ve -308 polimorfizmlerinin hastalığın ciddiyetine etki etmektedir. Hâlbuki KHB için durum farklıdır. Bulgular her iki virüse karşı oluşan immün yanıt farklılığını bir kez daha destekler niteliktedir (61,62).

Çalışmamızda bir yıl süreyle verilen İFN α +lamivudine kombinasyon tedavisiyle hastaların %83.8'inde tedavi sonu yanıt elde edilmiştir. Lamivudine+İFN α kombinasyonu ile tedavi sonunda elde ettiğimiz sonuçlar daha önceden rapor edilen sonuçlarla uyum içindedir. Karabay (71) kalıcı yanıtı %53 düzeyinde saptamış olup bizim elde ettiğimiz %67.4 oranına nazaran daha düşük bir değerdir. Daha önceden Economou (72) tarafından yapılan çalışmada tedavi sonu yanıtı %88 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada kalıcı yanıt açısından kombinasyon tedavisiyle lamivudin dirençli mutantların ortaya çıkmasının engellenebildiği gösterilmiştir.

antiHBe pozitif vakların tedavisindeki en önemli güçlük, tedavi kesildikten hemen sonra vireminin yeniden başlaması ve ALT değerinin yükselmesidir. Dolayısıyla tedavi antivirallerle uzun süre devam ettirilebileceği günümüzde dahi önerilmektedir (73). Çalışmamızda elde edilen yüksek kalıcı yanıt oranlarının lamivudin tedavisinin devam etmesiyle açıklayabiliriz.

King (74) daha önce yapmış olduğu çalışmada İFN sinyali yolaklarında yer alan eIF-2 α ve HBV MxA genindeki polimorfizmlerin KHB'nin İFN α tedavisine yanıtını belirlemede etkili olduğunu göstermiştir. Chan (75), İnterlökin1 β polimorfizminin interferon tedavisine yanıtta rolü olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmamızda ayrıca TNF α promotor -238 ve -308 bölgelerindeki polimorfizmlerin tedaviye yanıtı etkilemediğini bulduk.

Daha önce KHC hastalarında yapılan bir çalışmada hastalığın TNF α promotor -308 genotipinin hastalık ciddiyetiyle ilişkili olduğu halde, İFN α 'ya yanıtla ilişkili olmadığı gösterilmiştir (76). Her ne kadar, hasta gruplarımız farklı da olsa, TNF α promotor polimorfizmlerinin İFN α tedavisine yanıtı etkilemediği görülmektedir. Sonuçlarımız İFN α aracılı anti-HBV yanıtın ve viral replikasyonun engellenmesinin TNF α hariç diğer yolaklarla oluştuğunu düşündürmektedir.

Son zamanlarda yayınlan raporlarda TNF α promotor -238 ila -244 nükleotidlerinin metilasyona uğrayabileceğini göstermektedir. Metilasyonun DNA transkripsiyonu ve promotor işlevlerini etkilediği bilindiğinden; TNF α promotorundaki bu değişimlerin TNF α ifadenmesini düzenleyebileceği unutulmamalıdır (47).

TNF α gen bölgesiyle ilgili bir önemli husus ta, bu bölgenin MHC gen bölgesiyle bağlantı eşitsizliği içerisinde (linkage disequilibrium, LD) olmasıdır. LD, birbirine komşu bölgelerin rasgele bir şekilde olmadan ilişkiye girmesidir (47). Sonuçlarımız, TNF α gen promotorunun LD içerisinde bulunduğu MHC lokusu tarafından da etkilenmiş olabilir.

TNF α promotor bölgesindeki polimorfizmlerin hastalıklarla veya hastalık seyriyle olan ilişkilerini belirlemek için yapılan çalışmalar gittikçe artmaktadır. Polimorfizm çalışmalarında hangi sonucunun *a priori* olduğuna ve hastalığa katkı derecesine karar vermek güçtür. TNF α promotoru gibi daha pek çok geni içeren çalışmalar sonucunda, bu etkinin önemli mi yoksa önemsiz mi olduğuna karar verilebilecektir (47).

Özetle çalışmamızda, TNF α promotoru -238 ve -308 noktalarındaki tek bazı polimorfizmlerinin KHB' de gözlenen histolojik aktivite, fibrozis evresine ve tedaviye yanıtı etki etmediğini bulduk. antiHBe pozitif vakalar arasında kimlerin tedaviye yanıt vereceğinin tedavi öncesi öngörülerek tedavi planının buna göre yapılabilmesi için daha geniş ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. ÖZET

Amaç: HBeAg negatif kronik hepatit B enfeksiyonunun ciddiyetine ve interferon alfa + lamivudin kombinasyon tedavisine verilen yanıtların öngörülmesinde TNF α promotor polimorfizmlerinin rolünün araştırılması

Hastalar: Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kliniğinde 2002 – 2007 yılları arasında HBeAg negatif Kronik Hepatit B tanısıyla takip edilen 43 hasta çalışmaya alındı. Karaciğer biyopsileri hastanemizde yapıldı. Hastalara bir yıl süreyle haftada üç kez interferon alfa2b 10MU ve lamivudin 100mg/gün tedavisiyle tedavi edildiler. Hastalar aylık olarak poliklinikte kontrol edildiler.

Bulgular: Nekroinflamatuvar ve fibrozis skorları açısından ciddi kronik hepatit olarak değerlendirilen hastalarla, daha hafif düzeyde nekroinflamasyona ve fibroze sahip olan hastalar arasında TNF α promotor -238 ve -308 tek baz polimorfizmi açısından ilişki saptanmadı. Tedaviyle birlikte 3 ay içerisinde hastaların AST ve ALT düzeylerinde istatistiksel anlamlı azalmalar elde edildi (p=0.000). %16.2 hastada tedaviye yanıt elde edilemedi. Kalıcı virolojik ve biyokimyasal yanıt hastaların %67.4'ünde saptandı. Kalıcı yanıt veren hastalar ve kalıcı yanıt vermeyen hastalar TNF α promotor polimorfizmleri açısından kıyaslandığında iki grup arasında fark saptanmadı.

Sonuç ve Tartışma: TNF α promotor -238 ve -308 bölgesindeki tek baz polimorfizmleri Türk popülasyonunda KHB enfeksiyonunun ciddiyetine ve hastalığın antiviral tedaviye yanıtına etki etmemektedir.

9. SUMMARY

Aim: To investigate whether TNF α promoter polymorphisms affect disease severity and response to interferon alpha plus lamivudine combination therapy in HBeAg negative chronic hepatitis B patients.

Patients and Methods: 43 patients diagnosed to have HBeAg negative chronic hepatitis B between years 2002 – 2007 at Department of Clinical Bacteriology and Infectious Disease were enrolled in this study. All patients underwent liver biopsy examination before the onset of treatment. Patients received interferon alpha 2b 10MU tiw and lamivudine 100mg/day combination therapy for a year. Routine follow-ups were carried-out at out-patient clinics of our department. TNF α promoter polymorphisms at positions -238 and -308 were studied by PCR-RFLP.

Results: Patients diagnosed to have severe hepatitis as a result of higher necroinflammatory and fibrosis scores and higher AST/ALT levels were compared with patients who had milder disease. No statistically significant difference was found between patients with severe disease and milder disease in terms of TNF α promoter -238 and -308 polymorphisms. 24 week after commencement of antiviral treatment AST and ALT levels were decreased significantly with respect to initial values. 16.2% of patients did not respond to treatment whereas sustained response was achieved in 67.4% of patients. Once again, no statistically significant difference was found between sustained responders and nonresponders in terms of TNF α promoter -238 and -308 polymorphisms.

Discussion: TNF α promoter polymorphisms at position -238 ve -308 do not contribute to disease severity and response to antiviral treatment in Turkish chronic hepatitis B patients.

10. KAYNAKLAR

1. Buster EHJ, Janssen HLA, Antiviral treatment for chronic hepatitis B virus infection – immune modulation or viral suppression?, The journal of Medicine Netherlands, 2006, 64:6 175-185
2. Özdemir D, Kurt H, Hepatit B virusu enfeksiyonlarının epidemiyolojisi In: Viral hepatit 2007 Tabak F, Balık İ, Tekeli E, Viral Hepatitle Savaşım Derneği İstanbul: Ohan Matbaası, 2006, 108-117
3. Mıstık R, Türkiye’de viral hepatit epidemiyolojisi yayınların irdelenmesi, In: Viral hepatit 2007 Tabak F, Balık İ, Tekeli E, Viral Hepatitle Savaşım Derneği İstanbul: Ohan Matbaası, 2006, 10-50
4. Mert A, İnaktif HBsAg taşıyıcılığı, In: Viral hepatit 2007 Tabak F, Balık İ, Tekeli E, Viral Hepatitle Savaşım Derneği İstanbul: Ohan Matbaası, 2006, 148-159
5. Mehmet Kıyan, Hepatit B Virüsü In: Viral hepatit 2003 Balık İ, Tekeli E, Viral Hepatitle Savaşım Derneği İstanbul: Karakter Kolor AŞ, 2003, 86-121
6. Kann M, Gerlich WH, Structure and molecular virology, In: Thomas HC, Lemon S, Zuckermann A Editors, Viral Hepatitis, Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd, 2005:149-180
7. Colombo M, Lambertico P, Natural History of chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma, Thomas HC, Lemon S, Zuckermann A Editors, Viral Hepatitis, Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd, 2005:263-268
8. Birengel S, Tekeli E, Kronik hepatit B’de epidemiyolojik, virolojik, fizyopatolojik ve klinik özellikler tanımlamalar, içinde: Köksal İ, Leblebicioğlu H editörler Kronik Hepatitlerin Tedavisinde güncel yaklaşımlar, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2007, 11-23
9. Prati D, Taioli E, Zanella A, Della et al. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. Ann Intern Med 2002;137:1-10.
10. Akhan S, Kronik hepatit B’de tanı, içinde: Köksal İ, Leblebicioğlu H editörler Kronik Hepatitlerin Tedavisinde güncel yaklaşımlar, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2007, 23-34

11. Özsan M, HBV enfeksiyonunda mikrobiyolojik tanı içinde: Viral hepatit 2007 Tabak F, Balık İ, Tekeli E, Viral Hepatitle Savaşım Derneği İstanbul: Ohan Matbaası, 2006, 124-134
12. Erden E, Kronik hepatitlerde histopatolojik tanı, içinde: Köksal İ, Leblebicioğlu H editörler Kronik Hepatitlerin Tedavisinde güncel yaklaşımlar, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2007, 253-262
13. Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV, Hepatitis B e Antigen-Negative Chronic Hepatitis B: Natural History and Treatment Semin Liver Dis 2006;26:130-141.
14. Liu CJ, Chen BF, Chen PJ, Lai MY, et al. Role of hepatitis B viral load and basal core promoter mutation in hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. J Infect Dis. 2006 May 1;193(9):1258-65
15. Papatheodoridis GV, Dimou E, Dimakopoulos K, Manolakopoulos S et al. Outcome of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B on long-term nucleos(t)ide analog therapy starting with lamivudine. Hepatology 2005;42:121-129
16. Papatheodoridis GV, Manesis E, Hadziyannis SJ. The longterm outcome of interferon-a treated and untreated patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. J Hepatol 2001;34:306-313
17. Saltoğlu N, B tipi kronik viral hepatitin güncel tedavisi İçinde: Tabak F, Balık İ, Tekeli E Editörler, Viral Hepatit 2005, Viral hepatitle savaşım derneği, Ohan matbaası Ankara 2005, 214 - 232
18. P. Marcellin, T. Asselah and N. Boyer, Treatment of chronic hepatitis B Journal of Viral Hepatitis, 2005, 12, 333-345
19. Herbein G, O'Brien WA, Tumor Necrosis Factor (TNF)- α and TNF Receptors in Viral Pathogenesis, PSEBM 2000 Vol: 223, 241 - 257
20. Hodge-Dufour J, Marino MW, Horton MR, Jungbluth A, Burdick MD, et al, Inhibition of interferon gamma induced interleukin 12 production: A potential mechanism for anti-inflammatory activities of of tumour necrosis factor Proc Natl Acad Sci USA, 1998; 95:13806-13811

21. Cope AP, Liblau RS, Yang XD, Congia M, Laudanna C, Schreiber RD et al, Chronic tumor necrosis factor alters T-cell responses by attenuating T cell receptor signalling, *J Exp Med* 1997; 185:1573-1584,
22. Su F, Schneider RJ, Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor- α , *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94:8744-8749
23. Lara-Pezzi E, Mesilla AL, Majano PL, Redondo JM, Lopez Carera M, The hepatitis B virus Xprotein activates nuclear factor of activated T cells(NF-AT) by a cyclosporin A-sensitive pathway, *EMBO-J* 1998;17:7066-7077,
24. Mohammed FF, Smookler DS, Taylor SEM, Fingleton B, Kassiri Z, Sanchez OH et al, Abnormal TNF activity in Timp3^{-/-} mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration, *Nature Genetics*, 2004; 36:9, 969-977
25. Bayley JP, Ottenhoff THM, Verweij CL Is there a future for TNF promoter polymorphisms?, *Genes and Immunity*, 2004 5,315-329,
26. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997; 349: 170–173.
27. Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M et al. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996; 43: 456 – 463
28. Louis E, Franchimont D, Piron A et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 401–406.
29. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3195–3199.
30. Vinasco J, Beraun Y, Nieto A et al. Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1997 49: 74–78,

31. Martinez A, Fernandez-Arquero M, Pascual-Salcedo D et al. Primary association of tumor necrosis factor-region genetic markers with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000, 43: 1366–1370
32. Lucotte G, Bathelier C, Mercier G. TNF-alpha polymorphisms in multiple sclerosis: no association with -238 and -308 promoter alleles, but the microsatellite allele a11 is associated with the disease in French patients. *Mult Scler* 2000 6: 78–80,
33. Weinshenker BG, Wingerchuk DM, Liu Q et al. Genetic variation in the tumor necrosis factor alpha gene and the outcome of multiple sclerosis. *Neurology* 1997; 49: 378–385.
34. Hohler T, Schaper T, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Marker-Hermann E. Association of different tumor necrosis factor alpha promoter allele frequencies with ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1489–1492.
35. Milicic A, Lindheimer F, Laval S et al. Interethnic studies of TNF polymorphisms confirm the likely presence of a second MHC susceptibility locus in ankylosing spondylitis. *Genes Immun* 2000; 1: 418–422.
36. Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD, Hopkins PJ, Hall JM. Relation between tumour necrosis factor polymorphism TNFalpha -308 and risk of asthma. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 82–85.
37. Winchester EC, Millwood IY, Rand L, Penny MA, Kessling AM. Association of the TNF-alpha -308 (G-A) polymorphism with self-reported history of childhood asthma. *Hum Genet* 2000; 107: 591–596.
38. Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* 2002; 186: 1687–1691.
39. Santos AR, Almeida AS, Suffys PN et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. *Int J Leprosy Other Mycobact Dis* 2000; 68: 325–327.

40. McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994; 371: 508-510.
41. May J, Lell B, Luty AJ, Meyer CG, Kremsner PG. Plasma interleukin-10:Tumor necrosis factor (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *J Infect Dis* 2000; 182: 1570-1573.
42. Stuber F, Udalova IA, Book M et al. 308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. *J Inflamm* 1995; 46: 42-50.
43. Mira JP, Cariou A, Grall F et al. Association of TNF2, a TNFalpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999; 282: 561-568.
44. O'Keefe GE, Hybki DL, Munford RS. The G-A single nucleotide polymorphism at the -308 position in the tumor necrosis factor-alpha promoter increases the risk for severe sepsis after trauma. *J Trauma* 2002; 52: 817-825.
45. Ozen S, Alikasifoglu M, Bakkaloglu A, Duzova K et al. Tumor necrosis factor alpha G→A -238 and G→A -308 polymorphisms in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology* 2002; 41:223-227
46. Karahan ZC, Deda G, Sipahi T, Elhan AH, Akar N, TNF- α -308G/A and IL-6 -174 G/C polymorphisms in the Turkish pediatric stroke patients *Thrombosis Research* (2005) 115, 393-398
47. Yazici AC, Erdal ME, Kaya TI, Ikizoglu G, et al Lack of association with TNF- α -308 promoter polymorphism in patients with vitiligo *Arch Dermatol Res* (2006) 298: 46-49
48. Akman A, Sallakci N, Coskun M, Bacanli A, TNF- α gene 1031 T/C polymorphism in Turkish patients with Behçet's disease *British Journal of Dermatology* 2006 155, pp350-356

49. Höhler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM et al A tumour necrosis factor alpha (TNF α) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection Clin Exp Immunol 1998; 111:579-582
50. Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiya Y et al Influence of Interleukin 10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with Hepatitis B virus, The American Journal of Gastroenterology 2002, 97:2086-2092
51. Kim YJ, Lee HS, Yoon JH, Kim CY et al Association of the TNF- α promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. Human Molecular Genetics 2003, 12:19 2541-2546
52. Wang C, Tang J, Song W, Loashevsky E, Wilson CM, Kaslow RA HLA and cytokine gene polymorphisms are independently associated with responses to hepatitis B vaccination. Hepatology 2004; 39: 978-988
53. Lu LP, Li XW, Liu Y, Sun GC et al Association of -238G/A polymorphism of tumour necrosis factor alpha gene promoter region with outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population, World J Gastroenterol 2004; 10(12) 1810-1814
54. Xu XW, Lu MH, Tan DM Association between tumour necrosis factor gene polymorphisms and the clinical types of patients with chronic hepatitis B virus infection, Clin Microbiol Infect 2005; 11:52-56
55. Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M et al Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection-association between TGF β 1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma, Journal of Hepatology 2005, 42:505-510
56. Li HQ, Li Z, Liu Y, Li JH et al Association of polymorphism of tumour necrosis factor alpha gene promoter region with outcome of hepatitis B virus infection. World J Gastroenterology 2005, 11(33): 5213-5217
57. Niro GA, Fontana R, Gioffreda D, Valvano R et al Tumour necrosis factor gene polymorphisms and clearance or progression of hepatitis B virus infection, Liver International 2005;25:1175-1181

58. Du T, Guo XH, Zhu XL, li JH et al Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *Journal of Viral Hepatitis* 2006. 13, 618-624
59. Li Chen, Zhi Xin C, Li-Juan Z, Chen P, Xiao-Zhong W, The association between cytokine polimorphisms ant the outcomes of chronic HBV infection. *Hepatology Research* 2006, 36: 158-166
60. Wai CT, Fontana RJ, Cytokine gene polymorphisms in Chronic Hepatitis B: A Step Up The Immunology Ladder, *American Journal of Gastroenterology*, 2003, 98:1, 6-8
61. Rehermann B, Nascimbeni M, Immunology of Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Infection, *Nature Reviews Immunology* 2005, (5), 215-22
62. Visvanathan K, Lewin SR, Immunopathogenesis: Role of Innate and Adaptive Immune Reponses, *Semin Liver Dis* 2006;26:104-115
63. Kiki İ, Yılmaz O, Erdem F, Gündoğdu M, Demircan B et al Tumour necrosis factor-a levels in hepatitis B virus-related chronic active hepatitis and liver cirrhosis and its relationship to Knodell and Child-Pugh scores *Int J Clin Pract*, 2006, 60, 9, 1075–1079
64. Akpolat N, Yahsi S, Godekmerdan A, Demirbag K, Yalniz M, Relationship between serum cytokine levels and histopathological changes of liver in patients with hepatitis B *World J Gastroenterol* 2005;11(21):3260-3263
65. Höhler T, Kruger A, Gerken G et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection. *J Med Virol* 1998; 54: 173–177.
66. Barrett S, Collins M, Kenny C et al. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factorbeta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2003; 71: 212–218
67. Dai CY, Chuang WL, Lee LP, Chen SC, Hou NJ, et al Associations of tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 and -238 with clinical characteristics of chronic hepatitis C *Journal of Viral Hepatitis*, 2006, 13, 770–77

68. Romero-Gomez M, Montes-Cano MA, Otero-Fernandez MA et al. SLC11A1 promoter gene polymorphisms and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut* 2004; 53: 446–450.
69. Hasanjani Roushan MR, Hajiahmadi M, Shafaie S. Histopathological features of liver and its relation to serum transaminase levels in 91 cases of anti-HBe-positive chronic hepatitis B. *Int. J. Clin. Pract.* 2005 Jul;59(7):791-4.
70. Suneetha PV, Sarin SK, Goyal A, Kumar GT, Shukla DK, Hissar S. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. *J.Hepatol.* 2006 May;44(5):856-63
71. Karabay O, Tamer A, Tahtaci M, Vardı S, Çelebi M Effectiveness of interferon plus lamivudine combination therapy versus interferon alpha monotherapy for the HBeAg negative chronic hepatitis B: a randomized clinical trial, *J Microbiol Immunol Infect*, 2005, 38, 262 -265
72. Economou M, Manolakopoulos S, Trikalinos TA, Filis S, Bethanis S, Interferon alfa plus lamivudine vs lamivudine reduces breakthroughs, but does not affect sustained response in HBeAg negative chronic hepatitis B, *World J Gastroenterol* 2005;11(37):5882-5887
73. Lok ASF McMahon J Chronic Hepatitis B, AASLD Practice Guidelines, *Hepatology*, Vol. 45, No. 2, 2007 507-539
74. King JK, Yeh SH, Lin MW, Liu CJ, Lai MY, et al., Genetic polymorphisms in interferon pathway and response to interferon treatment in hepatitis B patients: A pilot study. *Hepatology*. 2002 Dec;36(6):1416-24.
75. Chan HL, Tse AM, Zhang MD, Wong VW, Chim AM, et al Genetic polymorphisms of interleukin-1-beta in association with sustained response to anti-viral treatment in chronic hepatitis B in Chinese. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2006 Jun 15;23(12):1703-11.
76. Yu MY, Dai CY, Chiu CC, Lee LP, Lin ZY, Tumor necrosis factor promoter polymorphisms at position -308 in Taiwanese chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha *Antiviral Research* 2003, 59, 35–40

11. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında desteğini, sabrını, hoşgörüsünü esirgemeyen Prof. Dr. Emel TÜRK ARIBAŞ'a, eğitimimdeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Mehmet BİTİRGEN, Prof Dr. Onur Ural ve Yrd. Doç. Dr. İbrahim ERAYMAN'a, infeksiyon hastalıkları uzmanlık eğitimini tercih etmemdeki rolünden dolayı Uzm. Dr. Bahar KANDEMİR'e, laboratuvar çalışmalarında katkılarından dolayı Prof. Dr. Hasan ACAR ve Uzm. Biy. Ziyaeddin İNAN'a, bu tezin laboratuvar, araştırma, yazım çalışmaları sırasında katkılarından dolayı Dr. Mehmet BALCI'ya, istatistiksel verilerin yorumlanması konusunda katkılarından dolayı Dr. Lütfi Saltuk DEMİR'e, tüm kan alma işlemlerini yapan intaniye kliniği hemşire ve sağlık memurlarına, çalışmalar sırasında ortaya çıkan dağınıklığı toparlayan Bekir Navruzluk'a, çalışmanın maddi desteğini sağlayan Schering Plough (ABD) firmasına teşekkürü bir borç bilirim.